

**Untersuchung der Wirkung von
Schwerionenstrahlen
auf menschliche Hautfibroblasten
unter besonderer Berücksichtigung
chromosomaler Veränderungen**

Dissertation zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Stephanie Berger
geb. in Frankfurt am Main

Mainz
18. Oktober 2001

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	7
2.1	Strahlenbiologische Untersuchungen in vitro	7
2.1.1	Fibroblasten als Modellsystem	7
2.1.2	Die strahlensensible Struktur der Zelle	8
2.2	Ionisierende Strahlung	8
2.3	Biologische Strahlenwirkung	11
2.3.1	Zellzyklus und Zellinaktivierung	11
2.3.2	Chromosomenschäden	12
2.3.3	Berechnung der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW)	14
2.4	Mensch und Strahlung	15
2.4.1	Strahlung im Alltag	15
2.4.2	Tumorthherapie mit schweren Ionen	16
2.5	Ziel der Untersuchung	19
3	Material und Methoden	21
3.1	Verwendete Zelllinien	21
3.2	Kultivierung und Lagerung der Zellen	22
3.3	Bestrahlung	24
3.3.1	Bestrahlungseinrichtungen und Dosimetrie	24
3.3.2	Bestrahlung der Zellen	24
3.4	Meßmethoden	25
3.4.1	Messung der Zellkern-Fläche	25
3.4.2	Wachstumskinetik	26

3.4.3	Koloniebildungstest	27
3.4.4	S-Phasen-Markierung	28
3.4.5	Durchflußzytometrische Zellzyklus-Messungen	30
3.4.6	Laktat-Dehydrogenase-Messung (LDH)	32
3.4.7	Bestimmung des Differenzierungsmusters	33
3.4.8	Mikrokern-Nachweis	35
3.4.9	Chromosomenanalyse	35
3.4.10	Schwester-Chromatiden-Austausch (SCE)	40
3.5	Einfluß von Bromdesoxyuridin (BrdU)	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Charakterisierung von Zellparametern	43
4.1.1	Fläche des Zellkerns	43
4.1.2	Wachstumskinetik	44
4.1.3	Zellzyklus-Studien	46
4.1.4	Koloniebildungsfähigkeit (PE)	47
4.1.5	Differenzierungsmuster	47
4.2	Einfluß von Strahlung	49
4.2.1	Wachstumskinetik	49
4.2.2	Koloniebildung	50
4.2.3	Laktat-Dehydrogenase-Abgabe (LDH)	53
4.2.4	Zellzyklusverlauf	54
4.2.5	Erzeugung von Mikrokernen	61
4.2.6	Chromosomenschäden	62
4.3	Einfluß von Bromdesoxyuridin	72
4.3.1	Koloniebildungstest	72
4.3.2	Laktat-Dehydrogenase-Messung	72
4.3.3	Wachstumskinetik	73
4.3.4	Zellzyklusverlauf	74
4.3.5	Differenzierungsmuster	75
4.3.6	Schwester-Chromatiden-Austausch (SCE)	77
4.3.7	Mitose-Index	77
4.3.8	Chromosomen-Analyse	78

5 Diskussion	83
5.1 Zellinaktivierung	83
5.2 Proliferation und Zellzyklus-Arrest	86
5.3 Einfluß von BrdU auf zellbiologische Experimente	91
5.3.1 Zytotoxische Wirkung von BrdU	91
5.3.2 Induktion chromosomaler Schäden durch BrdU	94
5.3.3 Einfluß auf die Meßergebnisse	95
5.4 Chromosomenschäden nach Bestrahlung	97
5.4.1 Zeitliche Verteilung der Chromosomenschäden	97
5.4.2 Integration der Aberrationen zum Gesamtschaden	98
5.4.3 Chromosomenaberrationen und Inaktivierung	99
5.4.4 Mikrokerne	102
5.5 Biologische Wirksamkeit von Strahlung	104
6 Zusammenfassung und Ausblick	109
Anhang	111
A Abkürzungsverzeichnis	111
B Materialien	113
B.1 Chemikalien	113
B.2 Lösungen und Puffer	115
B.3 Medien und Seren	116
B.4 Verbrauchsmaterialien	116
B.5 Geräte	117
C Tabellen	119
C.1 Chromosomenaberrationen	119
C.1.1 250 kV Röntgenstrahlung	120
C.1.2 11 MeV/u Kohlenstoff	121
C.1.3 9,9 MeV/u Nickel	123
C.2 Gemittelte und integrierte Aberrationsraten	125
C.2.1 11 MeV/u Kohlenstoff	125

C.2.2	9,9 MeV/u Nickel	125
C.3	Aberrations-Verteilungen	126
C.3.1	250 kV Röntgen	126
C.3.2	11 MeV/u Kohlenstoff	127
C.3.3	9,9 MeV/u Nickel	129
Literaturverzeichnis		131

Kapitel 1

Zusammenfassung

Die Wirkung schwerer Ionen gewinnt zunehmend an Bedeutung, seit der Mensch diesen nicht nur während Weltraumflügen, sondern auch im Rahmen der Tumorthherapie begegnet, wie sie zur Zeit auch an der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) erprobt wird. Um die Wirkung von Ionenstrahlung mit der anderer Strahlenarten zu vergleichen, wird die relative biologische Wirksamkeit (RBW) verwendet, die die Effektivität einer Strahlenart im Vergleich zu einer Standardstrahlung wie z.B. 250 kV Röntgenstrahlung beschreibt. Sie hängt u.a. von der je Wegstrecke deponierten Energie (dE/dx) der verwendeten Strahlung ab, die durch den Linearen Energie Transfer LET beschrieben wird.

Die Berechnung der RBW erfolgt klassischer Weise aus dem klonogenen Überleben, zur besseren Beschreibung gerade von Späteffekten werden aber auch andere biologische Effekte, sogenannte „Endpunkte“ wie die Induktion chromosomaler Schäden betrachtet. In Untersuchungen von Ritter et al. (1990 und 1996) wurden solche Chromosomenschäden zu vielen Zeitpunkten nach Bestrahlung an etablierten Hamster-Zelllinien analysiert. Es zeigt sich ein drastischer Anstieg der Aberrationsrate mit der Zeit nach hoch-LET-Bestrahlung, während ein weniger ausgeprägter Anstieg nach Röntgenstrahlung gefunden wird. Eine genauere Abschätzung der RBW-Werte auf der Basis von Chromosomendaten wird daher erhalten, wenn die Aberrationsrate in der ersten Mitose nach Bestrahlung nicht wie üblich zu einem, sondern zu mehreren Zeitpunkten bestimmt, mit dem Anteil der ersten Mitosen und dem Mitoseindex gewichtet und über die Zeit zum Gesamtschaden aufsummiert wird [Ritter et al., 1996, Scholz et al., 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurden die oben erwähnten Experimente auf humane diploide Vorhaut-Fibroblasten AG01522 ausgedehnt. Die konfluenten Zellen wurden mit 250 kV Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen mit einer Energie von 11 und 200 MeV/u (LET 153 und 16 keV/ μm) sowie Nickelionen mit 9,9 MeV/u (LET 2540 keV/ μm) bestrahlt und der chromosomale Schaden in 4 h Intervallen bis zu 80 h nach Bestrahlung untersucht. Um zwischen Metaphasen des 1. und 2. Zellzyklus zu unterscheiden, wurde dem Zellkulturmedium Bromdesoxyuridin

(BrdU) zugesetzt und die als Standardmethode etablierte FPG-Färbung angewendet. Experimente zum Einfluß des BrdU auf die verwendeten Zellen zeigten, daß BrdU den Fortgang der Zellen durch den Zellzyklus hemmt und außerdem ein frühzeitiges „Altern“ der Zellen bewirkt. Die Aberrationsrate wird dagegen durch die Zugabe von BrdU nicht beeinflusst.

Der nach hoch-LET-Strahlung beobachtete Anstieg der Aberrationsraten mit der Zeit legt die plausible Erklärung nahe, daß geschädigte Zellen von Zellzyklusverzögerungen stärker betroffen sind als ungeschädigte Zellen und die Mitose daher verspätet erreichen. Das Ausmaß der Zellzyklusverzögerung wächst dabei für verschiedene Strahlenarten mit steigendem LET an. In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurde untersucht, inwieweit strahleninduzierte Zellzyklusverzögerungen die Expression von Chromosomenschäden beeinflussen. Neben der Markierung der Zellen in S-Phase wurde hierzu die Verteilung der Zellzyklusphasen mit Hilfe der Durchflußzytometrie und der Mitose-Index über viele Stunden nach Bestrahlung bestimmt. Die Untersuchungen zeigen einen deutlichen permanenten Zellzyklusarrest nach Bestrahlung, doch auch die unbestrahlten Kontrollzellen erreichen nur zu maximal 20 % die erste Mitose nach Lösen der Kontaktinhibition. Nach Bestrahlung sinkt dieser Wert mit steigender Dosis und LET. Im Gegensatz zu Experimenten an etablierten Hamsterzelllinien kann somit in normalen menschlichen Hautfibroblasten nur eine kleine Untergruppe von Zellen in Metaphase auf den strahleninduzierten Schaden hin untersucht werden. Der größere Teil der Zellen entzieht sich der Untersuchung durch einen permanenten Arrest. Die von Scholz et al. (1998) vorgeschlagene Integration der Chromosomenaberrationen über die Zeit führte für menschliche Fibroblasten wegen des großen Anteils permanent arretierter Zellen nicht zu Ergebnissen, die einen direkten Vergleich der in der Ausgangspopulation induzierten Chromosomenaberrationen zulassen. Der erhaltene Wert gibt vielmehr Auskunft darüber, welcher genetische Schaden an die folgende Zellgeneration weitergegeben wird. Dies ist für strahlenbiologische Risikoabschätzungen wichtig.

Die Relative Biologische Wirksamkeit folgt für alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Endpunkte der vielfach beschriebenen LET-Abhängigkeit mit einem Maximum um $150 \text{ keV}/\mu\text{m}$. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die RBW sehr stark von der experimentellen Bestimmung und der Berechnung abhängt. So können aus dem gleichen Datensatz RBW-Werte berechnet werden, die um den Faktor 3 auseinander liegen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen darüber hinaus, daß für verschiedene Zellsorten und Strahlenarten unterschiedliche biologische Effekte auftreten. Diese Unterschiede müssen auch berücksichtigt werden, wenn etablierte Methoden auf andere Zellsysteme übertragen und für andere Strahlenarten verwendet werden sollen. Zu beachten ist hierbei auch, daß jede Untersuchung einen Eingriff in das untersuchte System darstellt und somit seinerseits das Ergebnis verändern kann.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Strahlenbiologische Untersuchungen *in vitro*

Um die biologischen Vorgänge bei der Bestrahlung von Organismen nachvollziehen zu können, führt man entweder *in vitro* Zellexperimente durch oder bestrahlt Versuchstiere *in vivo*. In beiden Fällen werden verschiedene biologische Reaktionen, sogenannte „Endpunkte“, untersucht, anhand derer die Wirkung der Strahlung beurteilt werden soll. Zellsysteme haben den Vorteil, daß sie weniger komplex aufgebaut sind als Gewebe und daß je nach Fragestellung die Eigenschaften des Testsystems durch Auswahl geeigneter Zelllinien oder gentechnische Manipulation der Zellen verändert werden können. Außerdem können Zellkulturexperimente mehrfach wiederholt und statistisch gesicherte Aussagen getroffen werden. Auch wenn Tiermodelle aus ethischen Gründen nur begrenzt eingesetzt werden sollten, sind sie zum Verständnis der Wirkungen auf den Gesamtorganismus unersetzlich.

2.1.1 Fibroblasten als Modellsystem

Im Zusammenhang mit dem Therapieprojekt der GSI ist die Untersuchung der Wirkung schwerer Ionen auf menschliche Zellen von großem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurden menschliche Hautfibroblasten als Modellsystem verwendet, da diese bei jeder externen Bestrahlung als Zellen des Bindegewebes der Haut mit betroffen sind. Bindegewebe kommt auch in der Lunge sowie in Knorpel, Sehnen, Bändern und Blutgefäßen vor und besteht vor allem aus extrazellulärer Matrix, in die Zellen eingestreut sind. Bei diesen handelt es sich insbesondere um Fibroblasten, die für den Aufbau von Kollagen und anderen Matrixkomponenten im Gewebe verantwortlich sind [Überblick z.B. bei Alberts et al., 1995].

Fibroblasten liegen im Gewebe als wenig spezialisierte Zellen vor, die zu Fibrozyten mit spezieller Funktion ausdifferenzieren können (siehe auch Ab-

schnitt 3.4.7 und 5). Bestrahlung kann die Differenzierung von Zellen stark beschleunigen, um z.B. Zellen mit genetischen Schäden an der Teilung zu hindern [Rodemann et al., 1991]. Die strahlungsbedingte Beschleunigung der Differenzierung von Fibroblasten bewirkt die nach therapeutischer Anwendung z.T. auftretenden Spätschäden wie eine Fibrose der Lunge oder der Haut [Burger et al., 1998].

Humane Fibroblasten haben *in vitro* eine endliche mitotische Lebensdauer [Hayflick und Moorhead, 1961]. Es handelt sich daher auch nach seriellem Passagieren noch um normale Zelllinien [Halle, 1976]. Wie unter *in vivo*-Verhältnissen im Gewebe können Zellen auch *in vitro* sterben, wenn sie das Ende ihrer Lebensdauer erreicht haben, oder je nach Zellsorte auch transformieren [Bayreuter et al., 1988a,b].

2.1.2 Die strahlensensible Struktur der Zelle

Es konnte schon sehr früh gezeigt werden, daß der strahlensensible Bereich von Säugetierzellen nicht die gesamte Zelle umfaßt, sondern hauptsächlich die Desoxyribonukleinsäuren (DNS) des Zellkerns [Munro, 1970, Charlton, 1986]. Alle anderen Moleküle der Zelle liegen in vielen Kopien vor und können, wenn nötig, anhand der genetischen Information der DNS wiederhergestellt werden. Nach der mitotischen Kondensation bildet jedes DNS-Molekül ein Chromosom, wobei die Anzahl der Chromosomen je Zelle je nach Lebewesen unterschiedlich ist. So besitzt der chinesische Hamster z.B. 22, der Mensch 46 Chromosomen. Im Fall einer Schädigung des Erbgutes können ganze Chromosomen verloren gehen oder molekulare Schäden an der DNS auftreten. Relevante DNS-Schäden sind neben der Brückenbildung von benachbarten Basen oder dem Fehlen einzelner Basen vor allem Einzel- und Doppelstrangbrüche, von denen letztere schwerwiegender sind. DNS-Schäden können vererbt oder durch Einwirkung chemischer Substanzen und durch Strahlung erzeugt werden [Überblick bei Wolff, 1991]. Die Untersuchung chromosomaler Schäden nach Bestrahlung mit ionisierenden Strahlenarten steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

2.2 Ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlenarten sind in der Lage, Elektronen aus den Atomen der Materie, die sie durchdringen, herauszuschlagen. Zu diesen Strahlenarten gehören hochenergetische UV-Strahlen, elektromagnetische Strahlen wie Röntgen- oder Gammastrahlung, leichte Teilchen wie Elektronen und schwere Teilchen wie Ionen (Übersicht in Gerthsen und Vogel, 1993). Dabei kann zwischen dünn- und dichtionisierender Strahlung unterschieden werden. Im Fall von dünnionisierender Strah-

lung wie Röntgen- oder Gammastrahlung sind die einzelnen Ionisationsereignisse weit voneinander entfernt und erzeugen durch Wechselwirkung mit der DNS gleichmäßig über die Zelle verteilte Schäden. Im Gegensatz dazu erzeugen Protonen oder Ionen, d.h. dichtungisierende Strahlungen, lokal sehr hohe Ionisationsdichten, die zu lokal gehäuften Schäden führen [Ward, 1985, Goodhead, 1989].

Die Dosis, die durch schwere Teilchen übertragen wird, steht mit der Fluenz (Anzahl der Teilchen pro Fläche) über den Linearen Energie Transfer LET in Zusammenhang (Formel 2.1). Der LET beschreibt die je Wegstrecke in der Materie deponierte Energie bzw. den Energieverlust dE/dx und ist von der kinetischen Energie und der Ladung des Projektil-Ions abhängig. Er wird zusätzlich durch Dichte und Kernladung der durchdrungenen Materie (Target) beeinflusst. Für biologische Targets wird der LET-Wert in Wasser verwendet.

$$D[Gy] = 1,6 \times 10^{-9} \times LET[keV/\mu m] \times F\left[\frac{1}{cm^2}\right] \times \frac{1}{\rho\left[\frac{g}{cm^3}\right]} \quad (2.1)$$

D	Dosis [Gy]
LET	Linearer Energietransfer [keV/ μm]
F	Teilchenfluenz [$1/cm^2$]
ρ	Dichte [g/cm^3], für Wasser = 1

Die Energie der Projektil-Ionen, und damit auch der LET, ändert sich beim Durchgang der Teilchen durch Materie. Mit zunehmender Eindringtiefe nimmt die Energie der Ionen durch Wechselwirkung vor allem mit den umgebenden Elektronen ab, bis die Teilchen am Ende ihrer Reichweite abrupt stoppen. Dabei nimmt mit abnehmender Geschwindigkeit die Wechselwirkungszeit und somit auch der Energie-Übertrag (LET) bis zu einem scharfen Maximum am Ende der Spur zu. Es ergibt sich eine sogenannte Bragg-Kurve, bei der die maximale Energieabgabe am Ende der Teilchenspur erreicht wird (Abbildung 2.1). Durch die Wahl der Anfangsenergie läßt sich das Bragg-Maximum in seiner Tiefenlage im Gewebe verändern. Dieses im Vergleich zu elektromagnetischer Strahlung invertierte Dosisprofil ist die Grundlage der Strahlentherapie mit Schwerionenstrahlen. Die bei den seltenen Kernreaktionen mit den Target-Atomen entstehenden leichten Bruchstücke des Projektil-Ions (Fragmente) haben wegen ihrer geringeren Ladung auch einen geringeren Energieverlust in Materie und damit bei gleicher Anfangsenergie eine größere Reichweite als schwerere Teilchen. Sie bewirken den bei gemessenen Bragg-Kurven sichtbaren Schweif hinter der Reichweite der Primärteilchen [Kraft, 1990].

Bei dichtungisierender Strahlung werden durch die Wechselwirkung mit Atomen der durchdrungenen Materie sogenannte δ -Elektronen aus den Atomhüllen emittiert. Ein Großteil der vom Projektil abgegebenen Energie wird als kinetische Energie auf diese δ -Elektronen übertragen. Zusammen mit den Primärteilchen

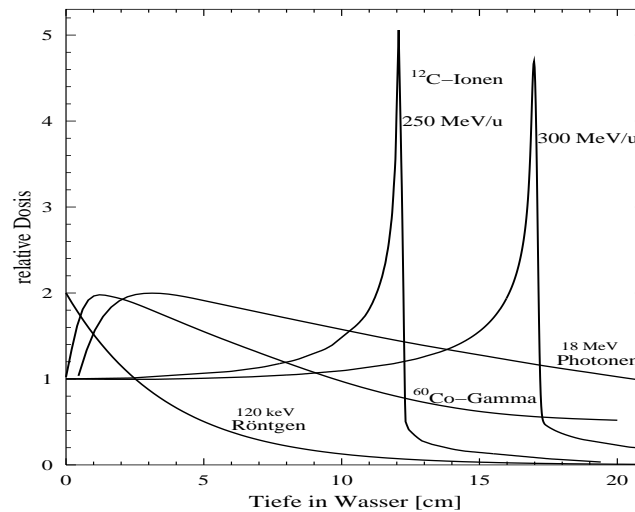


Abbildung 2.1: Tiefendosisprofile von Röntgen-, ^{60}Co - γ - und Photonen-Strahlung im Vergleich zu Kohlenstoffionen. Die Position des Bragg-Maximums hängt von der Energie der eindringenden Ionen ab und kann daher variiert werden.

des Strahls erzeugen sie eine Spur von Ionisationsereignissen entlang der Teilchenbahn [Krämer und Kraft, 1994]. Innerhalb der Spur nimmt die Dosis mit dem Quadrat des Abstandes vom Spurzentrums ab und erreicht am Rand der Spur nur noch einen Bruchteil der extrem hohen Dosis von vielen kGy, die im Zentrum der Spur übertragen wird. Bei Teilchen mit hoher Energie ist die maximale Reichweite der δ -Elektronen groß und somit auch der Spurdurchmesser dieser Ionen. Teilchen geringer Energie übertragen auch nur wenig kinetische Energie auf die δ -Elektronen, so daß deren Reichweite kurz ist. Dies führt zu kleinen Spurdurchmessern. Zusammen mit dem erhöhten Linearen Energie Transfer LET bewirken sie eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Ionisationsereignisse längs der Spur. Dies führt zu einer erhöhten Ionisationsdichte und damit zu Schadensanhäufungen an der DNS („cluster-lesions“) [Ward, 1985, Goodhead, 1989], die durch die Zelle schlechter zu reparieren sind [Heilmann et al., 1996, Löbrich et al., 1998]. Die Spurdurchmesser dieser niederenergetischen Ionen sind auch verglichen mit dem Durchmesser der Zellkerne klein und bewirken damit, daß bei geringen Fluenzen die statistische Verteilung der Treffer relevant wird, da u.U. Zellkerne nicht getroffen werden (Abschnitt 4.1.1). Es kommt damit zur Aufspaltung der Population in zwei Subpopulationen [Griffin et al., 1995, Scholz et al., 1998], Zellen mit getroffenem und mit ungetroffenem Kern, die beide ihren Anteil zur Strahlenantwort beitragen.

2.3 Biologische Strahlenwirkung

2.3.1 Zellzyklus und Zelinaktivierung

Ein wichtiger Angriffspunkt für Strahlung ist die Teilungsfähigkeit von Zellen. Zellen, die sich nicht teilen, wie z.B. Nervenzellen, zeigen eine hohe Strahlenresistenz. Stark proliferierende Gewebe wie Haut und Schleimhaut dagegen sind besonders strahlensensibel. Proliferierende Zellen (mitotisch aktive Zellen) durchlaufen den sogenannten Zellzyklus. Die Teilungsphase somatischer Zellen wird hierbei als Mitose bezeichnet und stellt die einzige Zyklusphase dar, in der das Chromatin kondensiert ist und die Chromosomen mikroskopisch sichtbar sind. Die nach Abschluß der Mitose entstandenen Tochterzellen beginnen mit Eintritt in die Interphase einen weiteren Zellzyklus oder können in die sogenannte G_0 -Phase eintreten, die eine Ruhephase darstellt, aus der Zellen durch Stimulation wieder in den Zellzyklus zurückkehren können. Die Interphase besteht aus drei Unterphasen, der G_1 -Phase, der S-Phase, in der der Doppelstrang der DNS repliziert wird, und der anschließenden G_2 -Phase. Wird der Zellzyklus angehalten, damit die Zelle z.B. DNS-Schäden reparieren kann oder weil äußere Bedingungen wie z.B. Serummangel dies erfordern, so geschieht dies bevorzugt an den Kontrollpunkten am Ende der G_1 - und G_2 -Phase, die den Übergang in die nächste Phase nur dann zulassen, wenn alle dafür notwendigen Prozesse erfolgreich durchlaufen wurden. Die Verzögerung von Zellen im Zellzyklus wird auch als Arrest bezeichnet und kann vorübergehend, also transient, oder dauerhaft, also permanent sein. Sind nicht alle Bedingungen für einen Übergang erfüllt, erfährt die Zelle einen solchen transienten oder permanenten Zellzyklusarrest oder stirbt durch Apoptose (Übersicht bei Alberts et al., 1995). Durch Bestrahlung wird der Ablauf des Zellzyklus nachhaltig beeinflusst und durch niedrige Dosen dünnionisierender Strahlung eine Verzögerung im Verlauf des Zellzyklus bewirkt. Die Dauer der Verzögerung nimmt mit der Dosis zu [Blakely et al., 1980a], und auch ein höherer LET der verwendeten Strahlung bewirkt eine stärkere Verzögerung [Lücke-Huhle et al., 1979, Collyn-d'Hooghe et al., 1981, Ritter et al., 1990, Scholz, 1992, Scholz et al., 1994]. Für hohe LET-Werte konkurriert die Verzögerung mit dem zunehmenden Anteil sterbender oder dauerhaft arretierter Zellen, deren Schäden nicht mehr reparabel sind. Scheiden Zellen aus dem Zellzyklus aus, weil sie sterben oder ausdifferenzieren, so geschieht dies nach Rodemann et al. (1991) in der G_1/G_0 -Phase, ist nach Jentzsch (1983) aber auch in der G_2 -Phase möglich.

Im Verlauf des Zellzyklus unterliegt die Strahlensensibilität der Zellen Veränderungen, die mit der Zellkerngröße und der Struktur des Chromatins in Zusammenhang stehen [Gillespie et al., 1975, Todd, 1975, Bedford et al., 1978, Geard, 1985, Zaider, 1996]. Um die Interpretation von Ergebnissen zu erleichtern, werden daher für strahlenbiologische Untersuchungen wenn möglich syn-

chronisierte Zellen verwendet. So können z.B. menschliche Hautfibroblasten durch Kontaktinhibition in der G_1 - bzw. G_0 -Phase des Zellzyklus angereichert und damit synchronisiert werden. Den Grad der Synchronisation, d.h. die Verteilung der Zellen einer Population auf die einzelnen Zellzyklusphasen kann durch Durchflußzytometrie bestimmt werden. Auf diese Weise sind auch Untersuchungen der Zellzyklusverzögerung nach Bestrahlung möglich [Scholz et al., 1989], wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und durch S-Phasen-Markierung ergänzt wurden (Abschnitt 4.2.4).

Das klassische Kriterium zur Feststellung einer Strahlenschädigung ist die Messung der Zellinaktivierung, das heißt des Verlustes der Koloniebildungsfähigkeit [Puck und Marcus, 1955]. Bei dünnionisierender Strahlung zeigt die Überlebenskurve im allgemeinen eine Schulter (Abbildung 2.2). Versuche von Iliakis (1981) mit Inhibitoren der DNS-Reparatur sowie Experimente mit reparaturdefizienten Zellen ergaben, daß die Ausprägung der Schulter durch die Reparaturkapazität der Zellen bedingt ist. Zellen mit hoher Reparaturkapazität zeigen eine ausgeprägte Schulter. Diese Überlebenskurven werden durch eine linear-quadratische Dosisabhängigkeit beschrieben. Zellsysteme mit geringer oder ausgeschalteter Reparaturfähigkeit zeigen eine Abnahme der Schulter, d.h. des quadratischen Terms der Gleichung und gehen in eine lineare Dosisabhängigkeit über. An Hamsterzellen wurde gezeigt, daß sich mit steigendem LET die Schulter der Kurven immer weniger zeigt [Weyrather et al., 1999], wie in der vorliegenden Arbeit an menschlichen Hautfibroblasten bestätigt werden konnte (Abschnitt 4.2.2).

2.3.2 Chromosomenschäden

Die Auswertung der Koloniebildungsfähigkeit kann erst relativ spät nach Bestrahlung erfolgen und summiert alle Vorgänge, die innerhalb dieser Zeit geschehen. Um einen Einblick in frühe Prozesse zu gewinnen, begann man bereits in den 40er Jahren Chromosomenschäden zu untersuchen. Diese stehen mit dem strahlenbedingten Zellsterben in engem Zusammenhang [Bedford and Cornforth, 1987, Cornforth and Bedford, 1987, Kiefer, 1989]. Strukturelle Chromosomenschäden, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, entstehen durch die Fehlreparatur von DNS-Brüchen. Ein Teil der Zellen mit Chromosomenaberrationen stirbt, weil instabile Aberrationen wie azentrische Fragmente, di- und polyzentrische oder Ring-Chromosomen bei der Zellteilung nicht richtig getrennt werden können und zu einem großen Teil verloren gehen [Sasaki und Norman, 1967, Boei et al., 1996] (Abschnitt 3.4.9 und 5.4). Deshalb wird die maximale Anzahl induzierter Chromosomenschäden während der ersten Zellteilung bestimmt [Bedford et al., 1978]. Stabile Aberrationen wie reziproke Translokationen, die auch viele Generationen später noch nachgewiesen werden können, aber z.B. auch Deletionen können Ausgangspunkt von Tumoren sein. Zur Untersuchung der Strahlenwirkung wird das gesamte Spektrum

von Chromosomenschäden betrachtet, das je nach Strahlenart sehr unterschiedlich sein kann. So entsteht nach Einwirkung von hoch-LET-Strahlung durch die hohe Ionisationsdichte ein anderes Schadensbild als durch niedrig-LET-Strahlung [Griffin et al., 1995, Ritter et al., 1996, Nasonova, 1998, Anderson et al., 2000, Ritter et al., 2000, Ritter et al., 2001]. Der Zeitverlauf der Aberrationsraten wird durch die Strahlenart nachhaltig verändert [Ritter et al., 1990, Ritter et al., 1996], und geschädigte Zellen erreichen die Mitose später als ungeschädigte Zellen [Boei et al., 1996, Ritter et al., 1996, Nasonova, 1998, Scholz et al., 1998, Ritter et al., 2000, Ritter et al., 2001]. Diese Selektion führt zu einer Unterschätzung des Chromosomenschadens besonders nach Bestrahlung mit hoch-LET-Strahlung [Ritter et al., 1996, Nasonova, 1998, Scholz et al., 1998, Ritter et al., 2000, George et al., 2001]. Es wird daher eine Verlängerung der Meßdauer notwendig, will man trotz Zellzyklusverzögerung den gesamten Schaden erfassen [Lloyd et al., 1977, Ritter et al., 1992, Scholz et al., 1998].

Um nur Zellen des ersten Zyklus nach Bestrahlung zu untersuchen, wird Bromdesoxyuridin (BrdU) verwendet, das eine Unterscheidung der einzelnen Zellzyklen möglich macht. BrdU ist in vielen Untersuchungen von Chromosomenschäden eingesetzt worden und bewirkt hierbei nach Ikushima und Wolff (1974) unter Lichteinwirkung Chromatinbrüche, nach Scott (1979) aber ansonsten keine erhöhte Aberrationsrate. Die Angaben in der Literatur über weitere Auswirkungen von BrdU auf Zellen sind jedoch widersprüchlich: Zum Teil verneinen sie einen Einfluß auf Differenzierung und Proliferation [Rutter et al., 1973], zum Teil stellen sie eine Induktion von Zellzyklusarresten und Differenzierung fest [Michishita et al., 1999]. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen wurde daher der Einfluß von BrdU auf Proliferation, Differenzierung und die Induktion von Chromosomenaberrationen untersucht.

Die üblicherweise angewandte Untersuchung von Chromosomenschäden zu nur einem Sammelzeitpunkt läßt die strahleninduzierten Zellzyklusverzögerungen unberücksichtigt. Um auch diejenigen Zellen zu erfassen, die wegen eines verzögerten Zellzyklus die Mitose verspätet erreichen, werden die Chromosomenschäden zu vielen Zeitpunkten nach Bestrahlung bestimmt [Ritter et al., 1996]. Solange die Sammelintervalle so gewählt werden, daß die Dauer der Mitose im Vergleich dazu kurz ist, kann sichergestellt werden, daß keine Mitosen mehrfach ausgewertet werden. Durch Integration der so erhaltenen Daten kann der Gesamtschaden in allen Zellen bestimmt werden, die die erste Mitose nach Bestrahlung erreichen [Scholz et al., 1998]. Die Abberationsrate wird dabei auf die Ausgangspopulation bezogen. Sie wird nur noch durch dauerhafte Zellzyklus-Arreste beeinflusst. Der erhaltene Wert gibt somit Auskunft über den Schaden, der an die nächste Generation von Zellen weitergegeben werden kann.

Zellzyklusstörungen müssen daher in Chromosomenexperimenten berücksichtigt werden, um einen Vergleich der Effektivität verschiedener Strahlenarten zu ermöglichen und aussagekräftige Relative Biologische Wirksamkeiten (RBW) zu bestimmen.

2.3.3 Berechnung der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW)

Die Effektivität ionisierender Strahlung ist durch ihre Ionisationsdichte bedingt, die vom LET und der radialen Dosisverteilung abhängt (siehe oben). Zur Beschreibung der Wirksamkeit einer Test-Strahlung im Vergleich zu einer Referenzstrahlung wie z.B. 250 kV Röntgenstrahlung in der vorliegenden Arbeit, wurde die Relative Biologische Wirksamkeit RBW eingeführt.

Die RBW wird folgendermaßen berechnet: (hier z.B. für ein Überlebensniveau von 10%)

$$RBW_{10} = \frac{D_{10}(\text{Röntgen})}{D_{10}(\text{Test})} \quad (2.2)$$

RBW_{10}	relative biologische Wirksamkeit für 10% Überleben
D	Dosis [Gy]
$D_{10}(\text{Röntgen})$	Röntgendosis, bei der 10% der Zellen überleben
$D_{10}(\text{Test})$	Dosis der Teststrahlung, bei der 10% der Zellen überleben

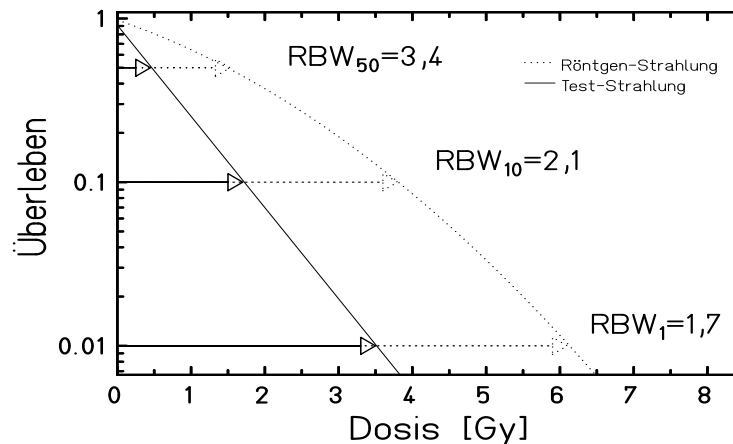


Abbildung 2.2: Bestimmung der RBW einer Teststrahlung am Beispiel von AG-Zellen für Überlebensniveaus von 50%, 10% und 1%. Als Referenzstrahlung wurde 250 kV Röntgenstrahlung verwendet.

Die RBW hängt vom betrachteten biologischen Endpunkt wie z.B. Inaktivierung, Mutationsinduktion oder Chromosomenschädigung ab. Beim Vergleich

von Dosis-Effekt-Kurven mit unterschiedlichem Verlauf kann die RBW in jedem Schadensniveau einen anderen Wert annehmen und ist nur für vollständig exponentielle Kurven vom Schadensniveau unabhängig. Daher muß der Grad des Schadens festgelegt werden, für den die RBW bestimmt werden soll. In Abbildung 2.2 sind exemplarisch zwei Dosis-Effekt-Kurven dargestellt und die RBWs für 1%, 10% und 50% Überleben berechnet. Die RBW steigt zum geringeren Schadensniveau hin von 1,7 auf 3,4 an. Bei Endpunkten, die eine ausgeprägte Schulterkurve für die Referenzstrahlung zeigen, ergeben sich besonders im Niedrig-Dosisbereich hohe RBW-Werte [Barendsen et al., 1963, Skarsgard et al., 1967]. Mit steigendem LET der Teststrahlung werden die Kurven steiler und die RBW größer, bis sich der Effekt umkehrt: ein einzelnes Teilchen erzeugt dann eine so hohe Ionisationsdichte, daß die lokal deponierte Energie die zur Verursachung des Schadens notwendige Energie übertrifft. Dies wird als „overkill“-Effekt bezeichnet [Skarsgard et al., 1967, Kiefer, 1989, Hall, 1994]. Mit steigendem Atomgewicht verschiebt sich das Maximum der RBW zu höheren LET-Werten hin und flacht gleichzeitig ab, wie Abbildung 2.3 zeigt [Kraft et al., 1997].

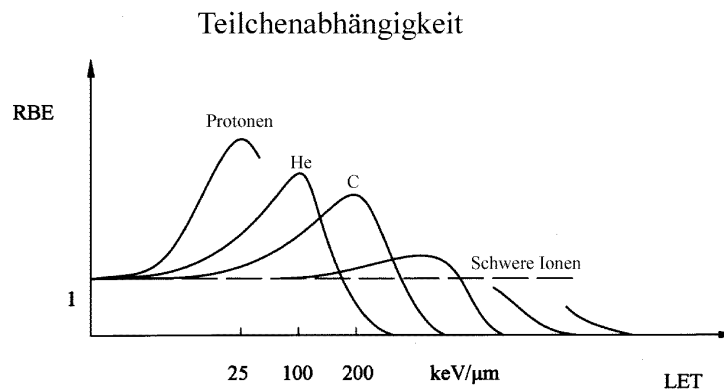


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der RBW als Funktion des LET in Abhängigkeit von der verwendeten Ionensorte [Kraft et al., 1997].

2.4 Mensch und Strahlung

2.4.1 Strahlung im Alltag

Bereits kurz nachdem im Dezember 1895 Wilhelm Conrad Röntgen die „X-Strahlen“ entdeckte, fanden diese im Januar 1896 in der medizinischen Diagnostik und 1897 bei der Bestrahlung eines Muttermals in der Therapie ihre Anwendung

[Hall, 1994, Kiefer, 1989]. Zum damaligen Zeitpunkt war über die Wirkungsweise wenig bekannt und auch heute noch sind nicht alle biologischen Prozesse, die einer Bestrahlung folgen, vollständig geklärt.

Im Alltag ist jeder Mensch Strahlung ausgesetzt, deren Hauptanteil mit 2,4 mSv/Jahr die natürliche Erdstrahlung, die kosmische Strahlung und die UV-Strahlung der Sonne ausmachen. Seit der Nutzung der Radioaktivität sind neue Quellen hinzugekommen, wie die Belastung des Menschen durch diagnostische und therapeutische Anwendungen in der Medizin (etwa 2 mSv/Jahr). Auch die Verwendung des Flugzeugs als Transportmittel erhöht die Strahlenbelastung des Menschen, da die kosmische Strahlung mit zunehmender Entfernung von der Erde weniger abgeschirmt wird. Wesentlicher Bestandteil der Untersuchung kosmischer Strahlung sind schwere geladene Teilchen von Protonen bis zu Eisen- und Nickelionen mit einer Energieverteilung bis hinauf zu mehreren GeV/u [Curtis und Letaw, 1989, Schimmerling, 1992, Schelin et al., 1993, Bissell et al., 1997].

Ein Ziel der biologischen Strahlenforschung ist es, die verschiedenen Wirkungen von Strahlung im sogenannten „predictive assay“ vorherzusagen oder als „biologische Dosimetrie“ nachzuvollziehen [Bender et al., 1988, Wolff, 1991, Edwards, 1997, Yang et al., 1997, Testard und Sabatier, 1999]. Die Untersuchung der Wirkung der einzelnen Strahlenarten, wie die der in der vorliegenden Arbeit verwendeten niederenergetischen schweren Ionen Kohlenstoff und Nickel, ist für diese Risikoabschätzungen ausgesprochen wichtig.

2.4.2 Tumorthherapie mit schweren Ionen

Für schwere Ionen wie Kohlenstoff ergibt sich im Vergleich mit der konventionell zur Therapie verwendeten Gamma- oder Elektronenbremsstrahlung neben dem besseren, d.h. invertierten Dosisprofil zusätzlich eine erhöhte biologische Wirksamkeit. Die Übertragung der Ergebnisse klinischer Studien in den USA und Japan auf die deutsche Bevölkerung ergab, daß für mehr als 10.000 Patienten in Deutschland, vornehmlich mit inoperablen Schädelbasis- oder Hirntumoren, Weichteilsarkomen oder Prostatakarzinomen, eine Behandlung mit Teilchenstrahlung eine wesentliche Verbesserung der Behandlungserfolge bringen würde [Debus et al., 1998].

Bei Verwendung von Gamma- oder Elektronenbremsstrahlung fällt die im Gewebe deponierte Dosis nach einem kurzen Anstieg mit zunehmender Tiefe stetig ab, wie Abbildung 2.1 zeigt. Für einen tiefliegenden Tumor ist deshalb die Integraldosis im Tumor kleiner als im gesunden Gewebe vor und hinter dem Tumor. Protonen- und Ionenstrahlen weisen aufgrund ihres invertierten Tiefendosisprofils demgegenüber eine wesentlich günstigere Dosisverteilung auf. Für geladene Teilchen steigt die abgegebene Dosis mit wachsender Eindringtiefe an und fällt

nach dem Bragg-Peak steil ab, so daß die Tumordosis bei gleichzeitiger Schonung des gesunden Gewebes erhöht werden kann [Kraft, 1990].

Durch die erhöhte Dosis im Tumolvolumen und die gesteigerte biologische Wirksamkeit können besonders sauerstoffarme, langsamwachsende und andere strahlenresistente Tumore erfolgreich behandelt werden. Wegen des günstigen Verhältnisses der biologischen Wirksamkeit im Eingangskanal und im Tumolvolumen werden für die Therapie Kohlenstoffionen verwendet, wie schon 1978 von Chapman et al. vorgeschlagen wurde. Die mit steigender Ordnungszahl abnehmende Reichweiten- und Seitenstreuung stehen bei Kohlenstoffionen in einem angemessenen Verhältnis zur zunehmenden Produktion von leichten Fragmenten durch Kernreaktionen [Kraft, 1990].

Sehr viel früher, bereits 1946, wurde von Wilson vorgeschlagen, Protonen zur Behandlung von Krebspatienten zu verwenden. 1954 wurde am LBL Berkeley (USA) mit der Protonentherapie begonnen und seither sind weltweit etwa 28.700 Patienten mit Protonen behandelt worden. Seit 1958 wurden in Berkeley Patienten mit Helium und seit 1971 mit schweren Ionen, zunächst Argon und später Neon, bestrahlt. In den Jahren 1994-99 wurden in Chiba (Japan) 745 Patienten mit Kohlenstoffionen bestrahlt [Sisterson, 2001]. Um die Vorteile der Schwerionenstrahlung für die Tumorthherapie auch in Deutschland nutzbar zu machen, wurde 1994 in Zusammenarbeit mit anderen Institutionen ein Pilotprojekt an der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) begonnen und 1998 die ersten Patienten der Studie bestrahlt. Seitdem wurden 73 Patienten mit inoperablen Tumoren in der Hirn- und Schädelbasisregion erfolgreich behandelt. Es konnte hierbei eine gute Kontrolle des Tumorwachstums bei nur sehr geringen Nebenwirkungen beobachtet werden, für weitere Aussagen ist die Zeit nach Bestrahlung noch nicht ausreichend lang [Debus et al., 2000, Haberer et al., 2001].

Die technischen Entwicklungen, die im Therapieprojekt der GSI verwirklicht wurden, erlauben erstmals eine dreidimensional tumorkonforme Bestrahlung mit Hilfe des Raster-Scan-Verfahrens [Haberer et al., 1993] und eine Online-Kontrolle des Therapiestrahles durch Verwendung der Positronen-Emissions-Tomographie PET [Enghardt et al., 1994]. Um die Möglichkeiten der Bestrahlungsanlage effektiv nutzen zu können ist es wichtig, die biologische Wirksamkeit der Ionen bei verschiedenen Energien zu kennen und in die bisher rein physikalische Bestrahlungsplanung zu integrieren. Grundlage für diese RBW-Berechnungen ist zum einen die Kenntnis der Teilchenzusammensetzung und die damit verbundene Ionisationsdichte und Dosis in jedem Punkt des Bestrahlungsfeldes, zum anderen die für die einzelnen Teilchen erwartete Wirkung [Scholz und Kraft, 1992, Krämer und Scholz, 2000].

2.5 Ziel der Untersuchung

Ziel der Untersuchung war es, die Wirkung schwerer Ionen auf primäre menschliche Fibroblasten zu untersuchen, da solche Untersuchungen bisher nur an immortalisierten Zelllinien wie chinesischen Hamsterzellen durchgeführt wurden. Einen wichtigen Teilaspekt nehmen hierbei die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Strahlenantworten der Zellsysteme ein.

Die Untersuchung erstreckte sich auf verschiedene Zellantworten nach Bestrahlung ,sogenannte Endpunkte, wie Inaktivierung, Zellzyklusverschiebungen und zeitliche Änderungen des Mitoseindex sowie auf die Untersuchung von Chromosomenaberrationen. Dieser letzte Punkt, die Untersuchung der Chromosomenaberrationen, ist für den Strahlenschutz, aber auch für eventuelle Langzeiteffekte bei Patientenbestrahlungen von besonderer Wichtigkeit, da Chromosomenveränderungen ein Indikator allgemeiner genetischer Veränderungen und damit auch der Tumorinduktion sind. In neueren Messungen ([Ritter et al., 1996, Nasonova, 1998, Scholz et al., 1998, Ritter et al., 2000]) wurde gezeigt, daß für permanente Zelllinien die biologische Wirksamkeit (RBW) für Chromosomenschäden bisher stark unterschätzt worden war, da geschädigte Zellen über den normalerweise üblichen Untersuchungszeitraum hinaus verschoben waren und damit der Beobachtung entgingen. Durch Messung zu vielen Zeitpunkten und Einbeziehung der zeitlichen Änderung des Mitoseindex kann durch zeitliche Aufsummierung die totale Anzahl an Chromosomenschäden erfaßt werden und im Vergleich zu dünnionisierender Strahlung die RBW zuverlässig berechnet werden.

Für primäre Zellen, die ein wesentlich besseres Modell der *in vivo* Situation am Patienten und im Strahlenschutz darstellen, wurden bis jetzt keine entsprechenden Studien für hoch-LET-Strahlung durchgeführt. Bei einem Vergleich von primären und permanenten Kulturen kann man nicht a priori davon ausgehen, daß sich primäre Zellen übereinstimmend verhalten, da sie z.B. durch einen permanenten Zellzyklusarrest und beschleunigte Differenzierung aus dem Zellzyklus ausscheiden. Diese Zellen erreichen dann nicht mehr die Mitose.

Der Einfluß von Zellzyklusarresten, die einer Differenzierung in vielen Fällen vorausgehen, auf die Untersuchung von Chromosomenschäden sollte mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Neben der Markierung der Zellen in S-Phase sollten auch die Verteilung der Zellzyklusphasen mit Hilfe der Durchflußzytometrie und der Mitoseindex über viele Zeitpunkte hinweg untersucht und dabei das Schicksal der Zellen nach Bestrahlung verfolgt werden.

Die eigentliche Untersuchung der Chromosomenaberrationen sollte in Metaphasepräparaten während der ersten Mitose nach Bestrahlung erfolgen, da in den folgenden Teilungen die Anzahl der sichtbaren Schäden rasch abnimmt [Sasaki und Norman, 1967, Boei et al., 1996]. Um nur Zellen des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung auszuwerten, sollte die als Standardmethode beschriebene FpG-Färbung zur Unterscheidung der einzelnen Zellzyklen verwendet werden.

Entgegen den Aussagen vieler Publikationen zeichnete sich im Verlauf der vorliegenden Arbeit ab, daß die Standardmethode unter Verwendung von BrdU nicht ohne Einfluß auf die humanen Fibroblasten ist. Daraufhin sollte geklärt werden, in wieweit BrdU die Ergebnisse der betrachteten Endpunkte wie Zellzyklusverlauf und Chromosomenaberrationen verändert.

Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, die möglichen Unterschiede in der Zellantwort von immortalisierten Hamsterzellen und primären menschlichen Zellen für verschiedene wichtige Endpunkte zu untersuchen und damit die Übertragbarkeit von Daten aus Experimenten mit Zellkulturen auf relevante *in vivo* Situationen zu überprüfen. Die zu diesem Zweck durchgeführten Untersuchungen werden im folgenden im Detail dargestellt.

Kapitel 3

Material und Methoden

Die verwendeten Materialien wie Chemikalien, Lösungen und Geräte werden im Anhang B genauer beschrieben:

- B.1 Chemikalien
- B.2 Lösungen und Puffer
- B.3 Medien und Seren
- B.4 Verbrauchsmaterial
- B.5 Geräte

Zur Durchführung aller Untersuchungen wurden Chemikalien in pA-Qualität verwendet. Wasser zum Ansetzen von Lösungen und Puffern wurde in einer Reinstwasseranlage (Millipore) durch Umkehrosmose erzeugt und an Stelle von destilliertem Wasser verwendet.

3.1 Verwendete Zelllinien

Der Großteil der Experimente wurden mit menschlichen Vorhaut-Fibroblasten der Linie AG01522C durchgeführt, die schon in vielen vorhergehenden Arbeiten der Abteilung Biophysik der GSI verwendet worden waren [Kirchner, 1996, Füssel, 1997, Größer, 1998, Fournier, 1999]. Es handelt sich um Zellen eines drei Tage alten gesunden männlichen Spenders. Sie wurden von der Zellbank des Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA) bezogen. Im Folgenden werden AG01522C-Zellen in dieser Arbeit abkürzend als AG-Zellen bezeichnet.

Zu Vergleichszwecken wurden für einzelne Untersuchungen weitere Fibroblasten-Zelllinien eingesetzt. Alle Zelllinien stammen von klinisch unauffälligen männlichen

Zelllinie	Gewebe	Alter des Spenders	CPD bei Bestrahlung	Herkunft
AG01522C	Vorhaut	3 Tage	22	Coriell Institute (Camden, NJ, USA)
GM05659C	Haut (Brust)	14 Monate	24	Coriell Institute (Camden, NJ, USA)
AP34	Haut	39 Jahre (Patient)	25	Klinische Radiologie (Heidelberg, BRD)
NHLF5975	Lunge	47 Jahre	n.d.	Cell Systems (St.Katherinen, BRD)
NHDF3080	Haut	neonatal	n.d.	Cell Systems (St.Katherinen, BRD)

Tabelle 3.1: Überblick über die verwendeten Zelllinien und deren Herkunft und genaue Bezeichnungen (n.d. = nicht durchgeführt).

Spendern der kaukasischen Rasse, nur der Spender der Linie AP34 war Patient der Strahlentherapie der Universität Heidelberg und wurde wegen eines Tumors im Kopf/Hals-Bereich behandelt [Rudat et al., 1997]. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Zelllinien und ihre Herkunft.

Alle in dieser Arbeit verwendeten menschliche Fibroblasten-Linien sind nicht immortalisiert und unterliegen damit der Differenzierung. Diese Differenzierung hängt insbesondere von der Anzahl an Teilungen ab, die eine Zelle durchlaufen hat. Die kumulative Populationsverdopplung (cummulativ population doubling CPD) dient daher als Maß für das Alter der Zellkultur und beschreibt dieses besser, als die Anzahl der Passagen der Kultur. Die CPD gibt die Anzahl der Zellzahl-Verdopplungen innerhalb der Kulturdauer an und wird wie folgt berechnet:

$$\text{CPD} = \sum \ln[N/N_0]/\ln 2 \quad (3.1)$$

Dabei stellt N die Anzahl der geernteten Zellen und N_0 die Anzahl der zuvor eingesäten Zellen dar. Die CPD wurde während der Kultivierung der Zellen fortlaufend aufsummiert und protokolliert. Untersuchungen zeigten, daß die Anheftung der Zellen im gleichen Maße schwankt, wie die Meßgenauigkeit der Zellzahlbestimmung und daher bei der Berechnung der CPD vernachlässigt werden kann.

3.2 Kultivierung und Lagerung der Zellen

Sämtliche Zelllinien wurden bei 37°C , 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 als Monolayer-Kulturen in Kulturflaschen oder -schalen kultiviert. Alle Zelllinien wur-

den mit EMEM Medium mit 10 % oder 20 % fötalem Kälberserum ernährt. Bei Bedarf wurden dem Medium Penicillin und Streptomycin und in Ausnahmefällen Amphotericin zugegeben.

Die adhärennten Zellen wurden zur Subkultivierung mit EDTA-Trypsinlösung (0,5 g/l Trypsin + 1 g/l EDTA) gespült und anschließend durch Überschichten mit EDTA-Trypsinlösung (5 min, 37°C) von der Wachstumsfläche gelöst. Nach Vereinzeln der Zellen durch mehrmaliges Ansaugen mit einer Glaspipette und Abspülen der Wachstumsfläche wurde das Trypsin durch Zugabe des mindestens dreifachen Volumens an serumhaltigem Zellkulturmedium inaktiviert. In einem Aliquot der Suspension wurde die Zellzahl mit Hilfe eines elektronischen Zellsystems (Casy1) bestimmt und die Zellen erneut in einer Zelldichte von max. 20.000 Zellen/cm² ausgesät.

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in Tiefkühlmedium mit 20 % FCS und 10 % Glycerin bei -196°C in flüssigem Stickstoff in einer Zelldichte von 1-2×10⁶ Zellen/ml Einfriermedium. Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und zentrifugiert (800 Upm, 10 min, ohne Bremse) und das Pellet in Einfriermedium aufgenommen. Jede 2 ml-Ampulle wurde mit 1,8 ml Medium befüllt, damit die Ampullen beim Auftauen nicht durch den sich ausdehnenden Stickstoff explodieren. Nach 20 min wurden die Ampullen in einer Einfrierhilfe in Isopropanol bei -80°C langsam abgekühlt (1°C/min). Am folgenden Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff umgesetzt. Das Auftauen erfolgte durch schnelles Erwärmen der Ampullen im Wasserbad bei 37°C und Aussaat in Kulturflaschen von 75 cm² mit 15 ml Nährmedium. Nach 3 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um Glycerin und tote Zellen zu entfernen. Etwa 70 % der eingefrorenen Zellen hefteten sich nach dem Auftauen wieder an.

Die verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Infektionen mit Mykoplasmen untersucht. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand konfluenter Kulturen mit dem Mycoplasma Detektion Kit (ELISA) getestet. Im Laufe der Untersuchungen wurden in keiner Probe Mykoplasmen nachgewiesen.

In allen Experimenten wurden durch Kontaktinhibition in G1-Phase synchronisierte Zellen verwendet. Sofern dem Medium BrdU zugegeben wurde, wurde eine Konzentration von 10 µmol/l verwendet und die Zugabe erst nach der Bestrahlung durchgeführt, da BrdU auf Zellen strahlensensibilisierend wirkt.

Die zur Zellkultur verwendeten Materialien wurden heißluftsterilisiert (6 h, 180°C) bzw. autoklaviert (20 min, 120°C, 2 bar). Hitzeempfindliche Flüssigkeiten wurden sterilfiltriert (Porengröße der Filter 0,2 µm), die Probenmagazine für die Bestrahlung am UNILAC (siehe Abschnitt 3.3) wurden vor Gebrauch durch UV-Licht entkeimt.

3.3 Bestrahlung

3.3.1 Bestrahlungseinrichtungen und Dosimetrie

Die Bestrahlung der Zellen mit niederenergetischen Ionen erfolgte am UNILAC (universal linear accelerator) der GSI. Hierzu wurde die biologische Bestrahlungsanlage BIBA verwendet [Kraft et al., 1980]. Das Strahl-Austrittsfenster bestand aus einer 10 μm dicken Titanfolie, die von einem Stützgitter stabilisiert wurde. Um Strahlinhomogenitäten auszugleichen, wurden die Proben senkrecht zum Strahl hin- und herbewegt. Die Dosimetrie wurde mit einem Sekundärelektronen-Zähler SEETRAM (SEcondary Electron Transmission Monitor) durchgeführt, dessen Sekundärelektronenstrom proportional zur Strahlintensität ist. Zu seiner Kalibrierung wurden Kernspuren in bestrahlten CR39-Plättchen durch Ätzung mit Natronlauge sichtbar gemacht und deren Anzahl mikroskopisch bestimmt. Hierfür wurde ein computer-gestütztes Bildanalysesystem verwendet.

Die Zellen wurden am UNILAC mit Kohlenstoff- (^{12}C) und Nickelionen (^{58}Ni) der Anfangsenergie 11,4 MeV/u bestrahlt. Die Energie der Ionen wird durch die Folien des Austrittsfensters und des Transmissions-Monitors sowie der Luftstrecke bis zum Target (16 mm) vermindert, so daß die Energie bei der Bestrahlung noch 11 bzw. 9,9 MeV/u beträgt [Heinrich et al., 1991]. Der Unterschied kommt durch den höheren Energieverlust von Nickelionen in Materie zustande.

Die Bestrahlung mit hochenergetischen Kohlenstoffionen von 200 MeV/u erfolgte am SIS (Schwerionensynchrotron) der GSI. Bei hoher Energie ist der Energieverlust im Austrittsfenster und dem Boden der Kulturflasche so gering, daß er nicht weiter berücksichtigt wurde. Der Teilchenstrahl wurde mit Hilfe eines Scanners [Haberer et al., 1993] über die Probe geführt. Die Dosimetrie wurde mit Hilfe von Ionisationskammern durchgeführt, die mit geeichten Ionisationskammern kalibriert wurden, wie im Detail bei Kraft-Weyrather et al. (1992) beschrieben ist.

Als Referenzstrahlung diente Röntgenstrahlung. Die Proben wurden an einer Röntgenröhre (Seifert) bei einer Spannung von 250 kV und einer Stromstärke von 16 mA bestrahlt. Die Anode der Röhre bestand aus Wolfram, als Austrittsfenster wurde Berylliumfolie (7 mm) verwendet. Die weichen Anteile der Strahlung wurden durch Filter (1 mm Aluminium und 1 mm Kupfer) absorbiert. Dosis und Dosisleistung wurden mit Hilfe einer nach Fricke (1966) kalibrierten Ionisationskammer (Stabdosisimeter DL4, Pychlau) ermittelt. Es wurde mit einer mittleren Dosisleistung von 3 Gy/min bestrahlt.

3.3.2 Bestrahlung der Zellen

Da für alle Experimente möglichst einheitliche Bestrahlungsbedingungen geschaffen werden sollten, wurden kontaktinhibierte Zellen verwendet. Durch Kontaktin-

hibition lassen sich Fibroblasten in der G1-Phase des Zellzyklus anreichern. Um dies zu erreichen, wurden die Zellen etwa 10 Tage vor Bestrahlung in Petrischalen oder Kulturflaschen in einer Dichte von 8.000 bis 10.000 Zellen/ cm^2 eingesät und drei Tage vor Bestrahlung das letzte Mal mit frischem Medium versorgt.

Bei der Bestrahlung mit niederenergetischen Ionen am UNILAC wurden die Proben wegen der geringen Reichweite der Ionen in offenen Petrischalen (Durchmesser 35 mm) bestrahlt, wie bei Kraft et al. (1980) beschrieben ist. Das Probenmagazin war mit warmem Nährmedium ohne Zusatz von FCS gefüllt. Die Bestrahlung eines Magazins mit maximal 19 Proben dauerte etwa 15 Minuten. Weil während der Bestrahlung im unteren Rand der vertikal gehaltenen Petrischale ein Flüssigkeitstropfen verblieb, wurden die Zellen dahinter mit einer niedrigeren Energie bestrahlt und daher vor der weiteren Aufarbeitung mit einem sterilen Wattetupfer entfernt.

Die Bestrahlung von Proben mit hochenergetischen Ionen erfolgte in geschlossenen Kulturflaschen, die in aufrechter Position bestrahlt wurden. Um dabei ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurden die Flaschen vollständig mit Medium gefüllt. Ebenfalls in geschlossenen Flaschen wurde die Röntgenbestrahlung durchgeführt, die Flaschen wurden jedoch liegend bestrahlt und daher nicht mit zusätzlichem Medium befüllt.

Eine Übersicht über die verwendeten Strahlenarten und ihre physikalischen Eigenschaften ist in Tabelle 3.2 gegeben. Sowohl zwischen unterschiedlichen Ionen annähernd gleicher Energie, als auch unterschiedlichen Energien des gleichen Ions bestehen drastische Unterschiede im Linearen Energie Transfer (LET) und der Reichweite. Die Anzahl an Teilchen (Fluenz), die notwendig ist, um 1 Gy zu applizieren, sinkt mit steigendem LET.

In allen Experimenten wurden die Kontrollzellen wie die bestrahlten Proben behandelt und wie diese an den Bestrahlungsplatz transportiert. Konnten die Kontrollzellen bei der Bestrahlung am UNILAC aus Platzgründen nicht in ein Magazin eingesetzt werden, so blieben sie bei Raumtemperatur im Labor stehen, um zumindest dem durch Temperaturschwankungen auftretenden Streß der Zellen Rechnung zu tragen.

3.4 Meßmethoden

3.4.1 Messung der Zellkern-Fläche

Bei der Bestrahlung mit dünnionisierender Teilchenstrahlung, wie z.B. hochenergetischen Kohlenstoffionen, ist der Spurdurchmesser groß im Vergleich zum Durchmesser des Zellkerns. Dadurch wird jeder Zellkern getroffen. Die Anzahl der Treffer kann hierbei etwas variieren, die Abweichung ist aber klein gegen die

Strahlung		Energie auf Target	LET [keV/ μm]	Fluenz je Gy	Reichweite in H_2O	Dosis- bereich
Kohlenstoff	^{12}C	200 MeV/u	16	38×10^6	8.6 cm [A]	0-5 Gy
Kohlenstoff	^{12}C	11 MeV/u	153	4×10^6	490 μm [A,B]	0-2,5 Gy
Nickel	^{58}Ni	9,9 MeV/u	2450	$2,5 \times 10^5$	188 μm [B]	0-12 Gy
Röntgen		250 kV	2			0-8 Gy

Tabelle 3.2: Zur Bestrahlung der Zellen verwendete Strahlenarten. Die Reichweitenbestimmung erfolgte nach Heinrich et al., 1991 (A) und Northcliffe und Schilling, 1970 (B).

Gesamtzahl der Treffer je Kern. Bei der Verwendung von niederenergetischen Ionenstrahlen ist der Spurdurchmesser kleiner als der Durchmesser des Zellkerns und der LET hoch. Deshalb wird nur eine relativ kleine Fluenz pro Gray benötigt (Tabelle 3.2). Die Trefferwahrscheinlichkeit erreicht daher einen Wert von 1 Treffer pro Zellkern oder weniger. Bei niedrigen Flüssen ($\leq 10^7$ Teilchen/ cm^2) werden dadurch nicht mehr alle Zellen getroffen. Um Aussagen über die Anzahl der Treffer pro Zellkern machen zu können, ist es notwendig, die Fläche des Zellkerns zum Zeitpunkt der Bestrahlung zu kennen. Da die Größe des Zellkerns unter anderem von der Zelldichte abhängt, wurden die Zellen für die Messung genau wie für die Bestrahlung vorbereitet (siehe Abschnitt 3.3.2). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 % Glutaraldehyd in PBS 1 Stunde bei 4°C fixiert, da bei dieser Fixierung nur eine geringe Veränderung der Größe der Zelle und des Kerns auftritt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der Kern mit Hoechst-Färbelösung (16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, min. 30 min) gefärbt. Am Fluoreszenz-Mikroskop wurden 331 Zellen ausgewertet. Hierzu wurde ein an der GSI entwickeltes Computerprogramm [Scholz, 1992] verwendet, das die Zellkerne erkennt und ihre Fläche berechnet.

3.4.2 Wachstumskinetik

Zur Untersuchung der Wachstumskinetik der verwendeten Zelllinien und deren Änderung durch äußere Einflüsse wurden die Zellen in einer Dichte von 8000 Zellen/ cm^2 in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 12,5 cm^2 in Medium mit 10 % FCS ausgesät. In regelmäßigen Zeitabständen wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2 beschrieben trypsiniert. In drei parallelen Proben wurde mit Hilfe eines elektronischen Zellzählsystems (Casy1) die Zellzahl bestimmt.

3.4.3 Koloniebildungstest

Zellen vermehren sich durch Zellteilung und bilden dabei *in vitro* Kolonien, die nach Anfärben makroskopisch sichtbar sind. Durch Strahlenschäden nimmt diese Teilungsfähigkeit ab und es kommt zum reproduktiven Zelltod der betroffenen Zellen [Hall, 1994].

In der vorliegenden Arbeit wurde das klonogene Überleben nach Bestrahlung mit Hilfe des Koloniebildungstests von Puck und Marcus (1955) bestimmt, d.h. als „überlebend“ wurden alle Zellen gezählt, die in 14 Tagen Kolonien mit mindestens 50 Einzelzellen bilden konnten. Die Koloniebildungsfähigkeit unbestrahlter Zellen bezeichnet man als „plating efficiency (PE)“. Die PE berechnet sich nach:

$$\mathbf{PE} = N_K/N_0 \quad (3.2)$$

Wobei N_K die Anzahl der Kolonien und N_0 die Anzahl der eingesäten Zellen darstellt.

Das Zellüberleben S ergibt sich aus dem Verhältnis der PEs der bestrahlten und der unbestrahlten Zellen und wird wie folgt berechnet:

$$\mathbf{S} = \mathbf{PE}_D/\mathbf{PE}_K \quad (3.3)$$

- S : Überleben
- PE_K : PE der unbestrahlten Zellen (Kontrolle)
- PE_D : PE der bestrahlten Zellen

Die Auftragung der Mittelwerte des Überlebens erfolgte logarithmisch gegen die Dosis (linear). Zur Bestimmung der PE der Kontrolle wurden die Meßpunkte für alle Dosen berücksichtigt und der y-Achsen-Abschnitt der Dosis-Effekt-Kurve bestimmt, an Hand dessen schließlich die Kurven normiert wurden.

Die Dosis-Effekt-Kurven können durch die folgende linear-quadratische Beziehung hinreichend genau beschrieben werden:

$$\mathbf{S} = \mathbf{S}_0 \times e^{-(\alpha\mathbf{D} + \beta\mathbf{D}^2)} \quad \ln \frac{\mathbf{S}}{\mathbf{S}_0} = -(\alpha\mathbf{D} + \beta\mathbf{D}^2) \quad (3.4)$$

- S : Überleben
- D : Dosis [Gy]
- α : linearer Anteil der Kurve
- β : exponentieller Anteil der Kurve

Mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate wurden an die Meßdaten Polynome 2. Grades angepaßt und die Parameter α und β berechnet. Als weiteres Kriterium zum Vergleich verschiedener Überlebenskurven wurde auch die „surviving fraction at 2 Gy (SF_2)“ bestimmt. Um die Effektivität von Teilchenstrahlung

zu beschreiben, existiert ein weiterer Parameter, der aus der Auftragung des Logarithmus des klonogenen Überlebens S über der Fluenz F bestimmt wird. Dieser Parameter wird als Inaktivierungsquerschnitt σ bezeichnet und nach der folgenden Formel berechnet.

$$S = S_0 \times e^{-\sigma F} \quad \ln \frac{S}{S_0} = -\sigma F \quad (3.5)$$

Zunächst wurde an unbestrahlten Proben die Koloniebildungsfähigkeit (plating efficiency PE) bestimmt. Dazu wurden in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm^2 4 - 8 Zellen/ cm^2 in Medium mit 20 % FCS ausgesät. Die Aussaat erfolgte mit einer automatischen Pipetierhilfe (Hamilton) und es wurden jeweils drei parallele Proben angesetzt. Nach einer Woche wurde das Medium gewechselt und eine weitere Woche später durch Absaugen entfernt, sowie die Zellen mit Methylenblau-Lösung 45 min lang gleichzeitig fixiert und gefärbt. Die Flaschen wurden mit entionisiertem Wasser nachgespült und luftgetrocknet. Eine Zelle wurde als überlebend gezählt, wenn sie mehr als 50 Nachkommen und damit eine Kolonie gebildet hatte.

Zur Messung des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung wurden die Zellen wie unter 3.3.2 beschrieben vorbereitet, bestrahlt und sofort aufgearbeitet (initial damage ID). Um etwa 100 Kolonien je Flasche auswerten zu können, wurde die auszusäende Zellzahl aus der Koloniebildungsfähigkeit der unbestrahlten Proben und dem aus Vorexperimenten bekannten Einfluß der Bestrahlung abgeschätzt. Um die Erholungsfähigkeit der Zellen nach Bestrahlung zu untersuchen, wurden Zellen nicht nur wie oben beschrieben direkt nach Bestrahlung, sondern auch nach Erholungszeiten von bis zu 24 h ausgesät. Während der Erholung wurden die konfluenten Zellen in konditioniertem („verbrauchtem“) Medium bei 37°C kultiviert. In der Literatur wird dies als „liquid holding recovery“ bezeichnet. Der Anteil des initialen Schadens, der nach 24 h nicht mehr detektierbar ist, wird als potentiell letaler Schaden (potential lethal damage PDL) bezeichnet, der Restschaden entsprechend als letaler Schaden (lethal damage LD).

3.4.4 S-Phasen-Markierung

Zellzyklusverzögerungen nach Bestrahlung sind häufig beobachtet worden und sollten bei verschiedenen Untersuchungen wie z.B. der Chromosomenanalyse berücksichtigt werden [Lloyd et al., 1977, Ritter et al., 1992, Boei et al., 1996, Ritter et al., 1996, Scholz et al., 1998]. Eine Methode, diese Verzögerungen zu untersuchen, ist die Markierung der Zellen in S-Phase. Bietet man Zellen im Medium das Thymidin-Analogon BrdU an, so wird dieses während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Das eingebaute BrdU kann mit Hilfe von markierten Anti-BrdU-Antikörpern auf Einzelzell-Ebene nachgewiesen werden. Der

Anteil an Zellen, die die S-Phase erreicht oder durchlaufen haben, kann somit bestimmt werden. Im Umkehrschluß kann aus dem Vergleich von unbestrahlten und bestrahlten Zellen der Anteil an Zellen bestimmt werden, die durch die Bestrahlung eine Zellzyklusverzögerung erfahren haben.

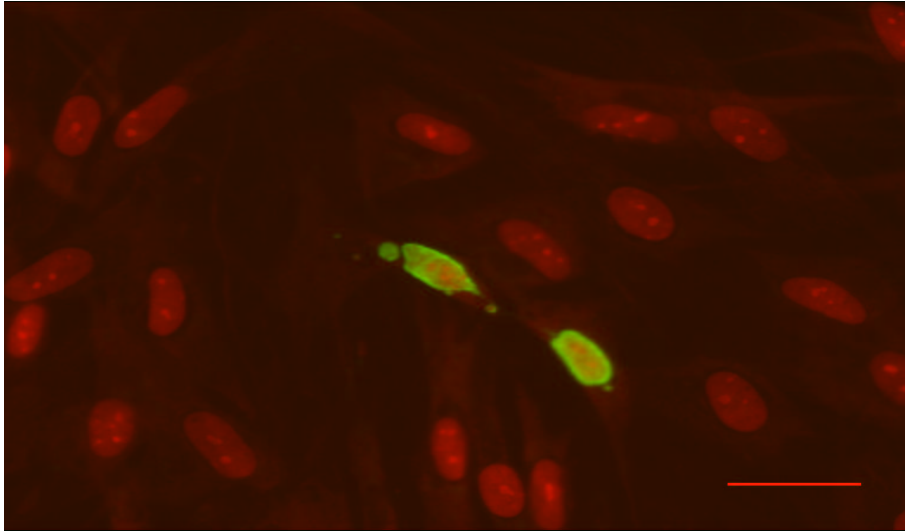


Abbildung 3.1: In S-Phase durch BrdU markierte Zellkerne (grün : FITC) und nicht markierte Zellkerne (rot : Propidium Iodid PI). Zusätzlich sind Mikrokerne zu erkennen, die in Abschnitt 3.4.8 näher beschrieben werden (Vergrößerung $250\times$, Balken = $0,05\text{mm}$). Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera und dem Bildverarbeitungsprogramm ISIS.

Für die Markierungsversuche wurden nach Bestrahlung jeweils 1×10^5 Zellen in 35 mm Petrischalen in Medium mit 10 % FCS und $10\ \mu\text{mol/l}$ BrdU ausgesät und zu unterschiedlichen Zeiten Proben untersucht (bis zu 150 h). Nach einer sauren Fixierung (Ethanol/Glycin, 20 min, -20°C) der adhärennten Zellen wurde eingebautes BrdU mit Hilfe eines Anti-BrdU-Antikörpers (Maus) detektiert und durch einen Fluorescein-markierten Anti-Maus-Antikörper angefärbt. Die Inkubationszeit betrug bei beiden Antikörpern 60 min bei 37°C , zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils dreimal mit PBS mit einem Zusatz von 0,02 % Tween 20 gewaschen. Die Zellkerne wurden mit DAPI ($1\ \text{ng/ml}$ PBS, 3 min) gegengefärbt und die Präparate in Antifade eingedeckt. Zum Teil wurden Proben zur besseren Darstellung des Cytoplasmas mit Propidium Iodid (PI) in Antifade gleichzeitig gegengefärbt und eingedeckt. Die Antikörper stammen aus einem käuflichen Testkit (BrdU Labeling and Detektion Kit I, Boehringer Mannheim), dessen Protokoll übernommen wurde. Da BrdU photosensibilisierend auf Zellen wirkt [Ikushima und Wolff, 1974], wurde unter Lichtausschluß gearbeitet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop (Leitz Aristoplan) bei einer Vergrößerung von $250\times$. Auf Grund der Gegenfärbung mit DAPI erscheinen

alle Zellkerne blau. Kerne, die BrdU enthalten, erscheinen im Mikroskop zusätzlich auch grün (Fluorescein). In Abbildung 3.1 sind markierte und nicht-markierte Zellen im Fluoreszenzbild dargestellt. Die Gegenfärbung erfolgte in diesem Fall mit PI, weshalb die nicht-markierten Zellkerne rot erscheinen. Markierte Zellkerne sind sowohl rot als auch grün gefärbt. Für die Bestimmung des Anteils markierter Zellen wurden je Meßpunkt 2000 Zellen ausgewertet.

3.4.5 Durchflußzytometrische Zellzyklus-Messungen

Im Verlauf des Zellzyklus verdoppelt eine Zelle ihren DNA-Gehalt und so ist es möglich, aus dem DNA-Gehalt auf die Zellzyklusphase der Zelle zu schließen. Der DNA-Gehalt einzelner Zellen kann nach stöchiometrischer Anfärbung durch Hoechst-Farbstoff mit Hilfe eines Durchflußzytometers gemessen werden. Im Gegensatz zur S-Phasen Markierung können so die einzelnen Zellzyklus-Phasen unterschieden und eine weit aus größere Anzahl Zellen untersucht werden.

Im Verlauf der Arbeit wurden zwei verschiedene Meßmethoden verwendet. Die eindimensionale Messung, bei der die Häufigkeit über dem DNA-Gehalt aufgetragen wird, erlaubt die Unterscheidung der Zellzyklusphasen G1, S und G2/M (Abbildung 3.2). Mit Hilfe der zweidimensionalen Messung können unter Verwendung von BrdU die G1 und G2-Phasen der einzelnen Replikationsrunden bestimmt werden. Hierbei wird die Häufigkeit über einer x-y-Ebene mit zwei verschiedenen Farbstoffen wie z.B. Hoechst gegen Ethidiumbromid als Achsen aufgetragen (Abbildung 3.3). Eine Auflösung der S-Phase ist dabei jedoch nicht mehr möglich.

Für die eindimensionale Messung zur Bestimmung der Verteilung der Zellzyklus-Phasen wurden die Zellen wie für die Messung der Wachstumskinetik (siehe 3.4.2) eingesät und in regelmäßigen Abständen für die Messung vorbereitet. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und sorgfältig vereinzelt. Anschließend wurde bei 800 Upm 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das wieder gelöste Pellet in 1,5 ml Hoechst-Farbstofflösung aufgenommen. Dabei wurden die Zellen gleichzeitig fixiert und gefärbt. Die Proben von mindestens 10^5 Zellen wurden bis zur Messung maximal 1 Woche im Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Die Messungen wurden an einem Partec PAS II Durchflußzytometer durchgeführt, wobei das Absorptionsmaximum des DNA-gebundenen Farbstoffes bei 395 nm liegt, das Emissionsmaximum bei 450 nm. Die Verteilung wurde mit Hilfe eines Multicycle-Programms (Partec) berechnet. Zwei typische Spektren eindimensionaler Messungen einer Kontrollpopulation 0 h und 32 h nach Lösen der Kontaktinhibition sind in Abbildung 3.2 gezeigt. Eine genaue Beschreibung des verwendeten Versuchsaufbaus und des Meßprinzips sind bei Scholz (1992) und Kirchner (1996) ausgeführt.

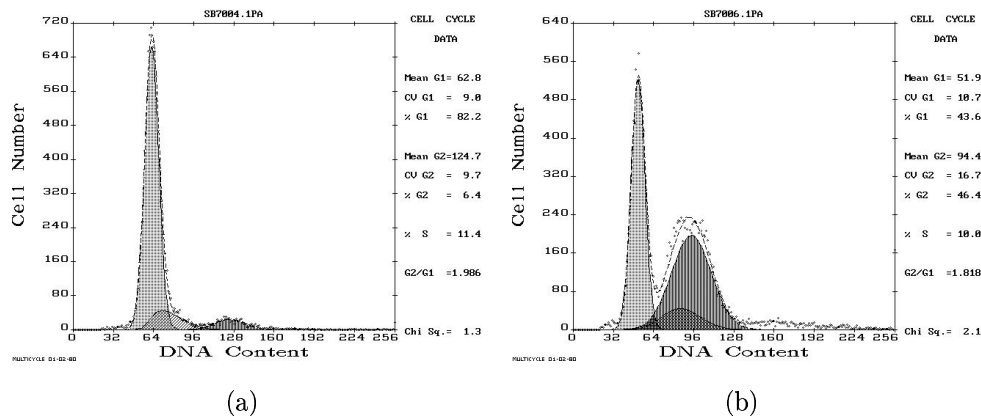


Abbildung 3.2: Spektrum einer eindimensionalen Messung. Häufigkeitsverteilung des DNA-Gehaltes („DNA-Content“) unbestrahlter AG-Zellen im Durchflußzytometer nach Anfärben mit Hoechst 33258. a) Kontaktinhibierte Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung, 82 % der Zellen befinden sich in G1-Phase, 11 % in S-Phase und 6 % in G2-Phase. b) Zellen 32 h nach Lösen der Kontaktinhibition, nur noch 44 % der Zellen befinden sich in G1-Phase, 46 % in S-Phase und 10 % in G2-Phase.

Für die zweidimensionale Messung wurden Plateauphasezellen wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben vorbereitet. Das Medium enthielt dabei $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU. In regelmäßigen Abständen wurden mindestens 10^5 Zellen im Dunkeln für die Durchflußzytometer-Analyse aufgearbeitet (Abschnitt 3.4.4), wobei die Hoechst-Färbelösung zusätzlich Ethidiumbromid enthielt. Die Unterscheidung der einzelnen Replikationsrunden basiert darauf, daß mit jeder Zellteilung in BrdU-haltigem Medium der Anteil an BrdU in der DNA der Zellen zunimmt, während die Anfärbbarkeit mit Hoechst-Farbstoff parallel dazu abnimmt. Diesen Effekt bezeichnet man als BrdU-Hoechst-Quenching. Zellen, die sich im Zellzyklus nach der 1. S-Phase befinden, erscheinen im durchflußzytometrischen Spektrum nach links verschoben. Von dem Einbau von BrdU unbeeinflusst zeigt sich die Anfärbbarkeit mit Ethidiumbromid, die es damit erlaubt, zwischen den Zyklusphasen in den einzelnen Replikationsrunden zu unterscheiden. Die Fluoreszenzsignale für Hoechst 33258 und Ethidiumbromid wurden am Partec PAS II Durchflußzytometer gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem mutiple document interface (WinMDI, ein frei zugängliches Auswertungsprogramm für durchflußzytometrische Messungen), die Festlegung der zu integrierenden Flächen erfolgte dabei von Hand. Zwei typische Spektren zweidimensionaler Messungen einer Kontrollpopulation 7 h und 42 h nach Lösen der Kontaktinhibition sind in Abbildung 3.3 gezeigt.

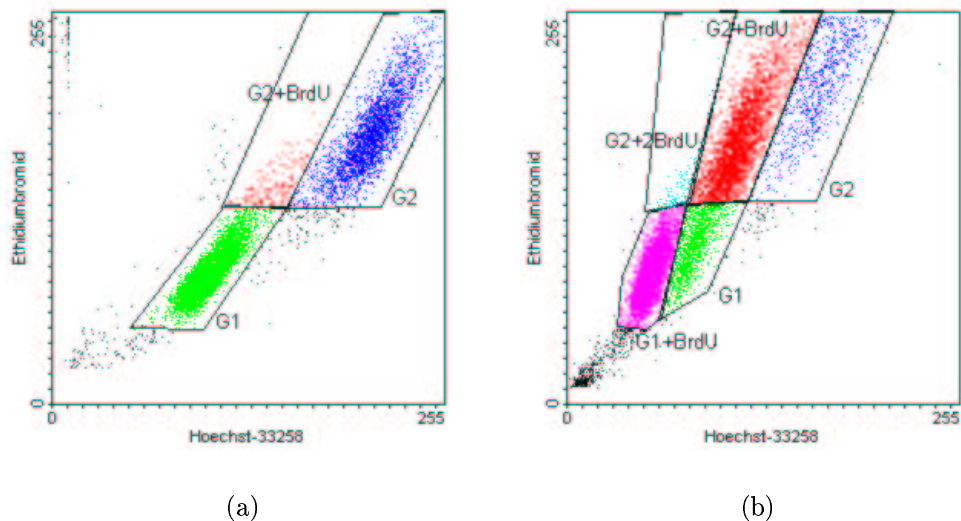


Abbildung 3.3: Spektrum einer zweidimensionalen Messung des DNA-Gehaltes unbestrahlter AG-Zellen im Durchflußzytometer nach Anfärben mit Hoechst 33258 und Ethidiumbromid. a) Zellen 7 h nach Lösen der Kontaktinhibition. Die Meßsignale liegen auf einer diagonalen Linie, die Zellen der G1-Phase liegen tiefer, die Zellen der G2-Phase höher, wenige Zellen haben bereits BrdU eingebaut. b) Zellen 42 h nach Lösen der Kontaktinhibition. Durch den BrdU-Einbau finden sich die Zellen der G1- und G2-Phase des zweiten Zellzyklus nach links verschoben, die Positionen in Y-Richtung werden dadurch nur wenig verändert.

3.4.6 Laktat-Dehydrogenase-Messung (LDH)

Eine wichtige Frage in der biologischen Strahlenforschung ist, ob Zellen nach Bestrahlung sterben. Eine Methode, tote Zellen nachzuweisen, ist der Nachweis von Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Zellkultur-Überstand. Eine Zelle mit intakter Zellmembran gibt kein LDH ab, während bei Verlust der Membranintegrität große Mengen davon frei werden. Aus den erhaltenen Meßwerten läßt sich der relative Anteil toter Zellen an der Gesamtpopulation bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die LDH mit Hilfe des „Cytotoxicity Detection Kit (LDH)“ (Boehringer, Mannheim) bestimmt. Für die Messung im „enzyme-linked-immuno-absorbance-assay“ (ELISA) wurden die Zellen in einer Dichte von 2500 und 5000 Zellen/Vertiefung in die 96 Vertiefungen („Wells“) von Mikrotiter-Platten ausgesät. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen 4 h vor der Bestrahlung ausgesät, um den Zellen ausreichend Zeit zur Anheftung zu geben, oder bestrahlt, und direkt oder nach 24 h Erholungszeit ausgesät (siehe Abschnitt 3.4.3), um eine Selektion der untersuchten Zellen durch die Aussaatbedingungen auszuschließen. Es wurde für die Aussaat und die Bestrahlung Medium mit 10 % FCS verwendet. Die Zellen wurden anschließend in dem gleichen Medium für

3 Tage kultiviert und der LDH-Gehalt des Zellkulturüberstandes alle 8 h untersucht. Da FCS LDH enthält und in höherer Konzentration den Test stört, wurde in den entsprechenden Proben 8 h vor der Messung das Medium gegen Testmedium mit nur 1 % FCS ausgetauscht. Das entnommene Medium wurde in einer zweiten Mikrotiterplatte mit der Reaktionslösung zur Reaktion gebracht. Enthaltene LDH wurde dabei zu einem rot gefärbten Reaktionsprodukt (Formazan) umgesetzt, das photometrisch bestimmt wurde. Die Messung erfolgte durch einen ELISA-Reader (Bio Tek) bei der Wellenlänge 490 nm, wobei zusätzlich eine Referenzmessung bei 630 nm durchgeführt wurde, um auftretende Verunreinigungen aus der Messung zu eliminieren. Die Differenz der beiden Messungen stellte den eigentlichen Messwert dar. Gleichzeitig mit den Proben wurden Positivkontrollen (Zusatz von 1 % Triton-X zum Zellkulturmedium zur Zerstörung der Zellwände), Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) und reines Testmedium gemessen. Alle Proben wurden in drei parallelen Wells untersucht.

3.4.7 Bestimmung des Differenzierungsmusters

Menschliche Fibroblasten zeigen *in vitro* eine begrenzte Teilungsfähigkeit, wobei teilungsfähige Fibroblastenzellen später in nicht mehr teilungsfähige Stadien übergehen. In Anlehnung an die Verhältnisse *in vivo* lassen sich Fibroblasten nach morphologischen und biochemischen Merkmale unterteilen. In Abbildung 3.4 sind die verschiedenen morphologischen Stadien I-VI dargestellt. Teilungsfähige Fibroblasten werden als potentiell mitotisch aktive Fibroblasten MF der Stadien I, II und III bezeichnet, nicht mehr teilungsfähige Fibroblasten, sogenannte Fibrozyten, dagegen als postmitotische Fibroblasten PMF der Stadien IV, V und VI [Bayreuter et al., 1988a,b].

Zur Untersuchung der Differenzierungsstadien wurden die Zellen bestrahlt und wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben behandelt, wobei 300 - 500 Zellen in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² ausgesät wurden. Zusätzlich wurden unbestrahlte Zellen in gleicher Dichte ausgesät und 3 h später mit BrdU behandelt, um einen Einfluß auf die Anheftung der Zellen zu überprüfen. Nach 11 - 13 Tagen wurden die Zellen mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS für 45 min fixiert. Die Färbung der Zellen erfolgte durch Überschichten mit May-Grünwald-Lösung für 5 min und Zugabe des gleichen Volumens Wasser für weitere 5 min. Nach Spülen mit Wasser wurde 15 min mit 4 %iger Giemsa-Lösung in Sörensenpuffer gefärbt (32 ml KH₂PO₄ und 61 ml Na₂HPO₄), mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Dann wurde mit Coomassie-Lösung überschichtet, nach 40 sec mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und im Anschluß vorsichtig gewaschen. Die luftgetrockneten Flaschen wurden mit Hilfe eines Binokulars (Vergrößerung 10 - 40×) ausgewertet. Die Auswertung erfolgte an Hand morphologischer Kriterien wie Größe und Gestalt der Zellen in Anlehnung an Bayreuther et al. (1988a) und Fournier (1999).

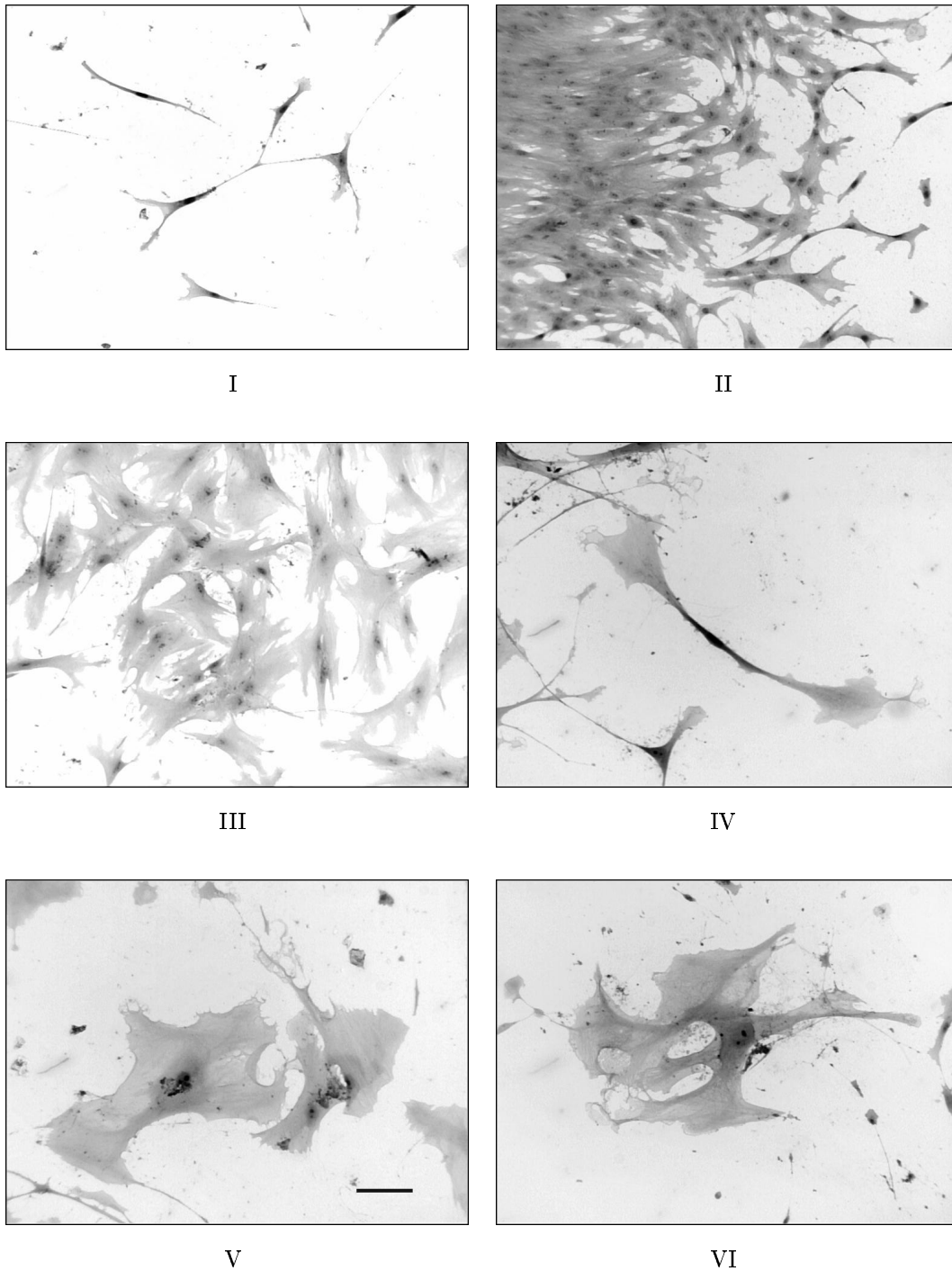


Abbildung 3.4: Morphologische Veränderungen von menschlichen Hautfibroblasten im Verlauf der Differenzierung. Dargestellt sind die verschiedenen Stadien mitotisch aktiver (I-III) und postmitotischer (IV-VI) Fibroblasten. Die Färbung erfolgte wie unter 3.4.7 beschrieben (Vergrößerung jeweils 100 \times , Balken = 0,1mm).

3.4.8 Mikrokern-Nachweis

Die Entstehung von Mikrokernen geht auf genetisches Material zurück, das bei der Teilung eines Zellkerns in seine zwei Tochterkerne nicht in einen der Kerne integriert und von der Zelle als Satellitenkern eingeschlossen wird. Um sicherzustellen, daß ein beobachteter Mikrokern erst nach der Bestrahlung aufgetreten ist, wird häufig Cytochalasin B verwendet [Fenech, 1993, Guo et al., 1998], das die Teilung des Cytoplasmas unterbindet. Da jedoch bei Verwendung von G_1 -Zellen eine Zelle die Mitose und damit auch die S-Phase durchlaufen muß, um einen Mikrokern ausbilden zu können, kann die S-Phasen-Markierung mit BrdU die Verwendung des für menschliche Zellen toxischen Cytochalasin B [Abend et al., 1995] ersetzen. Alle BrdU-markierten Mikrokerne müssen nach Zugabe des BrdU und damit auch nach Bestrahlung entstanden sein (siehe 3.4.4). Da nicht alle markierten Zellen auch die Mitose erreichen, muß die untersuchte Population mit Hilfe des integrierten Mitoseindex (Abschnitt 4.17) daraufhin korrigiert werden (Abschnitt 4.2.5).

Die Zellen wurden bestrahlt und wie in 3.4.4 beschrieben behandelt. Die Auswertung erfolgte nach den von Fenech (1993) und Abend (1995) beschriebenen Kriterien zur Unterscheidung von Mikrokernen. Danach wurden nur Mikrokerne gezählt, die ihren Mutterkernen morphologisch gleich waren und einen Durchmesser von 1/16 bis 1/3 des Mutterkerns aufwiesen. Die Mikrokerne durften nicht fragmentiert oder mit dem Mutterkern verbunden sein. Nur grün- (BrdU-markierte) und gleichzeitig auch blau-gefärbte (DAPI) Zell- und Mikrokerne wurden gezählt. Je Meßpunkt wurden 2000 Zellen ausgewertet. In Abbildung 3.1 sind mit BrdU markierte Zellen mit Mikrokernen im Fluoreszenzbild dargestellt.

3.4.9 Chromosomenanalyse

Um das Ausmaß strahlungsbedingter Chromosomenschäden trotz ausgeprägter Zellzyklus-Verzögerungen erfassen zu können, wurden bis zu 100 h nach Bestrahlung Chromosomenpräparate angefertigt, wobei der gesamte Zeitverlauf lückenlos abgedeckt wurde. Meßzeiten dieser Dauer machen es notwendig, zwischen 1., 2. und späteren Mitosen zu unterscheiden, da in der 1. Mitose nach Bestrahlung die Aberrationsrate maximal ist. Mit jeder weiteren Teilung nimmt die Anzahl an Aberrationen ab, und immer weniger Zellen erreichen die folgenden Mitosen. Zur Unterscheidung der Replikationsrunden wurde die differentielle Färbung nach Perry und Wolff (1974) verwendet. Diese Methode basiert auf einem veränderten Färbeverhalten von DNA, in die BrdU eingebaut wurde. Wird Zellen während der S-Phase BrdU angeboten, so wird jeweils der neu synthetisierte DNA-Strang der beiden Chromatiden mit BrdU substituiert. Findet in einem weiteren Zyklus ein BrdU-Einbau statt, so ist eine der beiden Chromatiden wiederum zur Hälfte, die andere vollständig substituiert. Werden die mit BrdU behandelten Zellen nach

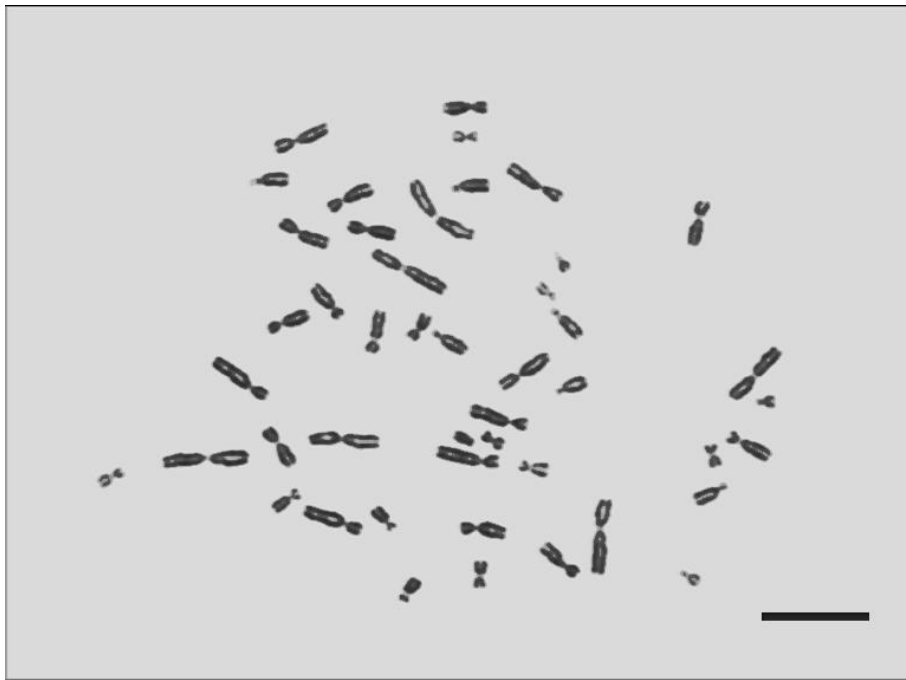
der Fluoreszenz-plus-Giemsa-Methode (FpG) gefärbt [Perry und Wolff, 1974], so erscheinen die vollständig substituierten Chromatiden hierbei hell, während die zur Hälfte substituierten Chromatiden dunkel erscheinen. Dieser Unterschied ermöglicht eine Zuordnung zum ersten, zweiten und dritten Zellzyklus nach Bestrahlung (Abbildung 3.5). Da BrdU als mutagenes Agens unter Lichteinwirkung zu Chromatinbrüchen [Ikushima und Wolff, 1974] führt, wurde unter Lichtausschluß gearbeitet. Die Wirkung von BrdU auf die verwendeten Fibroblasten wird in Abschnitt 5.3 ausführlich diskutiert.

3.4.9.1 Chromosomen-Präparation

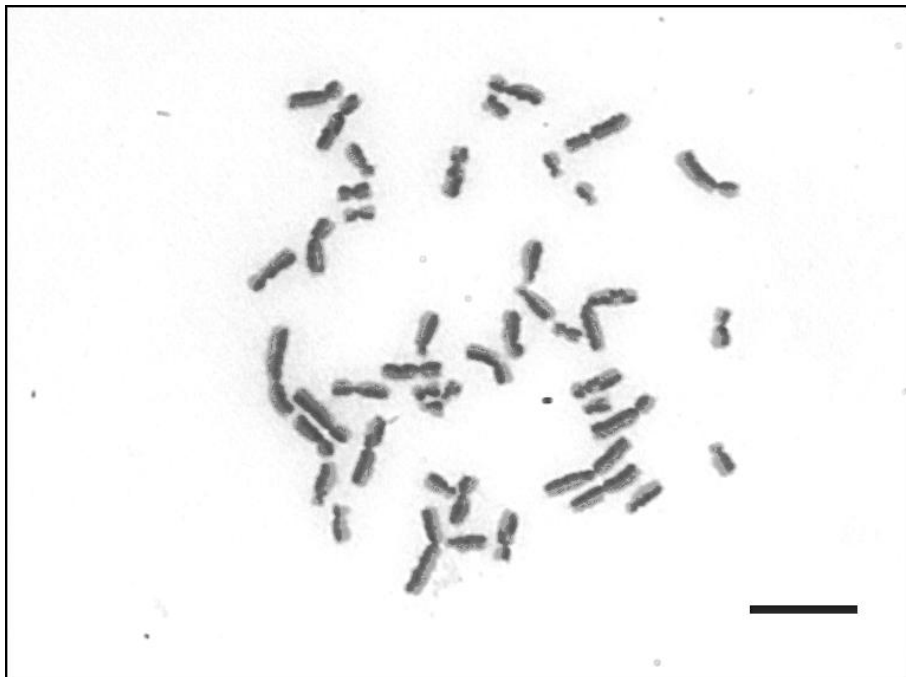
Unmittelbar nach Bestrahlung wurden die Zellen subkultiviert und in Medium mit 10 % FCS und 10 $\mu\text{mol/l}$ BrdU in einer Dichte von $3 - 5 \times 10^5$ Zellen in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm^2 ausgesät. Um die Anzahl der Metaphasen im Präparat zu erhöhen, wurde dem Medium 4 h vor Aufarbeitung 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Colcemid zugesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (zwischen 28 h und 100 h) wurden in 4 h-Intervallen Chromosomenpräparate unter Lichtausschluß angefertigt. Hierzu wurde das Kulturmedium und das zum Spülen der Kulturflaschen verwendete Trypsin in Zentrifugenröhrchen gefüllt, die Zellen trypsiniert, vereinzelt und zusammen mit dem Medium zentrifugiert (800 Upm, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Klopfen gelöst. Tropfenweise wurden 10 ml warme KCl-Lösung (0,075 M) zugegeben. Nach 10 min wurde die Probe wiederum zentrifugiert (800 Upm, 10 min), der Überstand verworfen, das Pellet gelöst und tropfenweise mit 10 ml Fixativ (1 Teil Eisessig + 3 Teile Methanol abs.) versetzt. Nach 30 min Wartezeit wurde erneut zentrifugiert (1000 Upm, 8 min) und nach Verwerfen des Überstandes das Pellet erneut mit Fixativ versetzt. Nach Abzentrifugieren des Fixativs wurden die Zellen auf nasse Objektträger getropft und getrocknet. Konnten die Zellen nicht gleich aufgetropft werden, so wurden sie in Fixativ bei $+4^\circ\text{C}$ aufbewahrt, eine längerfristige Lagerung erfolgte bei -20°C .

3.4.9.2 Färbung und Auswertung der Präparate

Die Färbung der Zellen erfolgte innerhalb einer Woche nach Auftropfen auf Objektträger. Zellen, die nicht mit BrdU behandelt worden waren, wurden etwa 8 min in einer 10 %igen Giemsa-Lösung in Sörensenpuffer gefärbt, in entionisiertem Wasser gewaschen und die getrockneten Objektträger am folgenden Tag mit Eukitt eingedeckt. Die BrdU-behandelten Zellen wurden mit Hoechst Nr.33258 (2,5 $\mu\text{g/ml}$) 1 h gefärbt, mit UV-Licht (360 nm) 1 h in Bestrahlungspuffer behandelt und in $2 \times \text{SSC}$ (60°C) 1 h gewaschen. Anschließend wurde wie oben mit Giemsa gefärbt und gewaschen. Die mit Eukitt eingedeckten Proben wurden



(a)



(b)

Abbildung 3.5: Metaphasenpräparate von AG-Zellen: in der 1. Mitose (oben) und in der 2. Mitose nach Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU zum Kulturmedium (unten). Vollständig substituierten Chromatiden erscheinen hell, während nur zur Hälfte substituierte Chromatide dunkel erscheinen. Ein Austausch zwischen der hellen und der dunklen Chromatide wird als SCE bezeichnet (siehe Abschnitt 3.4.10) Vergrößerung $1000\times$, Balken = $0,01\text{mm}$.

unter dem Durchlichtmikroskop (Leitz, Aristoplan) bei einer Vergrößerung von $1000\times$ ausgewertet. Je Zeitpunkt und Dosis wurden so weit möglich 100 Metaphasen im ersten Zellzyklus nach Bestrahlung untersucht, die mindestens 44 Chromosomen aufwiesen.

Die Aberrationen wurden in Anlehnung an Savage (1975) klassifiziert. Dabei wurden diverse Schadensarten unterschieden, die in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt sind. In Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G_1 -Phase befinden, werden Schäden während der S-Phase zu Chromosomen-Typ-Aberrationen dupliziert. Zusätzlich dazu entstehen in der S- und G_2 -Phase noch Chromatidschäden, die eine Veränderung in nur einer der beiden Chromatiden beschreiben. Nach Bestrahlung in der G_1 -Phase treten Chromatidschäden selten auf [Nagasawa et al., 1985, Bender et al., 1988, Wolff, 1991].

Grundsätzlich können bei den Chromosomen-Typ-Aberrationen zentrische und azentrische Figuren unterschieden werden, wobei letztere kein Zentromer enthalten. **Dizentrische Chromosomen (dic)**, wie sie in Abbildung 3.6 und 3.7(a) gezeigt sind, enthalten zwei Zentromere und entstehen durch die Verknüpfung von zwei Chromosomen, wobei zusätzlich ein azentrisches Fragment entsteht. In der vorliegenden Arbeit wurden dizentrische Chromosomen mit einem begleitenden azentrischen Fragment als eine Aberration gewertet. Trizentrische Chromosomen mit zwei begleitenden azentrischen Fragmenten wurden wie zwei dizentrische Chromosomen behandelt, polyzentrische Chromosomen entsprechend wie mehrere dizentrische Chromosomen.

Als **zentrische Ringe (r)** bezeichnet man Ringe, die ein Zentromer enthalten. Sie entstehen durch die Verbindung von zwei „offenen“ Enden in den beiden Armen des gleichen Chromosoms und werden von einem azentrischen Fragment begleitet (siehe Abbildung 3.6 und 3.7(b)). Ring und Fragment werden gemeinsam als eine Aberration gewertet.

Die häufigste Form des azentrischen Bruchstückes ist das **Chromosomenfragment (csb)**, das aus zwei parallelen Chromatiden ohne Zentromer besteht (Abbildung 3.6).

Azentrische Ringe (ar) entstehen analog zu den zentrischen Ringen durch die Verbindung von zwei „offenen“ Enden eines Bruchstückes des gleichen Armes. Eine Untergruppe stellen die kleinen runden „interstitial deletions“ (idel) dar, die ebenfalls ausgewertet, jedoch in den Tabellen des Anhang C mit den azentrischen Ringen zusammengefaßt wurden.

Unter die **Chromatidbrüche (ctb)** fallen nach Savage (1975) nur solche Brüche, bei denen eine Chromatide gebrochen und die andere deutlich abgewinkelt ist (Abbildung 3.6). In der vorliegenden Arbeit wurden auch solche Brüche erfaßt, bei denen kein Winkel vorlag. Bedingung war hierbei jedoch, daß die Breite der Lücke größer als die Breite einer Chromatide war. Schmalere Lücken können auch durch die wechselnde Anfärbbarkeit der DNA zustande kommen (achromatische Läsion) und wurden daher nicht berücksichtigt.

In seltenen Fällen konnten weitere Aberrationen beobachtet werden. Beim „**chromatid type exchange**“ (cte) werden zwei Chromatidbrüche oder ein Chromatid- und ein Chromosomenbruch miteinander verbunden (Abbildung 3.7(a)). Außerdem können im FpG-gefärbten Chromosomenpräparat perizentrische Inversionen erkannt werden (Abbildung 3.6), da das resultierende Chromosom auf einer Seite überlange Arme besitzt, deutlich länger als die Arme der Chromosomen 1 und 2. Perizentrische Inversionen sowie andere seltene Aberrationstypen wurden in den Tabellen unter **cte** zusammengefaßt.

Die Auswertung der einzelnen Aberrationsarten ist in den Tabellen des Anhang C dargestellt.

Es wurde für jede Dosis und jeden Zeitpunkt die Aberrationsrate sowie der Anteil aberranter Metaphasen ermittelt. Zusätzlich wurde der Mitoseindex (MI) bestimmt, worunter man den prozentualen Anteil an Zellen versteht, die sich zum jeweiligen Zeitpunkt in Mitose befinden. Auch die Anteile der Metaphasen im 1., 2. und 3. Zyklus nach Bestrahlung wurden erfaßt.







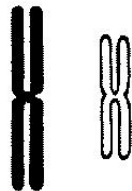
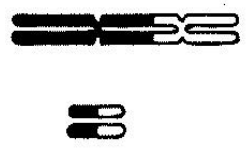
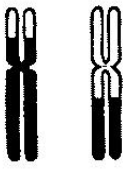
INTRA-CHROMOSOMAL	NORMAL	CHROMATID BRUCH ctb	CHROMOSOMEN FRAGMENT csb	A-ZENTRISCHER RING ar	ZENTRISCHER RING MIT FRAGMENT r	PERI-ZENTRISCHE INVERSION
						
INTER-CHROMOSOMAL	NORMAL		DIZENTRISCHES UND FRAGMENT dic		REZIPROKER AUSTAUSCH (nicht sichtbar)	
						

Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der in Metaphase-Präparaten beobachteten Aberrations-Typen und der verwendeten Kürzel in Anlehnung an Evans et al. (1974). Der reziproke Austausch ist nach Giemsa-Färbung nicht sichtbar und wurde nur der Vollständigkeit halber dargestellt.

3.4.9.3 Analyse der Daten

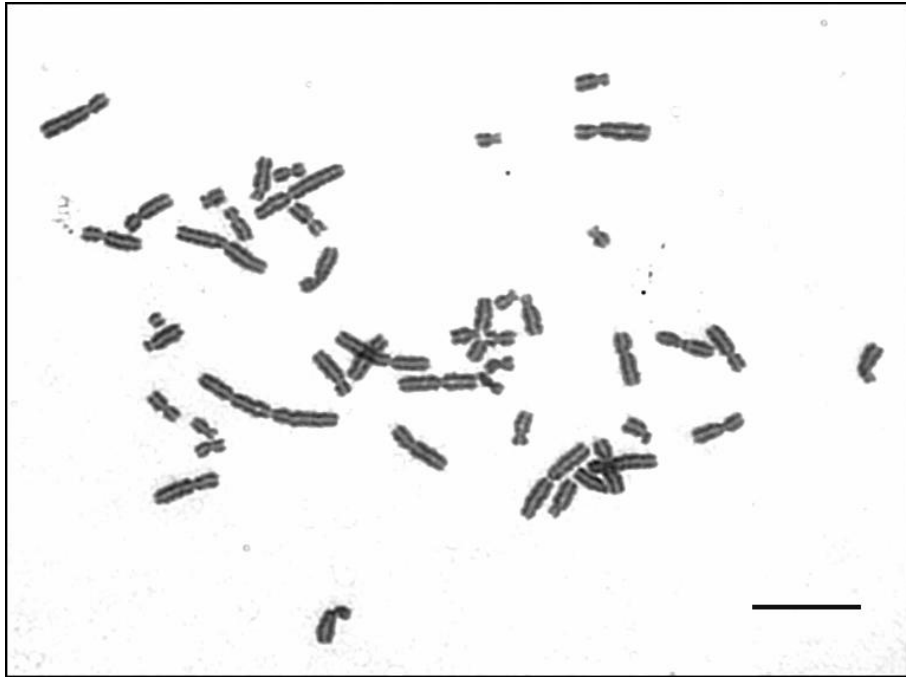
Um den Schaden in der Gesamtpopulation zu beurteilen und um Daten aus verschiedenen Experimenten miteinander vergleichen zu können, wurde eine Analyse der Daten nach Scholz et al. (1998) durchgeführt. Ausgangspunkt dieser Analyse ist das Proliferationsverhalten der untersuchten Population. Hierfür wurden der Mitoseindex und die Anteile der Zellen in der 1., 2. und 3. Mitose nach Bestrahlung benötigt. Der Mitoseindex wurde korrigiert, da die Zellpopulation im Verlauf des Experimentes durch Proliferation ansteigt [Scholz et al., 1998, Ritter et al., 1996]. Aus den Daten wurde die „rekonstruierte Wachstumskurve“ berechnet und die Anteile aberranter Zellen und die Aberrationsrate wurden mit dem korrigierten Mitoseindex gewichtet. Die Integration der „gewichteten Aberrationsrate“ über die Zeit, ergibt den „Gesamtschaden“ in Abhängigkeit von der Dosis. Das heißt, die Chromosomendaten werden auf die Ausgangspopulation zum Zeitpunkt 0 h bezogen.

Außerdem erlaubt es die Methode aus der rekonstruierten Wachstumskurve die Anzahl an Zellen zu bestimmen, die die erste Mitose erreichen. Die Differenz der Summe 1. Mitosen über die Meßdauer und der Zellzahl zum Zeitpunkt 0 h gibt Auskunft darüber, wieviele Zellen vor dem Erreichen der 1. Mitose arretiert wurden.

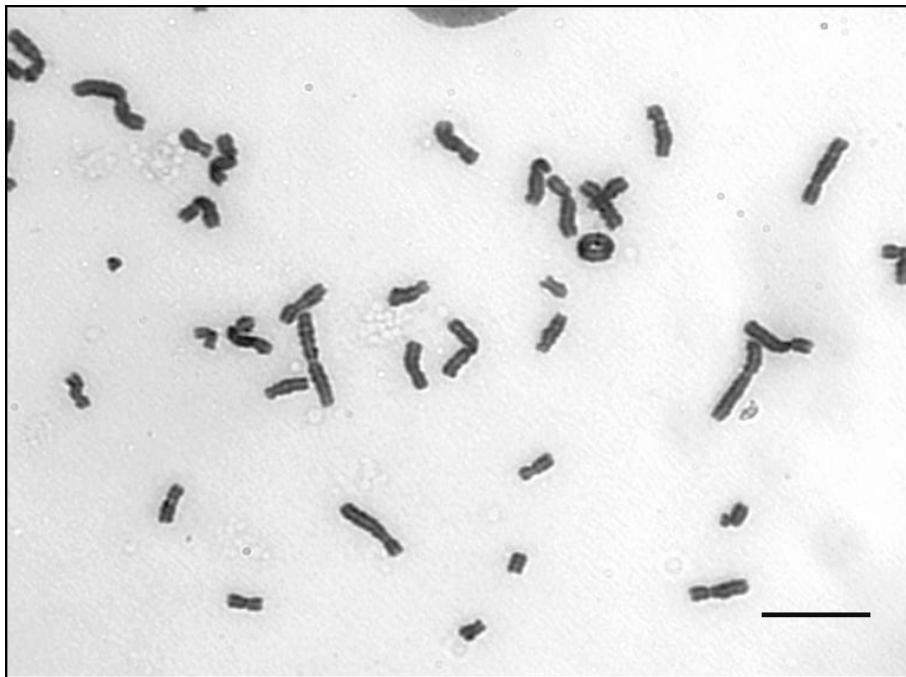
3.4.10 Schwester-Chromatiden-Austausch (SCE)

Als Schwester-Chromatiden-Austausch (SCE) bezeichnet man den in FpG-gefärbten Metaphasen des zweiten Zellzyklus nach BrdU-Zugabe sichtbaren Austausch zwischen der hellen und der dunklen Chromatide eines Chromosomes [Perry und Wolff, 1974]. Die Anzahl dieser Austausche nimmt mit zunehmendem Streß der Zelle, durch Bestrahlung oder die Einwirkung chemischer Substanzen, zu. Solche SCEs sind in Abbildung 3.5(b) in der Metaphase des 2. Zellzyklus in mehreren Chromosomen zu beobachten.

Zur Untersuchung der SCEs wurden Zellen nach dem unter 3.4.9 beschriebenen Verfahren behandelt und aufgearbeitet. Zu jedem Zeit- und Dosispunkt wurden 1000 Chromosomen (etwa 25 Metaphasen) ausgewertet und die Anzahl der SCEs pro Metaphase und pro Chromosom bestimmt. Ein Wechsel von hell nach dunkel am Zentromer wurde nicht als SCE gewertet, da dieser durch die zufällige Lage des Chromosoms als SCE erscheinen kann.



(a)



(b)

Abbildung 3.7: Aberrante Metaphasen im ersten Zellzyklus nach Bestrahlung: dizentrische Chromosomen (dic) mit begleitenden acentrischen Fragmenten und Chromatid Typ Austausch (cte)(oben). Ein Ring-Chromosom (cr) mit begleitendem acentrischen Fragment (unten). Vergrößerung 1000 \times , Balken = 0,01mm.

3.5 Einfluß von Bromdesoxyuridin (BrdU)

Um den Einfluß des für viele Zelllinien toxischen BrdU auf menschliche Fibroblasten zu untersuchen, wurden einige der unter 3.4 beschriebenen Methoden im Hinblick darauf durchgeführt. Sie werden im Folgenden kurz näher beschrieben. Bei Verwendung von BrdU verschiedener Firmen (Boehringer, Mannheim; Serva, Heidelberg) zeigte sich im Koloniebildungstest mit AG-Zellen kein Unterschied zwischen den Herstellern.

Deoxycytidin (dC) wurde in einigen Experimenten mit BrdU in äquimolarer Menge verwendet (je $10 \mu\text{mol/l}$), um wie bei Moore und Hurlbert (1966) und Bjursell und Reichard (1973) beschrieben, die negativen Einflüsse von BrdU auf Zellen zu mindern. Die Verwendung von dC wurde nicht durch alle Experimente hindurch fortgeführt, da ein positiver Einfluß von dC nicht bestätigt werden konnte.

Die Untersuchung der Wachstumskinetik (3.4.2) wurde mit 0 und $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU sowie mit BrdU und dC (jeweils $10 \mu\text{mol/l}$) durchgeführt. Die Meßdauer wurde dabei auf bis zu 160 h im Falle der AG- und NHLF-Zellen, im Falle der GMC-Zellen auf bis zu 500 h ausgedehnt. Die AG-Zell-Proben wurden im Anschluß an die Bestimmung der Zellzahl zentrifugiert und für die durchflußzytometrische Analyse fixiert (3.4.5). Im Falle der GMC-Zellen sollte genauso verfahren werden, die Qualität der erhaltenen Spektren war jedoch nicht ausreichend, weshalb auf deren Auswertung verzichtet wurde.

Die Bestimmung des klonogenen Überlebens (3.4.3) erfolgte nach Zugabe von 0, 5 und $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU zum Kulturmedium. Hierbei wurde auch BrdU in Kombination mit dC (jeweils $10 \mu\text{mol/l}$) verwendet. Das Differenzierungsmuster (3.4.7) wurde ohne und mit $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU, sowie mit BrdU und dC (jeweils $10 \mu\text{mol/l}$) an AG-Zellen auch im Hinblick auf die Einwirkdauer des BrdU und seines Einflusses auf die Anheftung der Zellen untersucht.

Im Laktat-Dehydrogenase-Test (3.4.6) wurden über 96 h die Auswirkungen verschiedener BrdU-Konzentrationen (0, 10, 20, 40, $80 \mu\text{mol/l}$) auf AG-Zellen ermittelt. Die gleichen Konzentrationen wurden auch im Hinblick auf die Induktion von SCEs in AG-Zellen untersucht (3.4.10). Auf einen Zusatz von dC wurde an dieser Stelle ganz verzichtet.

Die Aberrationsrate (3.4.9) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne Zusatz von BrdU ($10 \mu\text{mol/l}$) in bestrahlten und unbestrahlten AG-Zellen bestimmt. Es wurde kein dC verwendet.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von Zellparametern

4.1.1 Fläche des Zellkerns

Bei der Bestrahlung mit niederenergetischen Ionen ist der Spurdurchmesser kleiner als der Durchmesser des Zellkerns. Dadurch wird bei niedrigen Fluenzen die statistische Verteilung der Treffer wichtig für die Beurteilung der Ergebnisse. So ist für die Betrachtung von Chromosomendaten oder Zellzyklusmessungen wichtig, wieviele Zellkerne getroffen wurden. Bei einer mittleren Trefferzahl von 1 Treffer je Zellkern bleiben z.B. 37 % der Zellkerne ungetroffen (z.B. Brandt, 1992). Diese Zellen verhalten sich wie Kontrollzellen und beeinflussen so die erhaltenen Ergebnisse, da sie z.B. keinen strahlungsbedingten Zellzyklusarrest erfahren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kerngrößenverteilung nur für AG-Zellen bestimmt, da sie auch im überwiegenden Teil der Experimente verwendet wurden.

Zur Bestimmung der mittleren Trefferzahl werden die Fluenz der verwendeten Strahlung und die Fläche des Zellkerns benötigt. Die Messung der Kernfläche von 316 AG-Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung, d.h. in Plateauphase, ergab eine mittlere Kernfläche von $251 \pm 133 \mu m^2$. Die Verteilung innerhalb der Zellpopulation ist in Abbildung 4.1 gezeigt. Für Fluenzen von 0,5 und 2×10^6 Teilchen/cm² ergibt sich damit eine mittlere Anzahl von 1,25 und 5 Treffern je Zellkern.

Die wirkliche Verteilung der Treffer je Zellkern ergibt sich aus der Summe der Poisson-Verteilungen der Kerngrößen und der Trefferwahrscheinlichkeit (z.B. Griffin et al., 1995) und ist in Abbildung 4.2 exemplarisch für Fluenzen von 0,5, 2 und 6×10^6 Teilchen/cm² dargestellt. Beim Vergleich von Strahlung unterschiedlichen LETs muß zusätzlich berücksichtigt werden, daß bei hohem LET die gleiche Dosis von einer kleinen Anzahl Teilchen auf die Zelle übertragen wird. Eine Dosis von 1 Gy wird bei einem LET von 16 keV/ μm , wie im Fall von 200 MeV/u Koh-

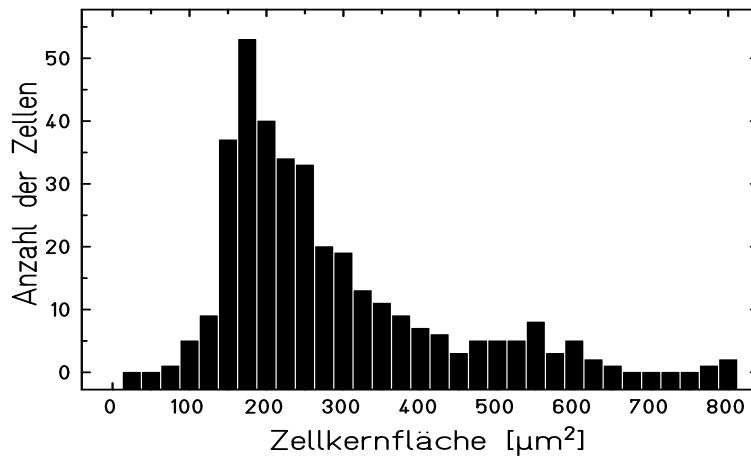


Abbildung 4.1: Zellkernflächen-Verteilung konfluenter Fibroblasten (AG-Zellen) zum Zeitpunkt der Bestrahlung

lenstoffionen, von etwa 95 Teilchen je Zellkern übertragen, bei einem LET von $153 \text{ keV}/\mu\text{m}$, wie im Fall von 11 MeV/u Kohlenstoffionen, von etwa 10 Teilchen je Zellkern und bei einem LET von $2450 \text{ keV}/\mu\text{m}$, wie im Fall von 9,9 MeV/u Nickelionen, von etwa 0,6 Teilchen je Zellkern. Statt Energie-Dosen als Strahlparameter zu verwenden ist es daher auch üblich Fluenzen zu vergleichen, denn für hohe LET-Werte ist die Trefferwahrscheinlichkeit entscheidender als die Dosis. Niedrige Dosen gibt es bei hoch-LET-Strahlung nicht, es gibt nur viele ungetroffene Zellkerne und wenige Zellkerne, die mit einer hohen Dosis belegt werden [Überblick bei Kiefer, 1992].

4.1.2 Wachstumskinetik

Zur Vorbereitung der Experimente ist die Wachstumskinetik der verwendeten Zelllinien ein wichtiger Faktor. Erst wenn Parameter wie die Populationsverdopplungszeit und die Zellzyklusdauer der Zellen bekannt sind, ist es möglich, die Zelleinsaat und die idealen Meßzeiten für die jeweilige Untersuchung zu bestimmen. Zur Ermittlung dieser Parameter für AG-, GMC-, AP34- und NHLF-Zellen wurde in regelmäßigen Zeitabständen die Zellzahl der Population bestimmt. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abb. 4.3 dargestellt.

In vitro wachsen humane Hautfibroblasten in Form von Ein-Zell-Schicht-Kulturen bis zum Erreichen der Kontaktinhibition. In der Wachstumskurve äußert sich diese Kontaktinhibition durch Ausbildung eines Plateaus (Abb. 4.3, links). Die Verdopplungszeit der in den Experimenten am häufigsten verwendeten AG-Zellen beträgt in der annähernd exponentiellen Wachstumsphase etwa 45 h, nach einem induzierten G1-Arrest verlängert sich diese Zeit jedoch auf etwa 56 h, da die Zel-

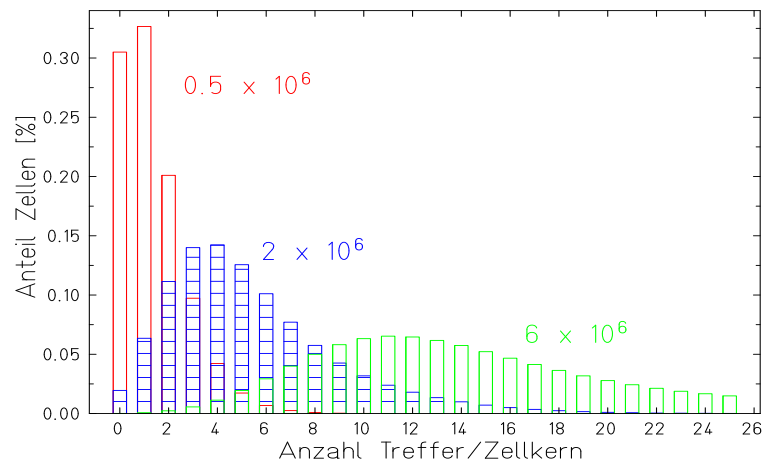


Abbildung 4.2: Wirkliche Verteilung der Teilchendurchgänge je Zellkern am Beispiel von AG-Zellen mit einer mittleren Kernfläche von $251 \mu\text{m}^2$, dargestellt für Fluenzen von $0,5, 2$ und 6×10^6 Teilchen/cm². Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung der Verteilungen der Kerngrößen und der Trefferwahrscheinlichkeit.

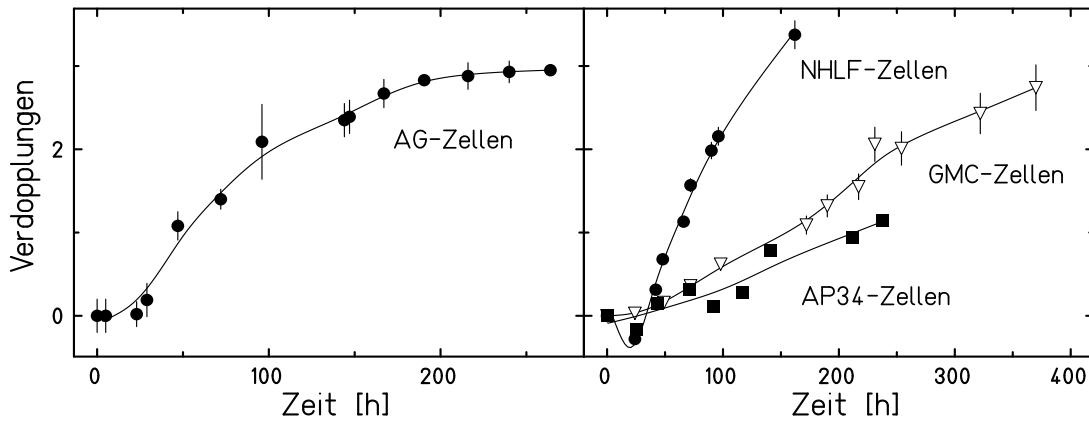


Abbildung 4.3: Wachstumskinetik von unbestrahlten Fibroblastenlinien. Links: AG-Zellen nach Lösen der Kontaktinhibition bis zum erneuten Eintritt der Kontaktinhibition. Mittelwerte aus drei Messungen in aufeinanderfolgenden Monaten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Werte wieder. Rechts: GMC-, AP34- und NHLF-Zellen ebenfalls nach Lösen der Kontaktinhibition, es wurde nicht bis zum Erreichen des Plateaus gemessen, die Experimente wurden nicht wiederholt.

len nach Lösen der Kontaktinhibition eine verlängerte G_1 -Phase durchlaufen. Ein Zellzyklus dauert in der exponentiellen Wachstumsphase 22 h, der 1. Zyklus nach einem induzierten G1-Arrest dauert fast 34 h, wie die Abbildungen 4.15 und 4.18 (links) zeigen. Im Verlauf der Experimente schwanken die Meßwerte, was

durch geringe Schwankungen der Kultivierungsbedingungen verursacht wird. Die Schwankungen sind jedoch nicht so gravierend, daß sie Einfluß auf die Vorbereitung von Experimenten hätten.

Die verschiedenen Fibroblasten-Linien unterscheiden sich stark in ihrer Zellzyklusdauer und damit im Ansteigen der Wachstumskurven, wie in Abbildung 4.3 (rechts) am Beispiel von GMC-, AP34- und NHLF-Zellen gezeigt ist. Die Verdopplungszeit von GMC- und AP34- Zellen ist mit etwa 102 und 160 h deutlich länger als die der AG-Zellen, die der NHLF-Zellen mit etwa 33 h etwas kürzer. Da NHLF-Zellen jedoch kleiner sind als AG-Zellen, erreichen sie die Kontaktinhibition erst nach weiteren Verdopplungen.

4.1.3 Zellzyklus-Studien

Der Zellzyklusverlauf der AG-Zellen nach Lösen der Kontaktinhibition wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie, der Markierung der Zellen in S-Phase und der Messung des Mitoseindex untersucht.

Da für sämtliche Experimente synchrone Zellen verwendet werden sollten, wurde mit Hilfe der eindimensionalen Durchflußzytometrie die Wirksamkeit der Kontaktinhibition bestimmt. In Abschnitt 3.4.5 ist in Abbildung 3.2(a) exemplarisch ein solches eindimensionales Spektrum gezeigt. Die Maxima eines Zellzyklus-Spektrums wurden durch Anpassen von Gaußkurven beschrieben und die Anteile der einzelnen Zyklusphasen durch Integration dieser Kurven bestimmt. Bei den zur Bestrahlung verwendeten konfluenten AG-Zellen betrug der Anteil an G_1 -Phasezellen 86 ± 3 %, der Anteil an S-Phasezellen betrug im Mittel 7 ± 2 %, der Anteil an G_2 -Phasezellen 7 ± 3 %. Nach dem Lösen der Kontaktinhibition kommt es zur Redistribution der Zellzyklusphasen, wie Abbildung 3.2(b) zeigt. Nach 32 h betragen die Anteile an der G_1 -, S- und G_2 -Phase etwa 44 %, 46 % und 10 %.

Der Anteil an Zellen, der die S-Phase erreicht oder durchlaufen hat, wurde durch BrdU-Einbau und Nachweis desselben auf Einzelzellebene bestimmt. Bereits in der ersten entnommenen Probe (20 h) waren $30 \pm 10\%$ der Zellen markiert. Nach etwa 40 h hatten $90 \pm 5\%$ der ansonsten unbehandelten Zellpopulation BrdU eingebaut und demnach die S-Phase erreicht.

Als weiterer Parameter zur Beschreibung der Zellzyklus-Verteilung der Zellpopulation wurde der Mitoseindex zu verschiedenen Zeiten bestimmt, wobei durch Zugabe von Colcemid die Mitosen über 4 h angereichert wurden. In Abb. 4.4 ist der Mitoseindex einer Kontrollpopulation nach Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU gezeigt. Erste Mitosen sind ab etwa 28 h nach Lösen der Kontaktinhibition zu beobachten, das Maximum erster Mitosen nach etwa 34 h. Daß der Mitoseindex nur ein deutliches Maximum zeigt ist u.a. darauf zurück zu führen, daß die Synchronisation der Zellen mit dem Fortgang durch die Zellzyklen aufgehoben wird.

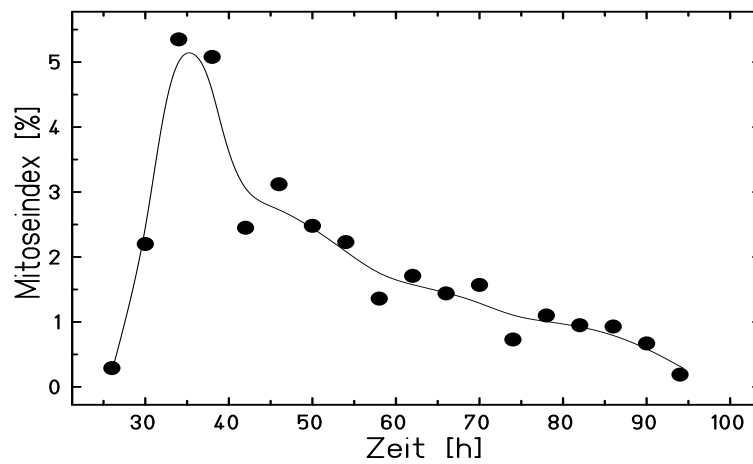


Abbildung 4.4: Mitoseindex einer Kontrollpopulation von AG-Zellen über mehrere Zellzyklen nach Lösen der Kontaktinhibition. Die Zellen wurden wie in den anschließenden Experimenten in Medium mit 10 % FCS und 10 $\mu\text{mol/l}$ BrdU kultiviert. Durch Zugabe von Colcemid wurden die Mitosen jeweils über 4 h angereichert. Die Meßpunkte geben das Ende des Sammelintervalls an. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine einzelne Messung und enthält daher keine Fehlerbalken.

Der Mitoseindex einer Zellpopulation ist von wechselnden äußeren Faktoren abhängig. Der maximale Mitoseindex der unbestrahlten Zellpopulation in Anwesenheit von BrdU in zwei unabhängigen Experimenten betrug in dieser Arbeit 2,5 und 5 %. Zum Vergleich von Daten aus verschiedenen Experimenten kann daher eine Normierung notwendig sein (siehe auch Abschnitt 4.2.4).

4.1.4 Koloniebildungsfähigkeit (PE)

Die Koloniebildungsfähigkeit (PE) wurde an AG-Zellen über einen Zeitraum von 24 Populationsverdopplungen bestimmt, um Aussagen über den Einfluß des Alters der Kultur auf die Meßergebnisse treffen zu können. Mit zunehmendem Alter der Population sinkt die Fähigkeit der Zellen, Kolonien zu bilden. Wie in Abbildung 4.5 dargestellt, fiel die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen im Verlauf der Untersuchung auf 10 % des Ausgangswertes ab. Wegen dieser drastischen Veränderung wurden für alle folgenden Untersuchungen Zellen der gleichen CPD verwendet (z.B. AG-Zellen: CPD 22 ± 1 mit einer PE von $0,33 \pm 0,05$, siehe auch Tabelle 3.1).

4.1.5 Differenzierungsmuster

Da die Anteile proliferierender und ausdifferenzierter Zellen die Untersuchungsergebnisse wie Koloniebildung und Mitoseindex beeinflusst, wurde das Differen-

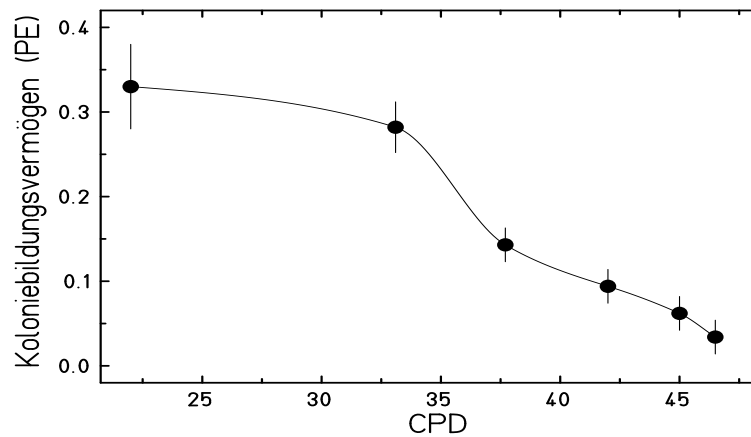


Abbildung 4.5: Koloniebildungsvermögen von AG-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der verwendeten Zellkultur. Die Meßdaten stellen Mittelwerte aus drei parallelen Proben dar, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

zierungsmuster der in den Experimenten am häufigsten verwendeten AG-Zellen untersucht. Die Anteile an den einzelnen Differenzierungsstadien, die in Abschnitt 3.4.7 beschrieben sind, wurden dabei bestimmt. Für die mitotische aktiven Stadien MFII und MFIII ergaben sich $36 \pm 4 \%$ und $47 \pm 3 \%$, sowie für die post-mitotischen Fibroblasten PMF $17 \pm 2 \%$. Es zeigt sich hieran ein älter werden der Zellen seit den Untersuchungen von C. Fournier (1999), in deren Experimenten die Anteile etwa 2 % MFI, 65 % MFII, 21 % MFIII und 13 % PMF betragen. Eine Verschiebung zu höheren Differenzierungsstadien, vor allem von MFII nach MFIII ist zu beobachten, Zellen des MFI-Stadiums konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

4.2 Einfluß von Strahlung

4.2.1 Wachstumskinetik

Wie schon in Abschnitt 4.1.2 beschrieben wurde, ist die Wachstumskinetik der verwendeten Zellen für die Planung von Experimenten ausgesprochen wichtig.

Nach Bestrahlung wächst die Population langsamer, als die unbestrahlte

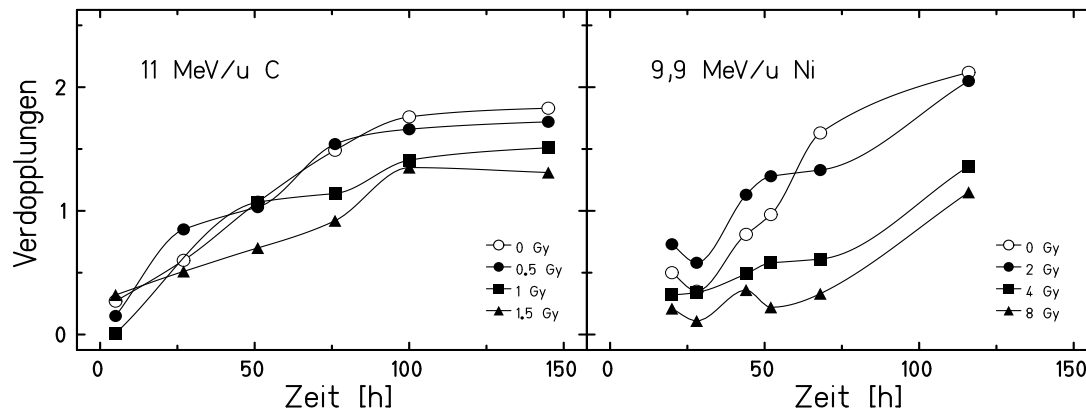


Abbildung 4.6: Wachstumskinetik von bestrahlten und unbestrahlten AG-Zellen. Mit unterschiedlichen Dosen 11 MeV/u Kohlenstoffionen bestrahlte Zellen (links). Mit unterschiedlichen Dosen 9,9 MeV/u Nickelionen bestrahlte Zellen (rechts). Das Absinken der Teilungsfähigkeit der Zellen ist dosisabhängig.

Kontrollpopulation. Die Beispiele (Abb. 4.6) zeigen deutlich die dosisabhängige Verminderung des Zellwachstums. Dabei ergibt sich im Fall von 11 MeV/u Kohlenstoffstrahlung mit der Zeit ein größerer Unterschied zwischen den verschiedenen Dosen, zunehmend mehr Zellen erfahren einen Zellzyklusarrest. Dies äußert sich in der Ausbildung eines Plateaus, ohne daß die Zelldichte bereits für eine Kontaktinhibition ausreichend wäre. Im Fall von Nickelionen zeigt sich der Unterschied zwischen den einzelnen Dosen besonders in der Anfangsphase der Proliferation, während später alle Kurven die gleiche Steigung aufweisen. Ein Plateau wird innerhalb des untersuchten Zeitraums nicht erreicht.

Die Wachstumskinetik von AG-, NHLF- und NHDF-Zellen wurde nach Röntgenbestrahlung untersucht und ist exemplarisch in Abschnitt 4.3.3 dargestellt. Hierbei zeigte sich, daß die Verminderung des Zellwachstums nach Bestrahlung keine besondere Eigenschaft der hauptsächlich verwendeten AG-Zellen ist, sondern in anderen humanen Zelllinien in ähnlicher Weise zu beobachten ist. Für nachfolgende Experimente wie z.B. die Untersuchung von Chromosomenschäden hat diese Verlängerung des Zellzyklus die Notwendigkeit einer deutlichen Verlängerung des Untersuchungszeitraumes zur Folge.

4.2.2 Koloniebildung

4.2.2.1 Initialer Schaden

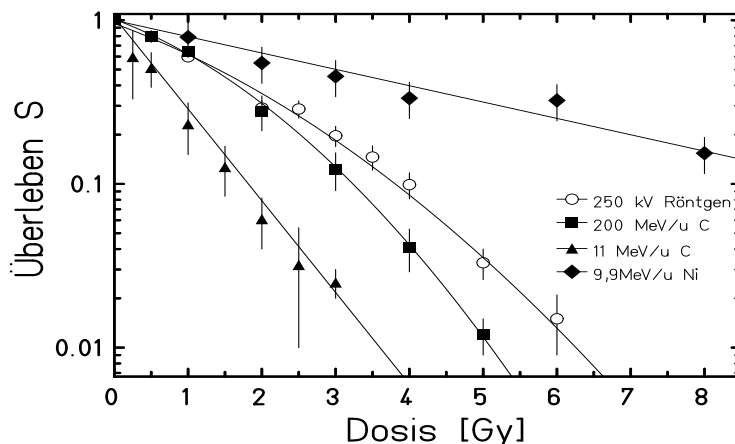


Abbildung 4.7: Zellüberleben von AG-Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenarten: 250 kV Röntgenstrahlung (LET 2 KeV/ μm), 200 MeV/u Kohlenstoffionen (LET 16 KeV/ μm), 11 MeV/u Kohlenstoffionen (LET 153 KeV/ μm) und 9,9 MeV/u Nickelionen (LET 2450 KeV/ μm). Die gezeigten Datenpunkte sind Mittelwerte aus 3 - 5 unabhängigen Messungen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Für einzelne Datenpunkte konnten keine Mehrfachmessungen durchgeführt werden, die Fehler für diese Werte wurden aus den Fehlern der Mehrfachmessungen abgeschätzt.

In Abbildung 4.7 ist das Zellüberleben (S) von AG-Zellen dargestellt, die direkt nach Bestrahlung trypsiniert und ausplattiert wurden. Mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate wurde an die Meßdaten eine Exponential-Funktion mit einem Polynom 2. Grades angepaßt und die Parameter α und β bestimmt (Formel 3.4). Aus den angepaßten Kurven für Röntgen- und Schwerionenstrahlung wurden die RBW und die SF_2 bestimmt (siehe 2.3.3 und 3.4.3) und in Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Die erhaltenen Zahlenwerte zeigen eine Abhängigkeit des Zellüberlebens vom Energieübertrag der Strahlung (LET). Mit zunehmendem LET nimmt die Ausprägung der Schulter der Kurve ab, wie sich in einem wachsenden α/β -Verhältnis zeigt. Für niederenergetische Ionen verschwindet schließlich β und damit die Schulter der Kurve ganz. Der lineare Anteil der Kurven (α) nimmt mit dem LET zu, bis er bei einem LET von 153 KeV/ μm ein Maximum erreicht und im Falle von Nickelbestrahlung die Kurve flacher verläuft, als nach Röntgenbestrahlung.

Strahlung	$\alpha[Gy^{-1}]$	$\beta[Gy^{-2}]$	α/β	SF_2	RBW_{10}
Röntgen	$0,425 \pm 0,041$	$0,050 \pm 0,011$	8,5	$0,35 \pm 0,05$	-
C 200 MeV/u	$0,391 \pm 0,142$	$0,100 \pm 0,029$	3,4	$0,31 \pm 0,15$	1,2
C 11,0 MeV/u	$1,289 \pm 0,069$	0	-	$0,08 \pm 0,01$	2,1
Ni 9,9 MeV/u	$0,230 \pm 0,033$	0	-	$0,63 \pm 0,04$	0,4

Tabelle 4.1: Aus den Dosis-Effektkurven erhaltene Parameter (siehe Abschnitt 3.4.3), sowie die RBW bei 10 % Zellüberleben. Aus den erhaltenen Parametern geht deutlich hervor, daß niederenergetische Kohlenstoffionen eine stark erhöhte biologische Wirksamkeit aufweisen. Für niederenergetische Nickelionen ist die RBW kleiner 1.

4.2.2.2 Zellüberleben nach Reparatur

Der Einfluß der Erholungszeit auf die Reparaturfähigkeit von AG-Zellen ist in Abbildung 4.8 exemplarisch für unterschiedliche Dosen 200 MeV/u Kohlenstoffstrahlung dargestellt. Es zeigt sich, daß nach 6 h Erholungszeit die Reparaturprozesse annähernd abgeschlossen sind. Die Steigerung der Überlebensrate ist von der Dosis abhängig. Im oben gezeigten Beispiel ergibt sich ein Anstieg der Reparatur um den Faktor 2,5 zwischen Dosen von 1,5 und 4 Gy. Diese reparablen Anteile entsprechen dem potentiell letalen Schaden PLD.

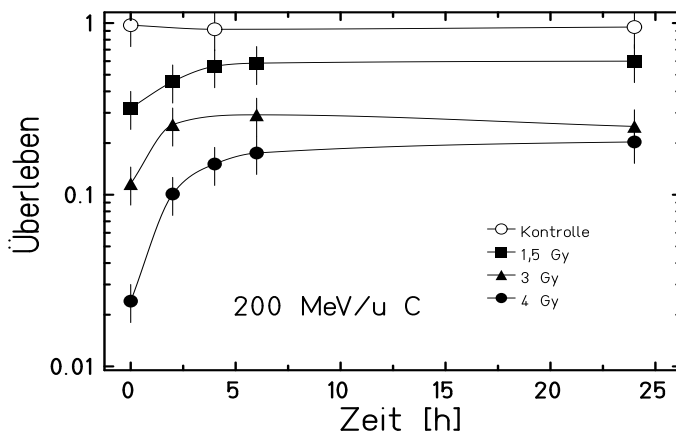


Abbildung 4.8: Zellüberleben von AG-Zellen in Abhängigkeit von der Erholungszeit nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen 200 MeV/u Kohlenstoffionen. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert aus drei parallelen Proben dar, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die zur Berechnung verwendete PE der Kontrolle wurde wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben bestimmt.

Eine noch ausgeprägtere Abhängigkeit besteht zwischen der Reparaturfähigkeit der Zellen und der Art der verwendeten Strahlung. In Abbildung 4.9 ist der Zeit-

verlauf der Erholung von AG-Zellen für verschiedene Strahlenarten dargestellt. Um die einzelnen Kurven vergleichen zu können, wurde mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt, so daß ein anfängliches Zellüberleben von 10 % erreicht wurde. Während nach dünnionisierender Strahlung wie Röntgen-Strahlung oder hoch-energetischen Kohlenstoffionen eine deutliche Verbesserung des Zellüberlebens festzustellen ist (um 36 bzw. 25 % höheres Überleben), wird nach hoch-LET-Strahlung nur eine geringe Verbesserung des Überlebens durch Erholung beobachtet (16 % Verbesserung nach Kohlenstoffionen, keine Verbesserung nach Nickelbestrahlung).

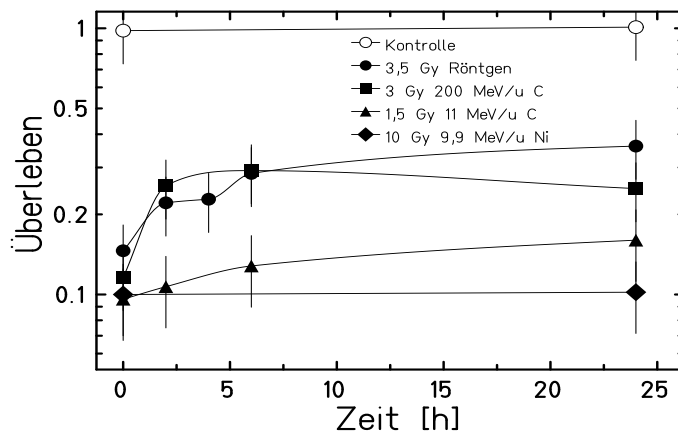


Abbildung 4.9: Vergleich der Wirkung verschiedener Strahlenarten im Bezug auf die Reparaturkinetik von AG-Zellen. Die Bestrahlung erfolgte mit unterschiedlichen Dosen, um ein anfängliches Zellüberleben von $S = 10\%$ zu erreichen. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert aus drei parallelen Proben dar, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die zur Berechnung verwendete PE der Kontrolle wurde wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben bestimmt.

Zur Untersuchung der Erholungsfähigkeit der Zellen über einen größeren Dosisbereich wurden Dosis-Effekt-Kurven nach 24 h Erholungszeit angefertigt, da nach 24 h die Reparaturprozesse vollständig abgeschlossen sind (Abbildungen 4.8 und 4.9), und mit den nach 0 h erhaltenen Kurven (Abschnitt 4.2.2) verglichen. Abbildung 4.10 zeigt, daß wie schon zuvor beschrieben mit zunehmender Dosis der prozentuale Anteil des PLD wächst.

Mit steigendem LET sinkt über den gesamten Dosisbereich die Erholungsfähigkeit der Zellen. Dabei nimmt für dünnionisierende Strahlung die Schulter nach Erholung ab, wie sich im steigenden α/β -Verhältnis zeigt. Dieses steigt für Röntgenbestrahlung von 8,5 auf 50,4 an, für 200 MeV/u Kohlenstoffstrahlung dagegen nur von 3,4 auf 5,0. Hoch-LET-Strahlung bewirkt, daß die Kurven nach 0 h und 24 h Erholungszeit identisch sind.

In Tabelle 4.2 ist die RBW für das Überleben nach 24 h Erholungszeit dargestellt.

Für dichtungisierende Strahlung steigt diese nach Erholung an, da die Erholungsfähigkeit der Zellen stark eingeschränkt ist, während nach Röntgenbestrahlung Erholung stattfindet. Mit steigendem LET zeigt sich in Überlebenskurven ein

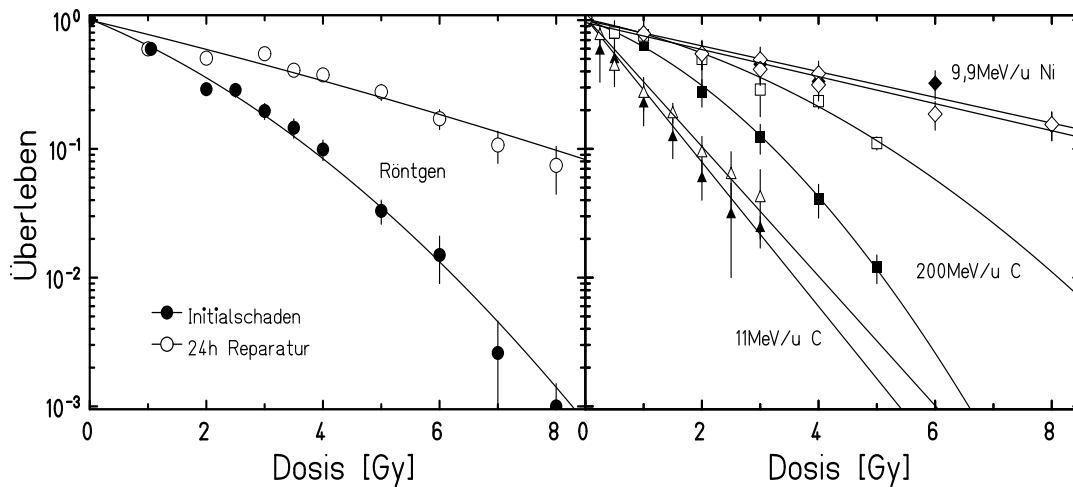


Abbildung 4.10: Zellüberleben von AG-Zellen nach 0 h (geschlossene Symbole) und 24 h (offene Symbole) Erholungszeit. Links: 250 kV Röntgenstrahlung (LET 2 KeV/ μm). Rechts: 200 MeV/u Kohlenstoffionen (LET 16 KeV/ μm), 11 MeV/u Kohlenstoffionen (LET 153 KeV/ μm) und 9,9 MeV/u Nickelionen (LET 2450 KeV/ μm). Die gezeigten Datenpunkte sind Mittelwerte aus 3 - 5 unabhängigen Messungen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Für einzelne Datenpunkte konnten keine Mehrfachmessungen durchgeführt werden. Die Fehler für diese Werte wurden aus den Fehlern der anderen Werte abgeschätzt.

wachsender linearer Anteil α und ein steigendes α/β -Verhältnis. Die Kurven werden demnach steiler und zeigen eine abnehmende Schulter. Die Erholungsfähigkeit der Zellen wird durch hoch-LET-Strahlung fast vollständig unterdrückt.

4.2.3 Laktat-Dehydrogenase-Abgabe (LDH)

Einer Zelle stehen nach Bestrahlung drei mögliche Wege offen. Diese sind Proliferation, Zellzyklusarrest bzw. Differenzierung und Zelltod, der nicht mit dem mitotischen Tod gleichzusetzen ist. Der Anteil toter Zellen wurde anhand der im Kulturmedium nachgewiesenen LDH-Mengen wie in Abschnitt 3.4.6 beschrieben bestimmt.

Die im Laufe der Untersuchungen nach Bestrahlung nachgewiesenen LDH-Mengen ergaben keinen Anstieg toter Zellen mit der Dosis. Untersucht wurden AG-Zellen nach Bestrahlung mit 0 und 3 Gy 200 MeV/u Kohlenstoffstrahlung über bis zu 90 h in Intervallen von 8 h, sowie nach 0,5, 1, 1,5, 2 und 6 Gy

Strahlung	$\alpha[Gy^{-1}]$	$\beta[Gy^{-2}]$	α/β	SF_2	RBW_{10} (24h)	RBW_{10} (0h)
Röntgen	$0,252 \pm 0,065$	$0,005 \pm 0,010$	50,4	$0,59 \pm 0,11$	-	-
C 200 MeV/u	$0,217 \pm 0,145$	$0,043 \pm 0,028$	5,0	$0,55 \pm 0,27$	1,5	1,2
C 11 MeV/u	$1,157 \pm 0,098$	0	-	$0,10 \pm 0,02$	3,9	2,1
Ni 9,9 MeV/u	$0,242 \pm 0,023$	0	-	$0,62 \pm 0,03$	0,8	0,4

Tabelle 4.2: Aus den Dosis-Effektkurven nach 24 h Erholungszeit erhaltene Parameter, sowie die RBW bei 10 % Zellüberleben. Zum Vergleich wurden auch die RBW_{10} -Werte für den initialen Schaden (0 h Erholung) angegeben.

11 MeV/u Kohlenstoffionen nach 40, 70, 96 und 144 h. Der beobachtete leichte Anstieg der LDH-Konzentration mit der Meßdauer ist auf die ungünstigen Wachstumsbedingungen für die Zellen in Mikrotiterplatten und die geringe Serumkonzentration von 1% FCS im Testmedium zurückzuführen, da der Anstieg in unbestrahlten und bestrahlten Zellen parallel verlief. Durchschnittlich wurden 11 ± 6 % tote Zellen nachgewiesen. Für humane Fibroblasten spielt demnach der Zelltod als Antwort auf Strahlung eine untergeordnete Rolle.

4.2.4 Zellzyklusverlauf

4.2.4.1 S-Phasen-Markierung

Der Anteil an Zellen einer Population, die die S-Phase des Zellzyklus erreichen, gibt Aufschluß über das Ausmaß eines Zellzyklusarrestes in G1-Phase, da die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung in G1 synchronisiert waren. In Abbildung 4.11 sind die Anteile markierter Zellen an der Gesamtpopulation nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenarten im Verlauf der Zeit nach Lösen der Kontaktinhibition dargestellt. Die vier Experimenten zeigen, daß unbestrahlte Kontrollzellen nach etwa 40 h zu 80 - 95 % die S-Phase erreichen. Dagegen zeigt sich nach Bestrahlung ein verlangsamter Kurvenanstieg. Mit Verzögerung wird ein Plateau erreicht, wie es auch bei den Kontrollzellen zu beobachten ist. Die Höhe des Plateaus weist eine deutliche Dosisabhängigkeit auf. Ähnliche Dosen verschiedener Strahlenarten sind hierbei unterschiedlich effektiv. So erreichen nach 2 Gy Röntgenstrahlung noch etwa 75 % der Zellen die S-Phase, während nach 2 Gy hochenergetischer Kohlenstoffstrahlung ca. 60 % der Zellen markiert werden, nach niederenergetischer Nickelbestrahlung ca. 70 % und bei niederenergetischer Kohlenstoffstrahlung 60 % nach einer Dosis von nur 1 Gy.

Der Anteil markierter Zellen nach 70 h (im Plateau) wurde über der Dosis aufgetragen (siehe Abb. 4.12, links). Aus den Dosis-Effekt-Kurven wurden die RBWs für die verschiedenen Strahlenarten bestimmt. Die RBW beträgt 1,9 für

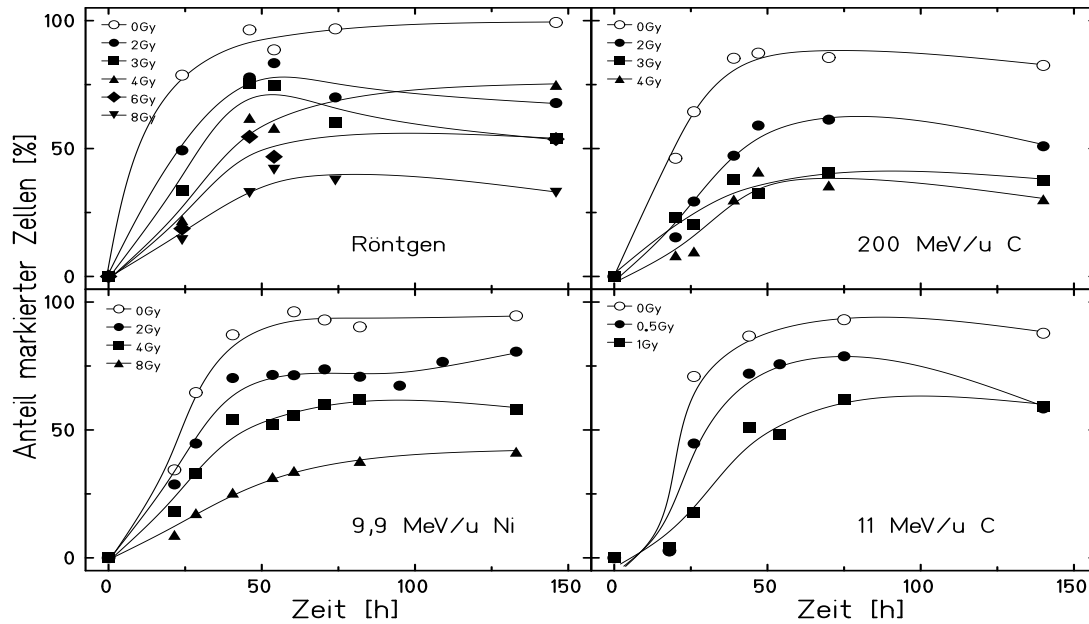


Abbildung 4.11: Anteil S-Phasen-markierter Zellen an der Gesamtpopulation nach Bestrahlung konfluenten AG-Zellen mit Röntgen-Strahlung (links oben), 200 MeV/u Kohlenstoffionen (rechts oben), 9,9 MeV/u Nickelionen (links unten) und 11 MeV/u Kohlenstoffionen (rechts unten) in Abhängigkeit von der Zeit nach Lösen der Kontaktinhibition. Mit steigender Dosis werden zunehmend mehr Zellen im Zellzyklus arretiert. Gleiche Dosen unterschiedlicher Strahlenarten sind hierbei unterschiedlich effektiv.

200 MeV/u C und nimmt mit steigendem LET zu. Sie wird für 11 MeV/u Kohlenstoffionen mit 4,3 maximal und sinkt für Nickelionen auf 1.

Wird der Anteil markierter Zellen nach Ionenbestrahlung über der Fluenz aufgetragen (Abbildung 4.12, rechts), so zeigt sich hierbei deutlich, daß die biologische Wirksamkeit von Nickelstrahlung unterschätzt wird, wenn Dosen statt Fluenzen verglichen werden. Gleiche Fluenzen unterschiedlicher Strahlung bedeuten gleiche Anzahl von Teilchendurchgängen je Zellkern. Ein Treffer durch ein Nickelion ist demnach effektiver als ein Treffer durch ein Kohlenstoffion.

4.2.4.2 Zellzyklusverlauf nach durchflußzytometrischer Messung

Die Anteile an AG-Zellen in den Zellzyklusphasen der einzelnen Replikationsrunden wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie in unbestrahlten und bestrahlten Proben ermittelt. Bei den zur Bestrahlung verwendeten konfluenten Zellen betrug der Anteil an G_1 -Phasezellen zwischen 80 und 85 %, die restlichen 15 -20 %

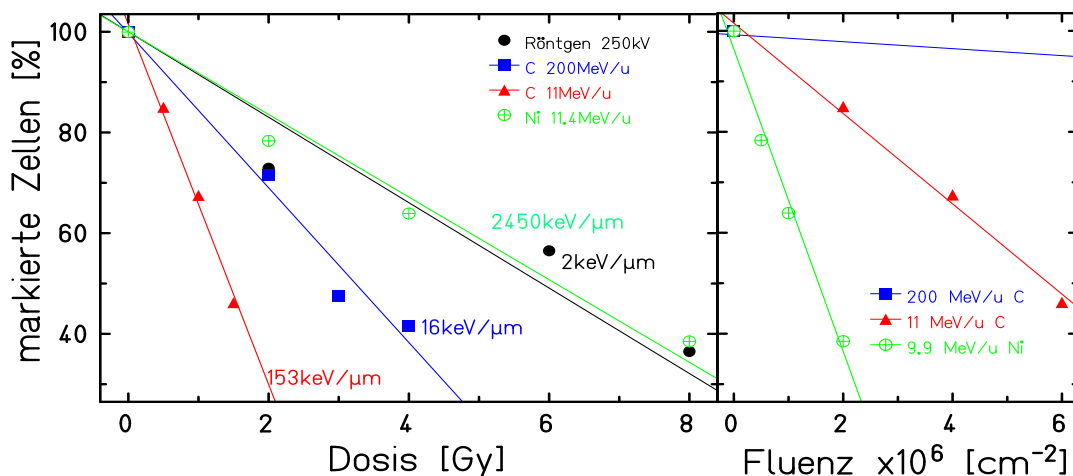


Abbildung 4.12: Anteile S-Phasen-markierter AG-Zellen 70 h nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenarten in G₁-Phase und Lösen der Kontaktinhibition: in Abhängigkeit von der Dosis (links), in Abhängigkeit von der Fluenz (rechts). Für die Bestrahlung mit 200 MeV/u Kohlenstoffionen wurden Fluenzen von 72×10^6 und mehr benötigt. Auf die Darstellung dieser Meßpunkte wurde der Übersichtlichkeit wegen verzichtet.

verteilt sich auf die S- und G₂/M-Phase. (siehe Abschnitt 4.1.3). Die Kontaktinhibition vermindert die DNS-Syntheserate und bewirkt eine Anreicherung der Zellen in der G₁-Phase.

In den Abbildungen 4.13 und 4.14 sind die Rohdaten der Experimente dargestellt. Um die Anteile an den einzelnen Phasen nicht auf die im Verlauf des Experimentes durch Proliferation anwachsende Population, sondern die Ausgangspopulation zum Zeitpunkt 0 h zu beziehen, wurden sie entsprechend korrigiert. Die Proliferationsverzögerung nach Bestrahlung wird durch den Grad der Synchronisation nicht beeinflusst, wie der Vergleich mit Abbildung 4.31 zeigt. Auch bei den oben gezeigten Daten zu Kontrollzellen (Abbildungen 4.13 und 4.14, jeweils rechts) zeigen sich Unterschiede von $\pm 8\%$, die durch geringe Schwankungen in den äußeren Bedingungen zustande kommen.

Die Mehrheit der Zellen läuft in der Kontrolle von der ursprünglichen G₁-Phase in eine G₂+BrdU mit einem Maximum bei etwa 30 h nach Auflösung der Kontaktinhibition (Abbildung 4.13 und 4.14, jeweils links). In den nächsten 10 h erreichen diese Zellen über die Mitose eine neue G₁-Phase (G₁+BrdU) und sammeln sich dort an, wie das Plateau ab 50 h zeigt. Diese G₁+BrdU-Fraktion erreichen 43 - 60 % der Kontrollzellen, 14 - 16% der Zellen bleiben in der G₁-Phase arretiert. Nur ein sehr kleiner Bruchteil der Zellen läuft über eine 2. Synthesephase mit neuerlichem BrdU Einbau in eine G₂+2BrdU-Phase.

Nach Bestrahlung ändert sich dieses Bild drastisch (Abbildung 4.13, rechts). Nach

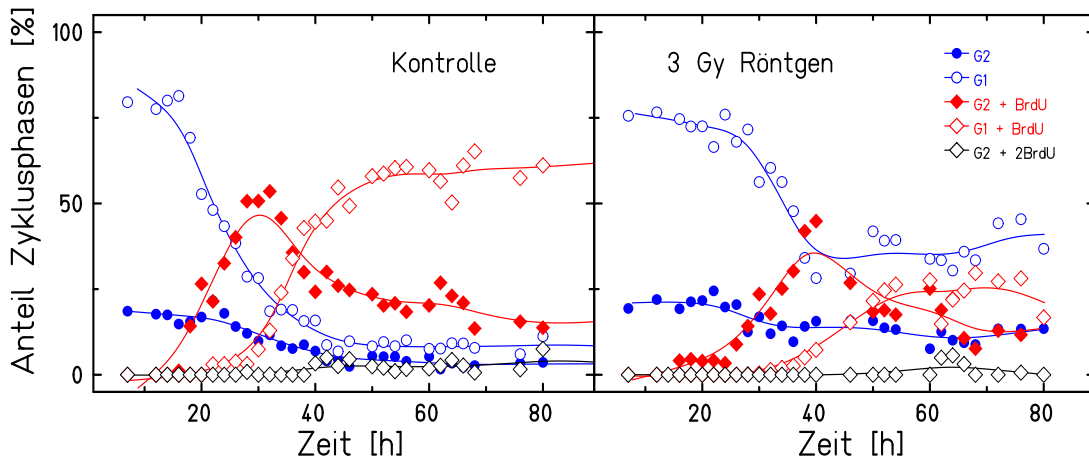


Abbildung 4.13: Anteile der AG-Zellpopulation in den einzelnen Zellzyklusphasen im Verlauf der Zeit in unbestrahlten Kontrollzellen (links) und nach 3 Gy Röntgenbestrahlung (rechts). In der bestrahlten Zellpopulation beginnt die Zellteilung etwa 10 h später, als in der Kontrollpopulation. Zellen, die kein BrdU eingebaut haben, sind blau gekennzeichnet. Das Kürzel +BrdU bezeichnet eine Zellzyklusphase, nach der 1. S-Phase, in der 1× BrdU eingebaut wurde. Nach einer weiteren S-Phase lautet es dann +2BrdU. Die Daten sind nicht auf die Ausgangspopulation korrigiert.

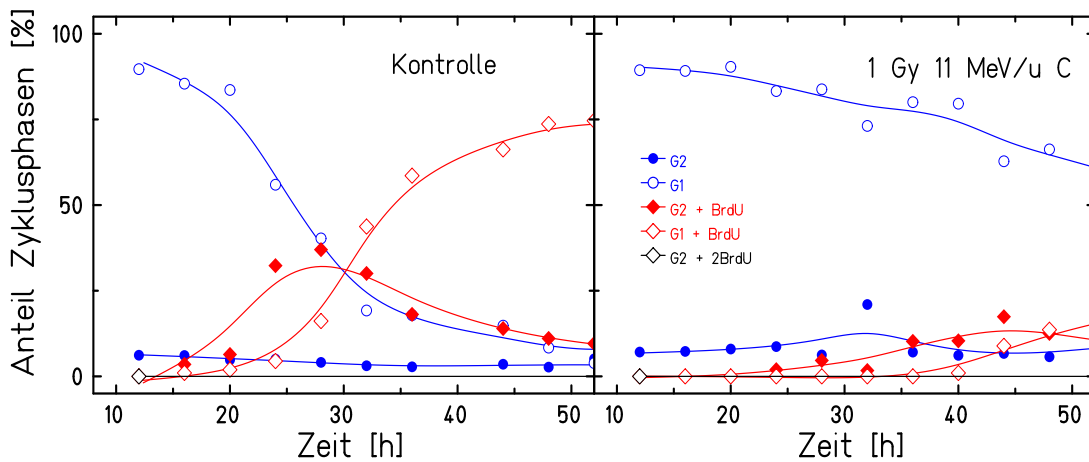


Abbildung 4.14: Anteile der AG-Zellpopulation in den einzelnen Zellzyklusphasen im Verlauf der Zeit in einer unbestrahlten Kontrollpopulation (links) und nach Bestrahlung mit 1 Gy 11 MeV/u Kohlenstoffionen (rechts). In der bestrahlten Zellpopulation beginnt die Zellteilung etwa 20 h später als in der Kontrollpopulation. Die Daten sind nicht auf die Ausgangspopulation korrigiert. (Bezeichnungen wie in Abbildung 4.13)

3 Gy Röntgen wird der Übergang von G_1 in die nächste G_2 -Phase (G_2 +BrdU) 10 h verzögert und nur von wenigen Zellen durchgeführt. Der weitere Übergang von G_2 über M in die nächste G_1 -Phase ist stark behindert und ebenfalls um ca. 10 h verzögert. Nur 14 % erreichen die erste Mitose nach Bestrahlung, 46 % verbleiben in der G_1 -Phase.

Dieses Verhalten wird weiter deutlich gesteigert bei Übergang zu hoch-LET-Strahlung wie 11 MeV/u Kohlenstoffionen (Abbildung 4.14). Hier findet sich ein starker Arrest bereits in der ursprünglichen G_1 -Phase (57 %) und alle nachfolgenden Übergänge finden auf wesentlich niedrigerem Niveau statt. Der Anstieg der Zellfraktion in G_2 +BrdU-Phase ist erst 20 h nach dem der Kontrollpopulation zu beobachten. Mit steigendem LET wächst die Anzahl verzögerter Zellen und die Dauer der Zyklusverzögerung an.

4.2.4.3 Mitose-Index

Zur weiteren Beschreibung der Zellzyklus-Entwicklung der Population wurde in den Chromosomenexperimenten (niederenergetischen Kohlenstoff- und Nickelionen) der Mitose-Index über viele Zeitpunkte hinweg in Intervallen von 4 h und unter Zugabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ BrdU zum Medium bestimmt. Dabei wurde durch differentielle Färbung (FpG-Färbung, siehe auch Abschnitt 3.4.9) zwischen den Mitosen des 1., 2. und 3. Zellzyklus nach Bestrahlung unterschieden. Mit Hilfe dieser Unterscheidung wurde der Index für 1. Mitosen bestimmt (Abbildung 4.15). Mit steigender Dosis ist deutlich eine zunehmende Verzögerung der Zellteilung zu erkennen. Aus den Zeitverläufen des Anteils 1. Mitosen wurde die Zellzyklus-Verzögerung durch Bestrahlung abgeschätzt, indem die Zeiten bis zum Erreichen des maximalen Mitoseindex verglichen wurden. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit ist die Verzögerung bei 11 MeV/u Kohlenstoffionen mit 12 h bei 1,5 Gy maximal. Nach Bestrahlung mit 9,9 MeV/u Nickelionen ist sie weniger deutlich ausgeprägt (4 h, 8 Gy). In Abbildung 4.16 sind die Anteile 1., 2. und 3. Mitosen an der Gesamtzahl von Mitosen nach FpG-Färbung exemplarisch für 11 MeV/u Kohlenstoffstrahlung dargestellt. Die durch Bestrahlung verursachte Verzögerung des Zellzyklus zeigt sich auch hier deutlich. Während in der Kontrollpopulation nach 78 h weniger als 10 % der Metaphasen 1. Mitosen sind, beträgt deren Anteil nach Bestrahlung mit 1,5 Gy Kohlenstoffionen immer noch fast 50 %. Die Mitose-Indices des Nickel-Experimentes sind in Abbildung 4.36 dargestellt. Die Daten beider Experimente wurden in den Tabellen des Anhang C zusammengefaßt.

Aus der Fläche unter den Mitoseindex-Kurven in Abbildung 4.15 wurde der Anteil „proliferierender“ Zellen bestimmt. Um die Daten auf die Ausgangspopulation zum Zeitpunkt 0 h zu beziehen, und nicht auf die im Verlauf des Experimentes durch Proliferation anwachsende Population, wurde der Mitoseindex korrigiert

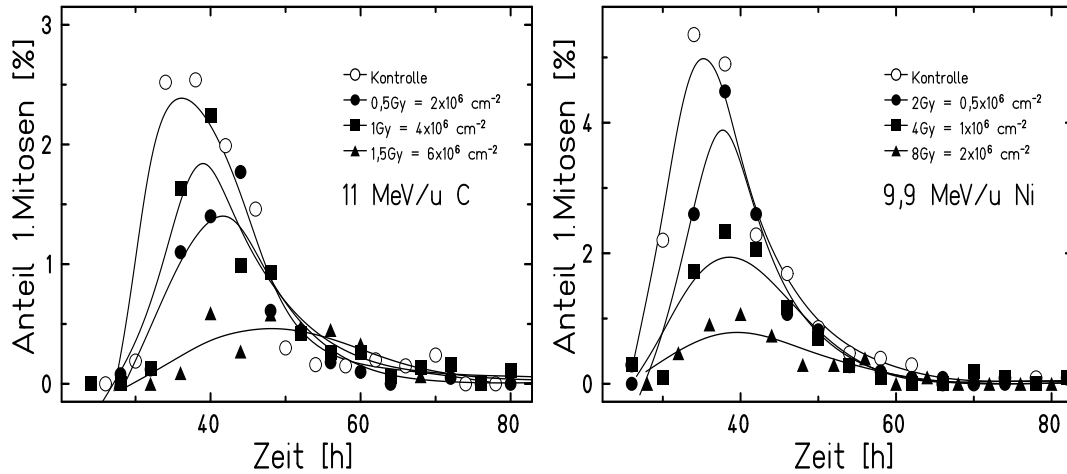


Abbildung 4.15: Anteil von AG-Zellen in der 1. Mitose nach Bestrahlung an der Gesamtpopulation in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung und der Dosis: 11 MeV/u Kohlenstoffionen (links); 9,9 MeV/u Nickelionen (rechts). Da die Maxima der Kontrollpopulationen theoretisch die gleiche Höhe erreichen sollten, wurden verschiedene y-Achseinteilungen gewählt.

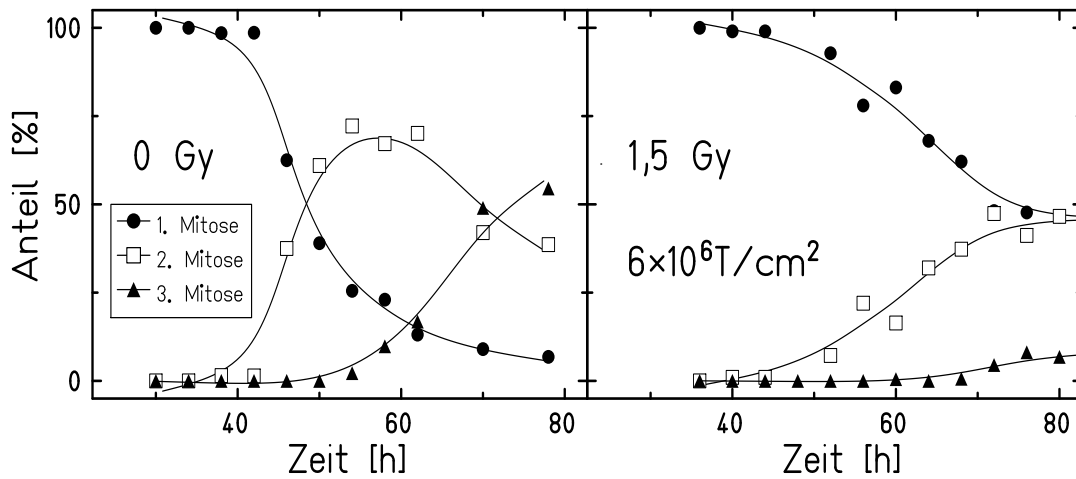


Abbildung 4.16: Anteile 1., 2. und 3. Mitosen an der Gesamtzahl Mitosen in einer unbestrahlten Kontrollpopulation (links) und nach Bestrahlung mit 11 MeV/u Kohlenstoffstrahlung (rechts). Die ausgeprägte Verzögerung der 2. Mitosen nach Bestrahlung von mehr als 20 h ist deutlich zu erkennen.

(siehe Abschnitt 3.4.9.3). Der zeitliche Verlauf des Anteils an Zellen, die die erste Mitose erreichen, ist in Abbildung 4.17 gegen die Zeit aufgetragen. Zum Vergleich wurden die Daten für Röntgenbestrahlung und 200 MeV/u Kohlenstoffionen von

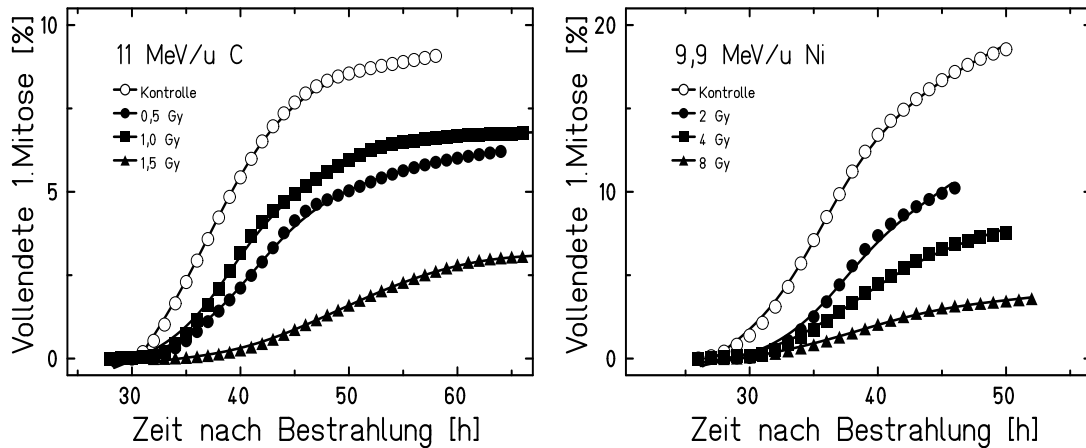


Abbildung 4.17: Zeitlicher Verlauf des Anteils an Zellen, die die erste Mitose vollendet haben: 11 MeV/u Kohlenstoffionen (links); 9,9 MeV/u Nickelionen (rechts). Es wurden zwei verschiedene Achsenenteilungen verwendet, da die Kontrollpopulation theoretisch in beiden Experimenten vergleichbare Mitoseindizes erreichen sollte, dies jedoch auf Grund von experimentellen Schwankungen nicht der Fall war.

E.Nasonova (persönliche Kommunikation) in die Abbildung aufgenommen. Mit steigender Dosis erreichen immer weniger Zellen die erste Mitose und nach 1,5 Gy Kohlenstoff- oder 8 Gy Nickelionen sind dies gerade noch 3 % der Zellen. Die Abhängigkeit des Anteils proliferierender Zellen von der Strahlenart und der Dosis ist in Abbildung 4.18 (links) dargestellt. Aus den Dosis-Effekt-Kurven können die RBWs für die verschiedenen Strahlenarten bestimmt werden. Zur Berechnung der RBW-Werte wurden die Daten für Röntgenstrahlung von E.Nasonova (persönliche Kommunikation) verwendet. Die RBW beträgt für 200 MeV/u Kohlenstoffionen 1,4 und nimmt mit steigendem LET zu. Für 11 MeV/u Kohlenstoffionen wird sie mit 2 maximal und sinkt für Nickelionen unter 1. Werden die Ergebnisse über der Fluenz anstelle der Dosis aufgetragen (Abbildung 4.18, rechts), so ist Nickelstrahlung effektiver als niederenergetischer Kohlenstoff, da mit einer geringeren Anzahl Nickelionen mehr Dosis übertragen wird.

Zusammenfassend wurde festgestellt, daß humane Fibroblasten durch Bestrahlung zu großen Teilen in der G_1 -Phase des Zellzyklus arretiert werden. Dieser Anteil steigt mit Dosis und LET, fällt für hohe LET-Werte jedoch wieder ab. Große Teile der Zellpopulation erreichen auf Grund ausgeprägter Zyklusarreste innerhalb der untersuchten Zeitdauer nicht die erste Mitose nach Bestrahlung und entziehen sich somit Untersuchungsmethoden wie der Chromosomenanalyse in Metaphasezellen.

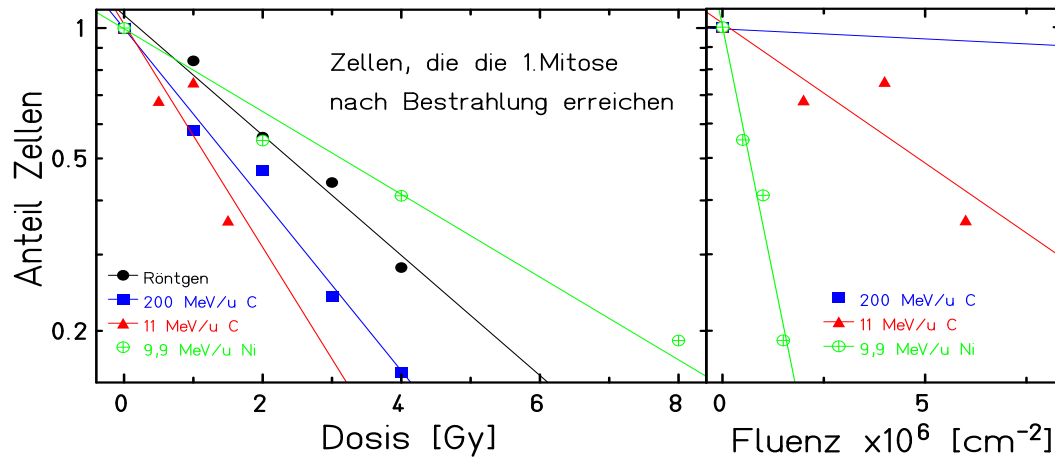


Abbildung 4.18: Anteil an Zellen, die die 1. Mitose nach Bestrahlung vollenden in Abhängigkeit von der Dosis (links) und der Fluenz (rechts), dargestellt für verschiedene Strahlenarten. Für die Bestrahlung mit 200 MeV/u Kohlenstoffionen wurden Fluenzen von 72×10^6 und mehr benötigt. Auf die Darstellung der Meßpunkte wurde der Übersichtlichkeit wegen verzichtet. Daten für Röntgenbestrahlung und 200 MeV/u Kohlenstoffionen von E.Nasonova (persönliche Kommunikation).

4.2.5 Erzeugung von Mikrokernen

Die Auswertung der Mikrokern in bestrahlten AG-Zellen nach den von Fenech (1993) und Abend (1995) beschriebenen Kriterien zur Unterscheidung von Mikrokernen (siehe auch Abschnitt 3.4.8) zeigt mit zunehmender Dosis einen Anstieg der Anzahl von Zellen mit einem oder mehreren Mikrokernen. In allen vier Experimenten kommt es 70 h nach Bestrahlung zur Ausbildung eines Plateaus und dies geschieht parallel zur Ausbildung des Plateaus der S-Phasenmarkierung (Abschnitt 4.2.4.1). In Vorversuchen wurde festgestellt, dass das häufig verwendete Cytochalasin B ($1 \mu\text{g/ml}$) für die untersuchten AG-Zellen toxisch war. Daraufhin wurde die Mikrokerninduktion in S-Phase-markierten Zellen untersucht. Die Daten wurden daher mit Hilfe des integrierten Mitoseindex (Abbildung 4.18) so korrigiert, daß sie mit Cytochalasin B gewonnene Daten zu vergleichen sind. In Abbildung 4.19 werden zunächst die Rohdaten gezeigt, die nach der Korrektur erhaltenen Werte werden in Abschnitt 5.4.4 diskutiert.

Nach Bestrahlung mit Röntgen- und hochenergetischer Kohlenstoff-Strahlung zeigen sich vergleichbare Anteile mikrokernhaltiger Zellen. Nach einer Dosis von 3 - 4 Gy enthalten 15-25 % der markierten Zellen einen oder mehrere Mikrokern (Abbildung 4.19, oben). Auch die durch niederenergetische Ionen verursachten Mikrokernanteile sind untereinander vergleichbar (Abbildung 4.19, unten), wobei die

gleiche Anzahl von Treffern (gleiche Fluenzen) auch den gleichen Effekt bewirkt. Nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy Kohlenstoff- oder 8 Gy Nickelionen (jeweils 2×10^6 Teilchen/cm²) weisen 10-15 % der markierten Zellen Mikrokerne auf. In unbestrahlten Zellen bleibt der Anteil Mikrokerne über die gesamte Meßdauer hinweg kleiner als 4 %. Die nach Bestrahlung beobachteten Mikrokerne sind daher auf die Strahlenwirkung zurückzuführen. Beim Vergleich unterschiedlicher

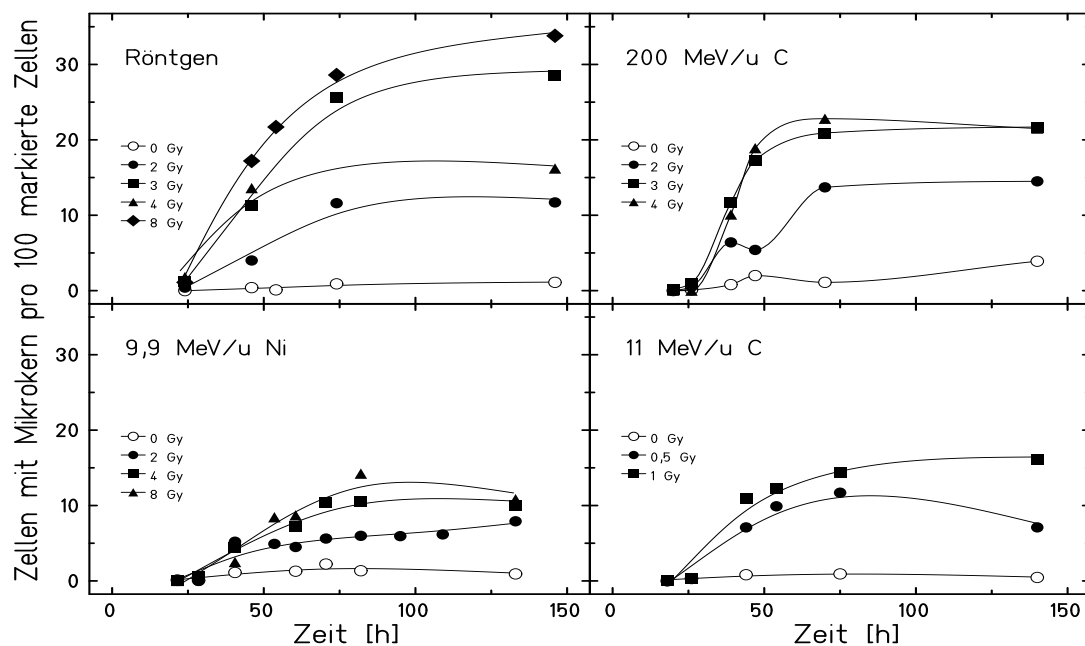


Abbildung 4.19: Anteil an Zellen mit einem oder mehreren Mikrokerneln an den in S-Phase markierten Zellen in Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit nach Röntgen-Bestrahlung (links oben), 200 MeV/u Kohlenstoffionen (rechts oben), 9,9 MeV/u Nickelionen (links unten) und 11 MeV/u Kohlenstoffionen (rechts unten).

Strahlenarten im Hinblick auf die Induktion von Mikrokerneln muß berücksichtigt werden, daß Mikrokerne nur in Zellen auftreten, die wenigstens die 1. Mitose nach Bestrahlung vollendet haben. Wie jedoch bereits in Abschnitt 4.2.4 beschrieben wurde, erreichen maximal 20 % der unbestrahlten Zellen die Mitose und dieser Anteil ist nach Bestrahlung noch einmal deutlich erniedrigt. Der „sichtbare Schaden“ bei der Betrachtung von Mikrokerneln ist daher niedriger, als der tatsächliche.

4.2.6 Chromosomenschäden

Die Analyse von Chromosomenschäden ist zwar in Vergleich zum Mikrokerntest sehr viel aufwendiger, liefert dagegen aber ein Vielfaches der dort zugänglichen

Information. Zur Untersuchung von Chromosomenschäden wurden AG-Zellen in Plateauphase bestrahlt und direkt im Anschluß daran aus der Kontaktinhibition gelöst. Bei 28 h beginnend wurden über viele Stunden hinweg im Abstand von 4 h Chromosomenpräparate angefertigt. Zur Anreicherung von Metaphasen wurde dem Medium 4 h vor der Aufarbeitung Colcemid zugegeben, so daß die Mitosen nahezu des gesamten 1. Zyklus erfaßt wurden. Je Zeitpunkt und Dosis wurden 100 Metaphasen im 1. Zellzyklus nach Bestrahlung untersucht. An dieser Stelle werden vorerst die Rohdaten präsentiert und im Anschluß daran die daraus ermittelten Ergebnisse für die Gesamtpopulation.

Alle Experimente über Chromosomenschäden wurden mit AG-Zellen durchgeführt. In den Abbildungen wurde jeweils die Summe der in Abschnitt 3.4.9 beschriebenen Aberrationen dargestellt. Tabellen mit den genauen Daten zur Verteilung der einzelnen Arten von Aberrationen finden sich in Anhang C.

4.2.6.1 Darstellung der Rohdaten

Um sicherzustellen, daß die gewonnenen Daten mit den Daten aus früheren Experimenten (E.Nasonova, persönliche Kommunikation) vergleichbar sind, wurden Chromosomenanalysen für Kontrollzellen und nach 3 Gy Röntgenbestrahlung durchgeführt. Während in den Experimenten von E.Nasonova in den unbestrahlten AG-Zellen durchschnittlich 5 % aberrante Metaphasen bzw. 0,05 Aberrationen pro Metaphase zu beobachten waren, wurden in der vorliegenden Arbeit 19 % aberrante Metaphasen bzw. 0,2 Aberrationen pro Metaphase ermittelt. Die Unterschiede zwischen den Werten beider Arbeiten sind zum einen in einer höheren CPD der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen begründet und zum anderen in einem anderen fötalen Kälberserum, das, wie von Nagasawa und Little (1988) beschrieben, Einfluß auf die Aberrationsrate haben kann. Nach Korrektur der gemessenen Werte um diesen Anteil stimmten die Aberrationsraten in beiden Experimenten überein. Im Folgenden werden zunächst nicht korrigierte Daten präsentiert.

Wie in Abbildung 4.20 dargestellt ist, kommt es nach Röntgenbestrahlung zu einem leichten Anstieg der Aberrationsrate mit der Zeit, der jedoch geringer ist, als die Schwankung der Meßwerte und daher vernachlässigt werden kann.

Im Vergleich dazu zeigt sich nach Schwerionenstrahlung ein stärkerer Anstieg der Aberrationsrate mit der Zeit nach Bestrahlung, so daß die zeitliche Veränderung nicht mehr vernachlässigbar ist. Nach Bestrahlung mit 11 MeV/u Kohlenstoffionen (Abbildung 4.21) steigen bei Dosen von 0,5 und 1 Gy der Anteil aberranter Zellen und die Aberrationsrate allmählich an, während bei 1,5 Gy ein Zuwachs um etwa 60 % innerhalb von 20 h zu beobachten ist. Danach bleibt die Aberrationsrate konstant bei etwa 3,2 Aberrationen pro Metaphase.

Auch nach Bestrahlung mit 9,9 MeV/u Nickelionen (Abbildung 4.22) kann ein entsprechender Anstieg beobachtet werden. Nach 8 Gy Nickelionen versieben-

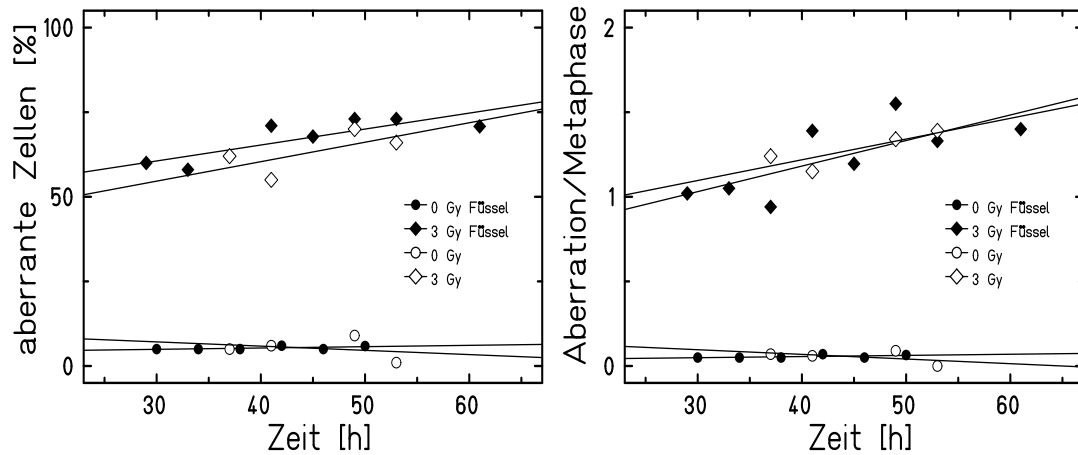


Abbildung 4.20: Anteil aberranter Metaphasen (links) und Aberrationen pro Metaphase (rechts) in Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit nach Bestrahlung von AG-Zellen mit 0 und 3 Gy Röntgenstrahlung. Verglichen werden die Daten von E.Nasonova (persönliche Kommunikation) mit denen der vorliegenden Arbeit (offene Symbole). Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden um 14 % aberrante Metaphasen bzw. um 0,15 Aberrationen pro Metaphase korrigiert (Differenz der Aberrationsraten der Kontrollpopulationen der beiden verglichenen Experimente). Je Dosis- und Zeitpunkt wurden 100 Zellen in der 1.Mitose nach Bestrahlung ausgewertet. Die Fehlerbalken sind kleiner als die Symbolgröße.

facht sich die Aberrationsrate innerhalb von 20 h. Im Gegensatz zu Kohlenstoffionen (Abbildung 4.21) zeigt sich für Nickelionen für alle Dosen ein deutlicher Anstieg des Anteils aberranter Zellen und der Aberrationsrate. Die Ausbildung eines Plateaus ist bei Bestrahlung mit Nickelionen auch nach späten Zeiten nicht zu beobachten. Im Gegensatz zu Kohlenstoffbestrahlung (Abbildung 4.21) steigt die Anzahl aberranter Zellen nach einer Verdopplung der Dosis von 4 auf 8 Gy nicht weiter an, sondern zeigt einen fast identischen Zeitverlauf.

Um die Effekte verschiedener Strahlenarten besser vergleichen zu können, wurden Dosen verglichen, die zu ähnlichem Überleben (etwa 20 %) führten (Abbildung 4.23). Während dünnionisierende Strahlung (geschlossene Symbole) einen nur langsamen und geringen Anstieg mit der Zeit bewirkt (bis zu 25 %), zeigt sich nach dichtionisierender Strahlung auch bei unterschiedlicher Aberrationsausbeute ein schneller ausgeprägter Anstieg der Aberrationsrate bis auf ein 6,8 faches des 36 h-Wertes im Falle von Nickelionen.

Gleichzeitig mit dem Ansteigen der Aberrationsraten tritt eine Veränderung der Verteilung der Anzahl an Aberrationen pro Zelle auf (Abbildung 4.24). Während zu frühen Sammelzeitpunkten vorwiegend ungeschädigte Zellen die Mitose erreichen (links), nimmt die Anzahl von Zellen mit mehreren Aberrationen zu

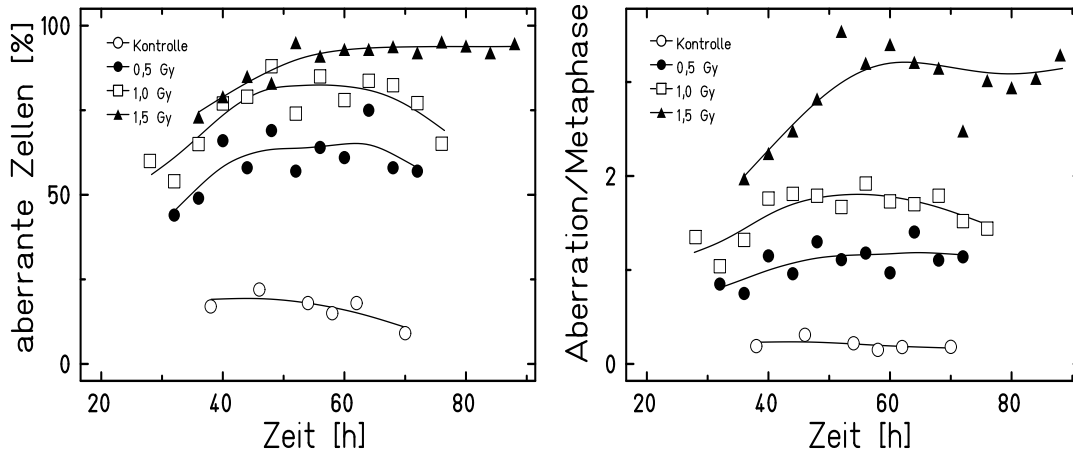


Abbildung 4.21: Anteil an aberranten Metaphasen (links) und Aberrationen pro Metaphase (rechts) in Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit nach Bestrahlung mit 11 MeV/u Kohlenstoff-Ionen (LET 153 KeV/μm). Je Dosis- und Zeitpunkt wurden 100 Zellen in der 1. Mitose nach Bestrahlung ausgewertet. Die Aberrationsrate steigt mit Dosis und Zeit deutlich an und erreicht für späte Zeitpunkte ein Plateau bzw. fällt wieder leicht ab. Die Fehlerbalken sind kleiner als die Symbolgröße.

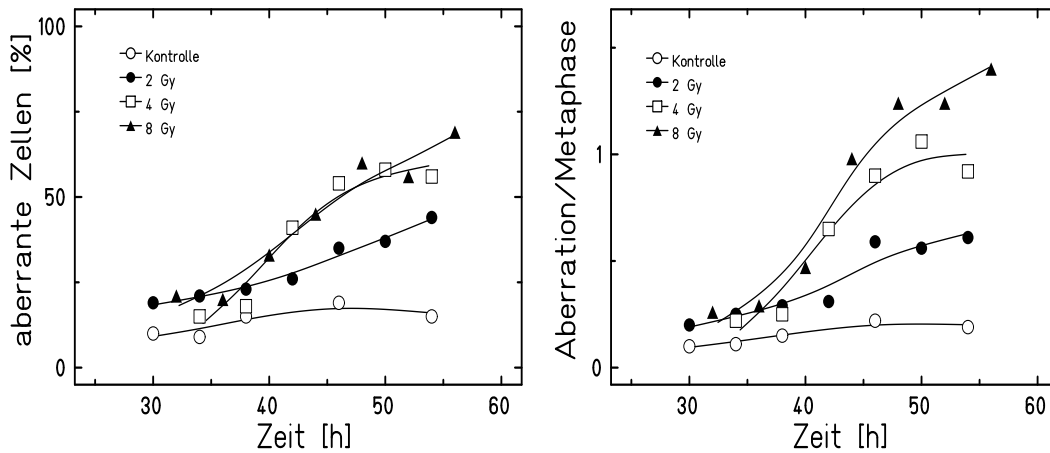


Abbildung 4.22: Anteil an aberranten Metaphasen (links) und Aberrationen pro Metaphase (rechts) in Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit nach Bestrahlung mit 9,9 MeV/u Nickel-Ionen (LET 2450 KeV/μm). Je Dosis- und Zeitpunkt wurden 100 Zellen in der 1. Mitose nach Bestrahlung ausgewertet. Die Aberrationsrate steigt mit Dosis und Zeit deutlich an. Auch für späte Zeitpunkte wird kein Plateau erreicht. Die Fehlerbalken sind kleiner als die Symbolgröße.

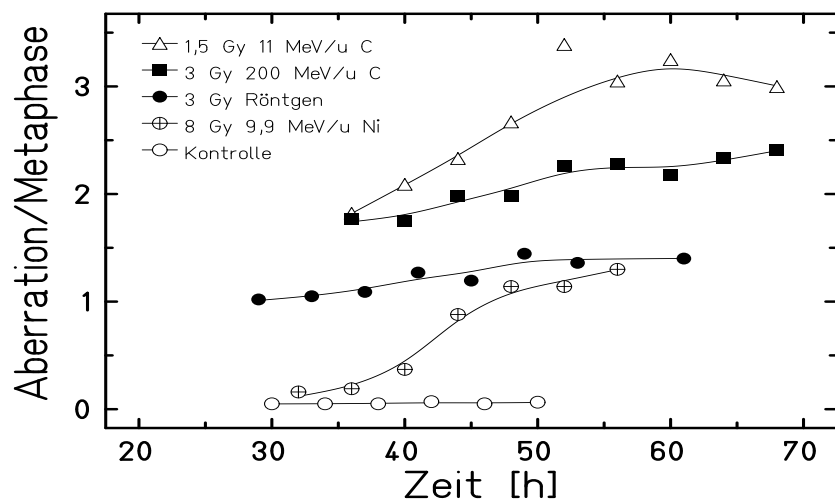


Abbildung 4.23: Aberrationen pro Metaphase bei etwa 20 % Überleben als Funktion der Zeit nach Bestrahlung mit Röntgen-Strahlung (E.Nasonova, persönliche Kommunikation), 200 MeV/u Kohlenstoffionen (E.Nasonova, persönliche Kommunikation), 11 MeV/u Kohlenstoffionen und 9,9 MeV/u Nickelionen. Da hier Daten der vorliegenden Arbeit (11 MeV/u C und 9,9 MeV/u Ni) sowie von E.Nasonova (persönliche Kommunikation) dargestellt sind, wurden die Werte für 11 MeV/u C um 0,15, die Werte für 9,9 MeV/u Ni um 0,10 Aberrationen pro Metaphase korrigiert. Die Korrekturwerte stellen die Differenz der Aberrationsraten der jeweiligen Kontrollpopulationen dar.

späteren Zeitpunkten hin zu und trägt damit zu ansteigenden Aberrationsraten bei. Die vollständigen Verteilungsdaten sind in Anhang C zusammengestellt.

Zeitlich veränderliche Aberrationsraten bewirken, daß auch die daraus erhaltenen Dosis-Effekt-Kurven zeitabhängig sind. In Abbildung 4.25 sind die Aberrationsraten für die verschiedenen Strahlenarten für 36 h und 65 h bzw. für Nickelionen für 54 h über der Dosis dargestellt. Die Kurven für die späteren Probenahmezeitpunkte sind mit steigendem LET zu höheren Aberrationsraten hin verschoben, wie sich in den hieraus berechneten RBWs widerspiegelt (Tabelle 4.3). Um Aussagen über das Ausmaß des Gesamtschadens zu erhalten ist es daher notwendig, die Daten, wie in Abschnitt 3.4.9.3 beschrieben, über viele Zeitpunkte zu messen und die einzelnen Werte zu integrieren.

4.2.6.2 Analyse der Daten

Der Schaden in der Gesamtpopulation wurde wie in Abschnitt 3.4.9.3 beschrieben bestimmt. Dieser Analyse liegen die Untersuchungen des Proliferationsverhaltens zugrunde, deren Ergebnisse in Abschnitt 4.2.4 beschrieben sind. Die im vorigen Abschnitt ermittelten Anteile aberranter Zellen und Aberrationsraten wurden mit den korrigierten Mitoseindizes der 1. Mitosen gewichtet und damit

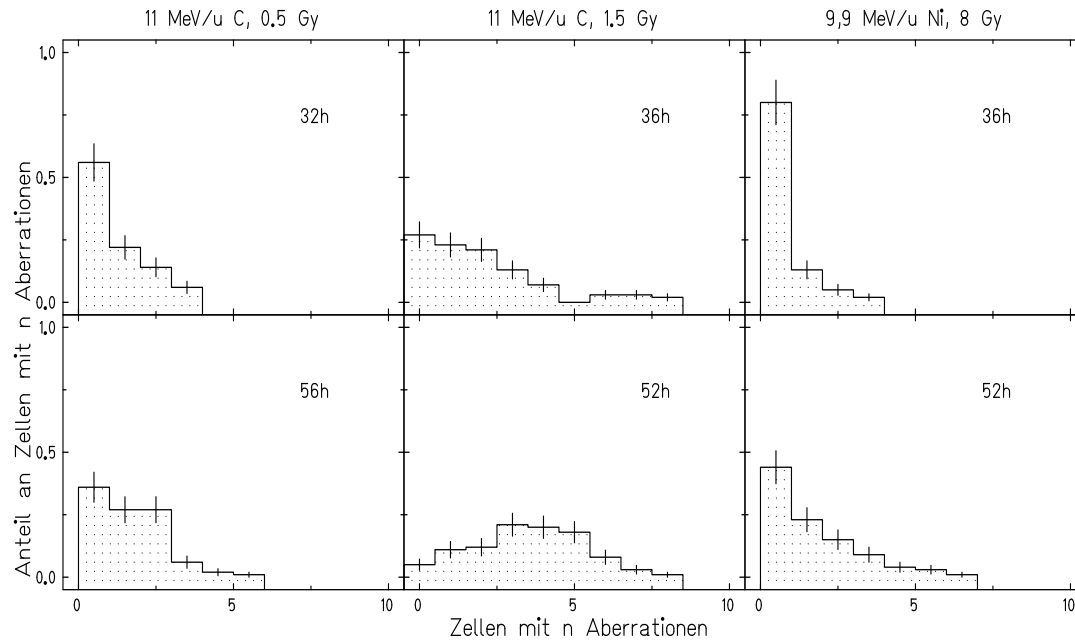


Abbildung 4.24: Veränderung der Verteilung der Anzahl Aberrationen pro Zelle nach Bestrahlung mit 11 MeV/u Kohlenstoffionen (0,5 Gy links, 1,5 Gy mitte) und mit 9,9 MeV/u Nickelionen (rechts) in den Zellen, die die erste Mitose erreichen. Während zu frühen Sammelzeitpunkten vorwiegend ungeschädigte Zellen die Mitose erreichen (links), nimmt die Anzahl von Zellen mit mehreren Aberrationen zu späteren Zeitpunkten zu.

der „gewichtete Anteil aberranter Metaphasen“ und die „gewichtete Aberrationsrate“ bestimmt. Diese ist in Abbildung 4.26 für AG-Zellen nach Bestrahlung mit 11 MeV/u Kohlenstoffionen und 9,9 MeV/u Nickelionen dargestellt. Durch hohe Mitoseindizes der Kontrollpopulationen und den Abfall der Mitoseindizes mit zunehmender Dosis kommt es z.T. zu einer Umkehr der in den Rohdaten beobachteten Effekte (Abbildung 4.26). So ist die jeweils höchste verwendete Dosis (1,5 Gy C und 8 Gy Ni) nach Wichtung weniger effektiv als die jeweils niedrigere Dosis (1,0 Gy C und 4 Gy Ni). Die Anzahl aberranter Zellen in den unbestrahlten Populationen erreicht ähnliche Werte, wie die am höchsten bestrahlten Zellen, im Fall von Nickelionen sogar höhere. Auch in den integrierten Daten, die den „Gesamtschaden“ in Abhängigkeit von der Dosis wiedergeben, zeigt sich der starke Einfluß von Zellzyklusarresten und vorzeitiger Zelldifferenzierung, die durch Strahlung bewirkt werden. In Abbildung 4.27 ist dieser Einfluß insbesondere für Nickelionen (rechts) deutlich zu sehen.

Für Kohlenstoff gibt es zunächst eine eindeutige Dosisabhängigkeit von 0 über 0,5 auf 1 Gy steigt die Ausbeute aberranter Zellen an. Bei der höchsten Dosis

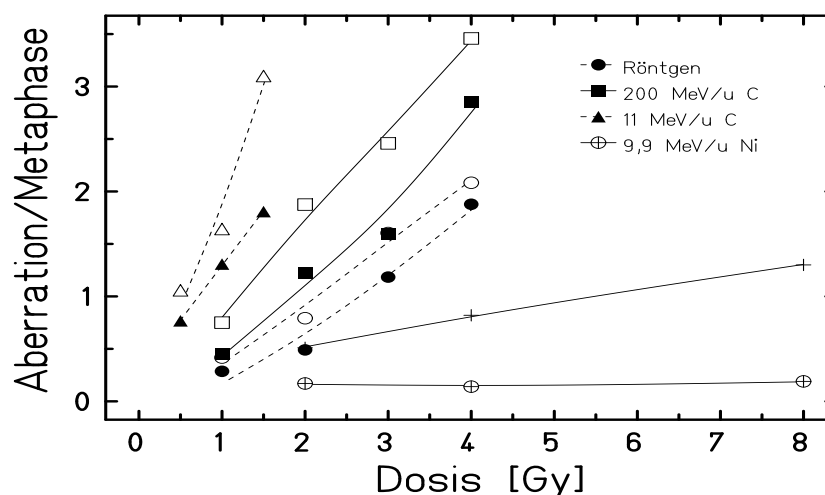


Abbildung 4.25: Aberrationen pro Metaphase in Abhängigkeit von der Dosis nach Bestrahlung mit Röntgen-Strahlung, 200 MeV/u Kohlenstoffionen, 11 MeV/u Kohlenstoffionen und 9,9 MeV/u Nickelionen. Die gezeigten Dosis-Effekt-Kurven sind für alle Strahlenarten aus den Aberrationsraten nach 36 h (geschlossene Symbole) und für Röntgen- und Kohlenstoffbestrahlung nach 65 h, sowie für Nickelionen nach 54 h (offene Symbole) bestimmt worden. Der enorme Einfluß der Probenahmezeit wird an diesen Kurven deutlich. Da hier Daten aus der vorliegenden Arbeit (11 MeV/u C und 9,9 MeV/u Ni) von E.Nasonova (persönliche Kommunikation) (Röntgen und 200 MeV/u C) dargestellt sind, wurden die Werte für 11 MeV/u C um 0,15, die Werte für 9,9 MeV/u Ni um 0,10 Aberrationen pro Metaphase korrigiert. Die Korrekturwerte stellen die Differenz der Aberrationsraten der jeweiligen Kontrollpopulationen dar.

von 1,5 Gy überwiegt die Zellzyklusarrest bedingte Abnahme des Mitoseindex den dosis bedingten Zuwachs an Aberrationen, so daß das Plateau von 1,5 Gy bestrahlten Zellen später erreicht wird. Für Nickelionen ist die Dosisabhängigkeit generell umgekehrt: 2 Gy liefert die höchste Ausbeute, mit steigender Dosis erreicht die 4 Gy Kurve erst mit Zeitverschiebung den 2 Gy-Wert während die 8 Gy-Kurve deutlich niedriger liegt. Allerdings wird bei Nickelionen schon nach einer relativ kurzen Zeit von 50 h das Plateau bei kleinen Dosen erreicht. Abbildung 4.28 zeigt die Ergebnisse der Integration der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten und der von E.Nasonova (persönliche Kommunikation) bestimmten Werte in Abhängigkeit von der Dosis. Die integrierten Daten beziehen sich jeweils auf die Population zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Da in den verschiedenen Experimenten das Proliferationsverhalten der Zellen unterschiedlich war, wurden die Daten so korrigiert, daß in allen Experimenten die gleiche Anzahl Zellen der Kontrollpopulation die erste Mitose nach Lösen der Kontaktinhibition erreicht. Nach Anwendung dünnionisierender Strahlung steigt der Anteil aberranter Zellen mit der Dosis zunächst an, erreicht dann jedoch zwischen 2 und 3 Gy ein Maximum von ca. 10 aberranten Zellen je 100 Zellen der Ausgangspopulation

$RBW_{Aberrationen}$	200 MeV/u C	11 MeV/u C	9,9 MeV/u Ni
36 h	1.43	2.81	<0.1
65 h	1.68	3.79	0.40

Tabelle 4.3: RBW berechnet aus den Aberrationsraten nach 36 h und 64 h (bzw. 54 h für Ni). Mit steigender Probennahmezeit nach Bestrahlung steigt der RBW deutlich an. Die Werte beziehen sich ausschließlich auf Zellen in der 1. Mitose nach Bestrahlung.

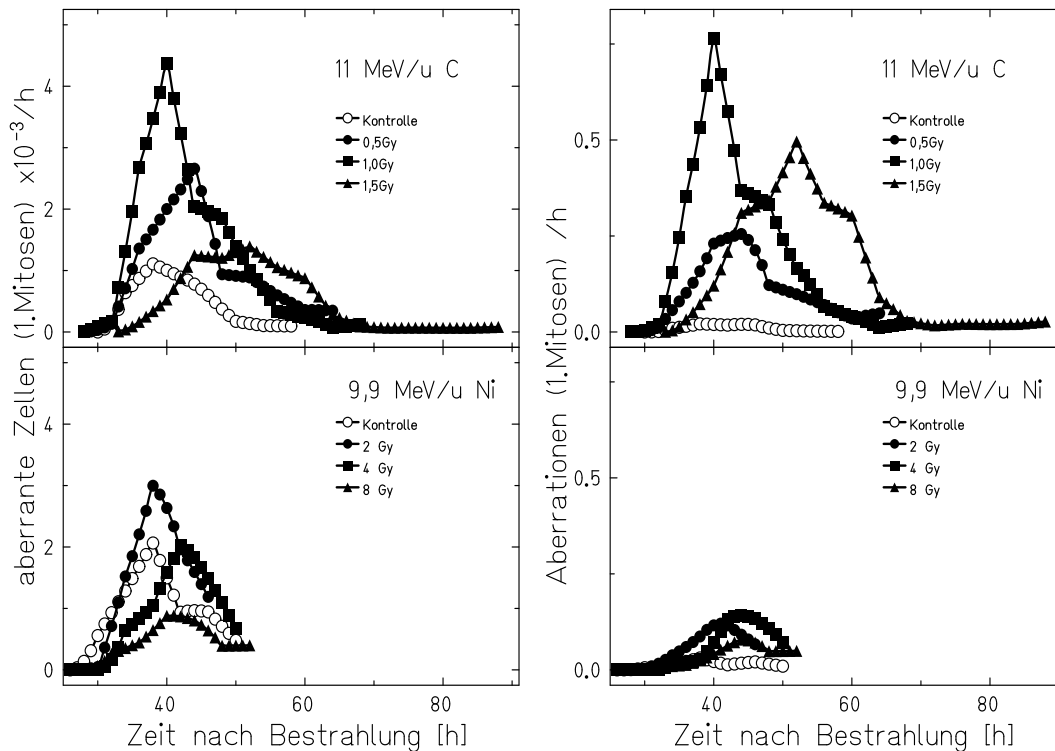


Abbildung 4.26: Gewichtete Anteile aberranter Zellen (links) und Aberrationen pro Metaphase (rechts) in Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit nach Bestrahlung von AG-Zellen mit 11 MeV/u Kohlenstoffionen (oben) und 9,9 MeV/u Nickelionen (unten). Der Wichtung der aberranten Zellen bzw. der Aberrationen pro Metaphase in einem Meßintervall (hier 4 h) mit dem korrigierten Index 1. Mitosen folgte die Skalierung auf 1 h-Intervalle.

und fällt danach wieder leicht ab. Die Aberrationen je Metaphase nehmen nach einem anfänglichen Anstieg bis 0,15 bei 2 Gy nicht weiter zu. Die Bestrahlung mit 11 MeV/u Kohlenstoffionen mit einem LET von $150 \text{ keV}/\mu\text{m}$ bewirkt einen sehr steilen Anstieg der Anzahl abnormer Zellen mit der Dosis auf bis zu 18 % nach 1 Gy, der Wert fällt aber ebenso schnell wieder ab. Nach Bestrahlung mit

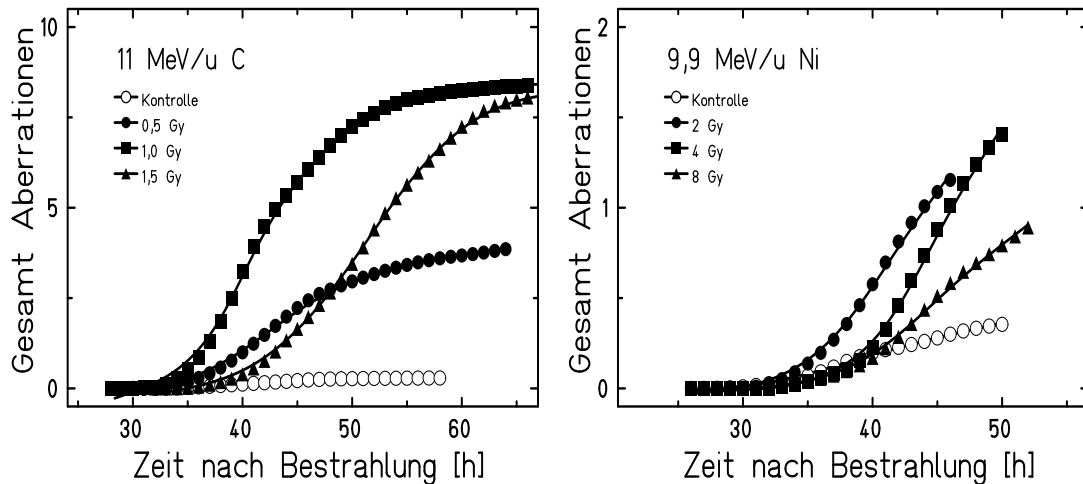


Abbildung 4.27: Die Integration der Aberrationsrate über die Zeit führt zum Gesamtschaden nach Bestrahlung mit 11 MeV/u Kohlenstoffionen (links) und mit 9,9 MeV/u Nickelionen (rechts) in den Zellen, die die erste Mitose erreichen. Die Daten beziehen sich auf eine Ausgangspopulation von jeweils 100 Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung.

Nickelionen mit einem LET von $2450 \text{ keV}/\mu\text{m}$ bleibt die Anzahl aberranter Zellen konstant auf dem Kontrollniveau. Die Anzahl der Aberrationen je Metaphase zeigt ein ähnliches Verhalten, mit der Dosis Nickelionen verändert sie sich nicht, nach Kohlenstoffbestrahlung ($153 \text{ keV}/\mu\text{m}$) folgt ein steiler Anstieg auf 0,3 Aberrationen je Metaphase bei 1 Gy.

Sowohl höhere Dosen als auch ein erhöhter LET führen zur Abnahme der Aberrations-Ausbeute. Außerdem bewirkt die Abnahme der untersuchten Mitosen ebenfalls eine Reduktion der absoluten Ausbeute. Die gewonnenen Daten drücken demnach die Kombination von Zellzykluseffekten und Chromosomenschäden aus. Die hieraus bestimmten RBW-Werte sind zum Vergleich in Abschnitt 5.5 aufgeführt.

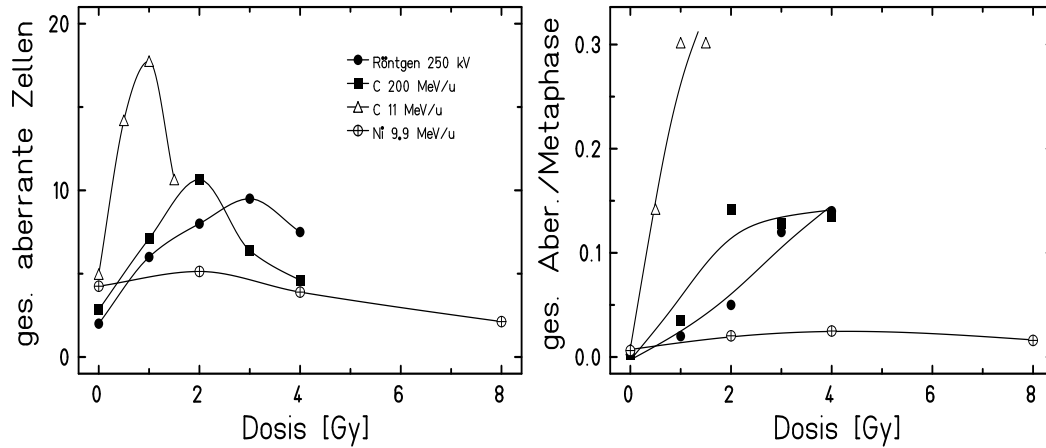


Abbildung 4.28: Anteile aberranter Metaphasen (links) und Aberrationen pro Metaphase (rechts) im Bezug auf die Ausgangspopulation zum Zeitpunkt 0 h nach Integration der Daten in Abhängigkeit von der Dosis nach Bestrahlung mit Röntgen-Strahlung, 200 MeV/u Kohlenstoffionen, 11 MeV/u Kohlenstoffionen und 9,9 MeV/u Nickelionen. Da hier Daten der vorliegenden Arbeit (11 MeV/u C und 9,9 MeV/u Ni) sowie Daten von E.Nasonova (persönliche Kommunikation) (Röntgen und 200 MeV/u C) aus verschiedenen Experimenten dargestellt sind, wurden die Werte auf einen gleichen Anteil von Zellen, die die erste Mitose erreichen, in der jeweiligen Kontrollpopulation korrigiert.

4.3 Einfluß von Bromdesoxyuridin

Wie in der Literatur beschrieben wird [Rutter et al., 1973, Scott und Lyons, 1979, Morris, 1991], hat BrdU in niedrigen Konzentrationen keinen störenden Einfluß auf Untersuchungen an humanen Fibroblasten. In den in Teil II dargestellten Experimenten traten jedoch unerwartete Ergebnisse auf, wie z.B. das Ausbleiben eines stetigen Anstiegs von BrdU-markierten Zellen mit der Zeit in der S-Phasen-Markierung (Abbildung 4.11) oder in durchflußzytometrischen Untersuchungen (Abbildungen 4.13 und 4.14). Der Einfluß des eingesetzten BrdU auf die verwendeten Zellen wurde an Hand der unter 3.5 beschriebenen Messungen untersucht. Nachdem sich schon zu Beginn der Experimente zeigte, daß Deoxycytidin (dC) auf AG-Zellen nicht, wie in der Literatur beschrieben [Moore und Hurlbert, 1966, Bjursell und Reichard, 1973], die cytotoxischen Effekte von BrdU aufhebt, wurden nur vereinzelte Versuche mit dC durchgeführt.

4.3.1 Koloniebildungstest

Als erster Parameter wurde der Einfluß von BrdU auf das klonogene Überleben untersucht. Es wurde BrdU in Konzentrationen von 0, 5 und 10 $\mu\text{mol/l}$ von zwei verschiedenen Herstellern, sowie BrdU in Kombination mit dC verwendet. In BrdU-freiem Medium betrug die PE der AG-Zellen $33 \pm 5 \%$. Das Überleben von Zellen in Anwesenheit von BrdU war in drei vollständig unabhängigen Experimenten nicht bestimmbar, da auch bei sehr unterschiedlicher Einsaat (330 - 20.000 Zellen je Flasche) maximal drei Kolonien gebildet wurden, was für die Berechnung des Überlebens nicht ausreichend war. Nach dem Färben waren in den Flaschen viele Zellen zu sehen, die sich nur wenige Male geteilt hatten. Die Zugabe von BrdU verhindert demnach die vielfache Teilung der Zellen und damit die Koloniebildung.

4.3.2 Laktat-Dehydrogenase-Messung

Im Laktat-Dehydrogenase-Test (3.4.6) wurden die Auswirkungen verschiedener BrdU-Konzentrationen (0, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/l}$) zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72, 96 h) untersucht. Im Verlauf des Experimentes kam es nicht zu einem dsisabhängigen Anstieg des Anteils toter Zellen. In mit BrdU behandelten Zellen und Kontrollzellen betrug der Anteil toter Zellen $8,5 \pm 3,3 \%$.

4.3.3 Wachstumskinetik

Die Untersuchung der Wachstumskinetik unbestrahlter und bestrahlter Zellen (siehe 3.4.2) wurde ohne und mit $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU durchgeführt. Die Meßdauer wurde dabei auf bis zu 160 h im Falle der AG- und NHLF-Zellen, im Falle der GMC-Zellen auf bis zu 500 h ausgedehnt. Die Zugabe von BrdU zum Kultur-

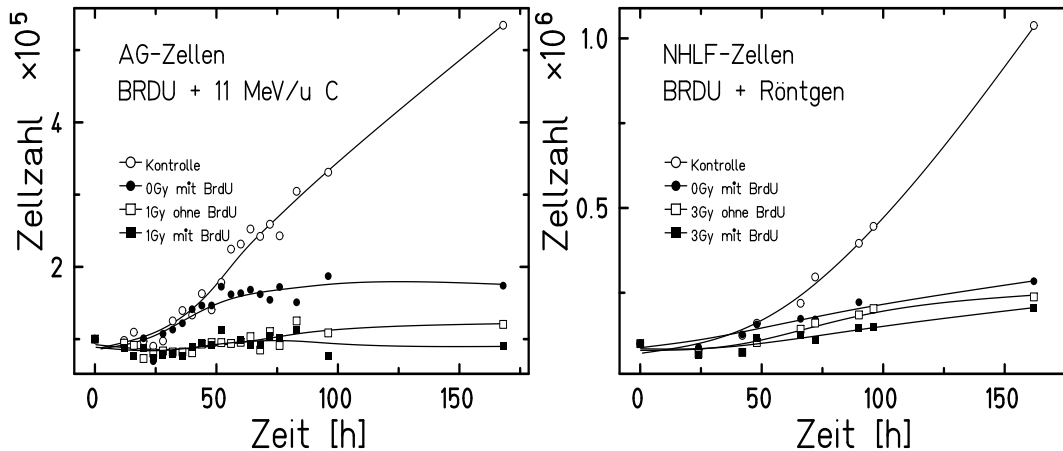


Abbildung 4.29: Wachstumskurven zweier verschiedener Fibroblastenlinien, jeweils ohne BrdU (offene Symbole) und nach Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU zum Kulturmedium (geschlossene Symbole). Es wurden unbestrahlte und bestrahlte Zellen untersucht. Wachstumskinetik von AG-Zellen: es wurden zur Bestrahlung 11 MeV/u Kohlenstoff-Ionen verwendet (links). Wachstumskinetik von NHLF-Zellen: es wurde mit Röntgenstrahlung bestrahlt (rechts).

medium führte bei AG- und NHLF-Zellen nach etwa 50 h zum Abknicken der Wachstumskurven, danach blieb die Zellzahl konstant (Abbildung 4.29). Auch die äquimolare Zugabe von dC bewirkte keine Verbesserung (ohne Abbildung). Im Fall von GMC-Zellen war das Abknicken der Kurve verspätet zu beobachten (etwa 150 h, ohne Abbildung), was mit dem insgesamt langsameren Wachstum der GMC-Zellen erklärt werden kann (Abbildung 4.3). Die Wachstumshemmung durch BrdU im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen betrug nach 150 h in den unbestrahlten AG-Zellen 67 %, in NHLF-Zellen 73 % und in GMC-Zellen 40 %. Im Gegensatz dazu wird in bestrahlten AG-, NHLF- und GMC-Zellen die durch BrdU bewirkte Hemmung vom Einfluß der Strahlung überwogen, wie Abbildung 4.29 für AG- und NHLF-Zellen zeigt (GMC-Zellen ohne Abbildung).

Um festzustellen, ob die beobachtete Wachstumshemmung reversibel ist, wurden unbestrahlte Zellen in BrdU-haltigem Medium kultiviert und nach unterschiedlichen Zeiten nach einem Mediumwechsel wieder in BrdU-freiem Medium kultiviert. Abbildung 4.30 gibt die so ermittelten Wachstumskurven wieder. Es zeigt sich

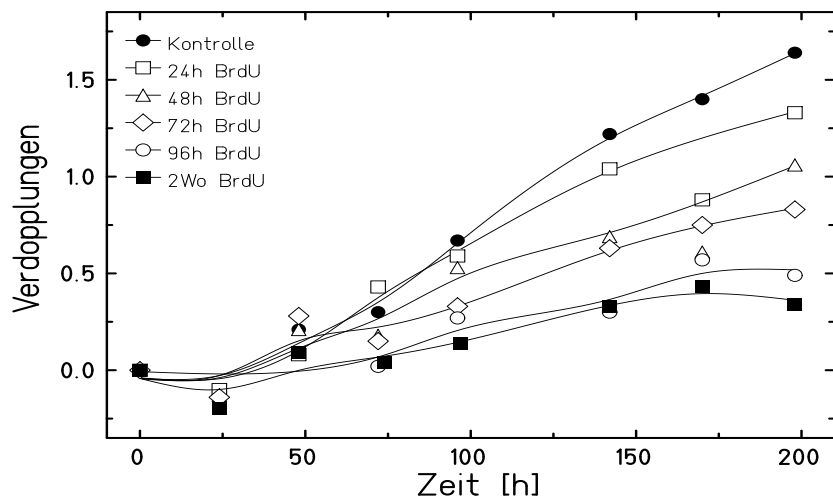


Abbildung 4.30: Wachstumskurven unbestrahlter AG-Zellen nach Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU zum Kulturmedium. Nach den angegebenen Einwirkzeiten wurde das Medium gegen BrdU-freies Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden insgesamt 8 Tage kultiviert.

deutlich, daß der Effekt von BrdU nicht umkehrbar ist, denn die Zellen wachsen zwar nach Mediumwechsel wieder besser, erreichen aber den Kontrolllevel weder in der Zellzahl, noch in der Wachstumssteigerung. Auch sehr kurze Einwirkzeiten bewirken diesen Effekt, der mit der Zeit jedoch zunimmt.

Die Experimente zeigen, daß BrdU das Zellwachstum stark hemmt und dieser Effekt mit steigender Einwirkzeit zunimmt.

4.3.4 Durchflußzytometrische Untersuchung des Zellzyklus

Zur durchflußzytometrischen Analyse des Zellzyklus wurden die AG-Zell-Proben im Anschluß an die oben beschriebene Bestimmung der Zellzahl (4.3.3) zentrifugiert und für die Analyse fixiert (3.4.5).

In Abbildung 4.31 ist der Verlauf der Zellzyklusphasen nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Zeit in einer unbestrahlten (links) und einer mit 3 Gy Röntgen bestrahlten Zellpopulation (rechts) gezeigt. Direkt nach der Bestrahlung erfolgte die Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU zum Zellkulturmedium. In beiden Populationen kommt es etwa 50 h nach Zugabe von BrdU zum Stillstand der Zellproliferation und zur Arretierung der Zellen in derjenigen Zyklusphase, in der sie sich gerade befinden, wie sich in ausgedehnten Plateaus der Kurven zeigt. Auch nach 144 h sind selbst die Zellen der unbestrahlten Population nicht in der Lage, den durch BrdU vermittelten Zellzyklusarrest zu überwinden. Vergleichbare Ergebnisse wurden nach Bestrahlung mit 1 Gy 11 MeV/u Kohlenstoffionen erhalten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß BrdU im Gegensatz zu den üblichen Annahmen [z.B. Rutter et al., 1973] erheblichen Einfluß auf den Zellzyklus hat.

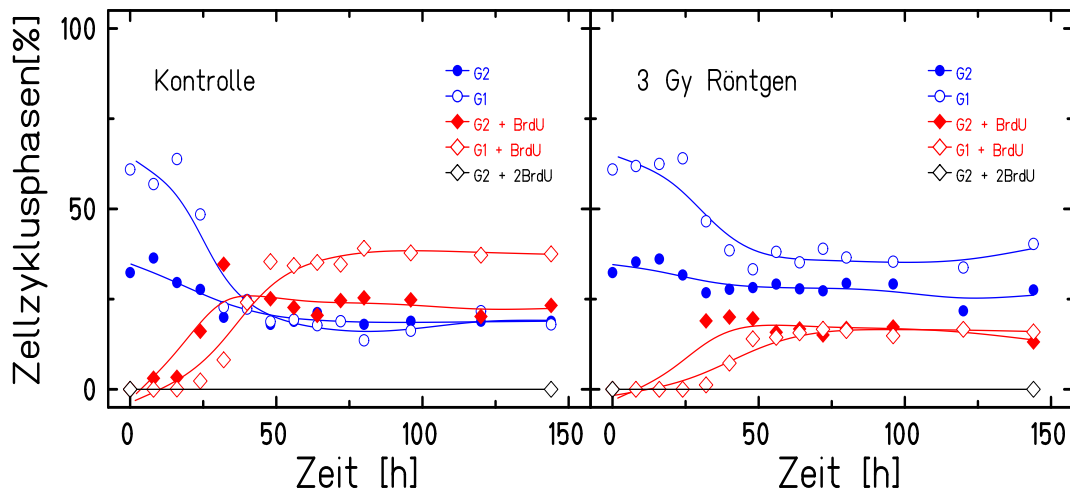


Abbildung 4.31: Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellzyklusphasen in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung in einer unbestrahlten (links) und einer mit 3 Gy Röntgen bestrahlten Zellpopulation (rechts). In beiden Populationen kommt es etwa 50 h nach Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU zur Ausbildung ausgedehnter Plateaus der Kurven. Das Kürzel „+BrdU“ kennzeichnet Zellen, die eine S-Phase durchlaufen haben. Nach einer weiteren S-Phase lautet es „+2BrdU“ (siehe auch 4.2.4).

4.3.5 Differenzierungsmuster

Der Einfluß von BrdU auf das Differenzierungsmuster der AG-Zellen wurde nach unterschiedlichen Einwirkzeiten untersucht (Abbildung 4.32). Mit steigender Einwirkzeit verschob sich das Differenzierungsmuster der AG-Zellen zu höheren Differenzierungsstadien. So sank der Anteil von Zellen im mitotisch aktiven Stadium MFII von $59 \pm 10 \%$ auf Null, während gleichzeitig der Anteil postmitotischer Fibroblasten PMF von $13 \pm 2 \%$ auf $80 \pm 5 \%$ stieg. Da die morphologische Auswertung der Daten keine absolute Messung ist, sondern von der Erfahrung der auswertenden Person abhängt, schwanken die Werte besonders bei kleinen Messwerten um bis zu $\pm 30 \%$.

Die Zugabe des BrdU erfolgte in diesem Experiment erst nach Anheftung der Zellen. Die Summe der ausgewerteten Zellen war zeitlich konstant.

Der Einfluß von BrdU wurde auch nach Bestrahlung mit 3 Gy Röntgenstrahlung untersucht. In diesen Versuchen wurde zusätzlich dC in äquimolarer Menge verwendet. In Abbildung 4.33 sind die Differenzierungsmuster von AG-Zellen ohne

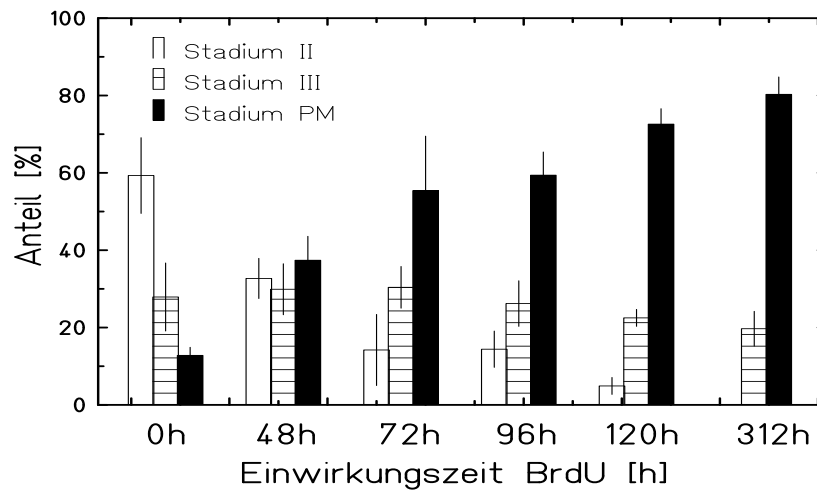


Abbildung 4.32: Differenzierungsmuster unbestrahlter AG-Zellen nach Zugabe von BrdU zum Kulturmedium. Die Zellen wurden in BrdU-freiem Medium ausgesät und nach dem Anheften (ca. 3 h) mit $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU versetzt. Nach den angegebenen Einwirkzeiten wurde das Medium wieder gegen BrdU-freies Medium ausgetauscht und die Zellen für insgesamt 13 Tage (312 h) kultiviert.

Bestrahlung (oben) und nach 3 Gy Röntgenstrahlung (unten) nach verschiedenen Einwirkzeiten von BrdU dargestellt.

In Kontrollzellen ergaben die Anteile der einzelnen Differenzierungsstadien im Mittel $36 \pm 4 \%$ MFII, $47 \pm 3 \%$ MFIII und $17 \pm 2 \%$ PMF. Nach Bestrahlung verschoben sich die Anteile an den einzelnen Stadien zu höheren Differenzierungsstufen hin. Es ergaben sich im Mittel $17 \pm 6 \%$ MFII, $44 \pm 3 \%$ MFIII und $39 \pm 5 \%$ PMF. Dabei verändert BrdU die Wirkung der Strahlung auf die Differenzierung der Zellen nicht.

Die Summe der ausgewerteten Zellen nahm mit steigender Einwirkzeit ab. Da die Zellen im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Versuch in BrdU-haltigem Medium ausgesät wurden, übt die Anwesenheit von BrdU Einfluß auf die Anheftung der Zellen aus.

Die Ergebnisse zeigen, daß BrdU in der Lage ist, die Differenzierung humaner Hautfibroblasten zu beschleunigen. Die Anheftung der Zellen wird ebenfalls verändert, wodurch z.B. in Abbildung 4.33 der Anstieg postmitotischer Zellen vollständig unterdrückt wurde. Der erste Eingriff des BrdU in die Vorgänge der Zellen kann damit nicht erst nach einem Einbau in die DNA erfolgen, sondern findet bereits während der Anheftung der Zellen statt.

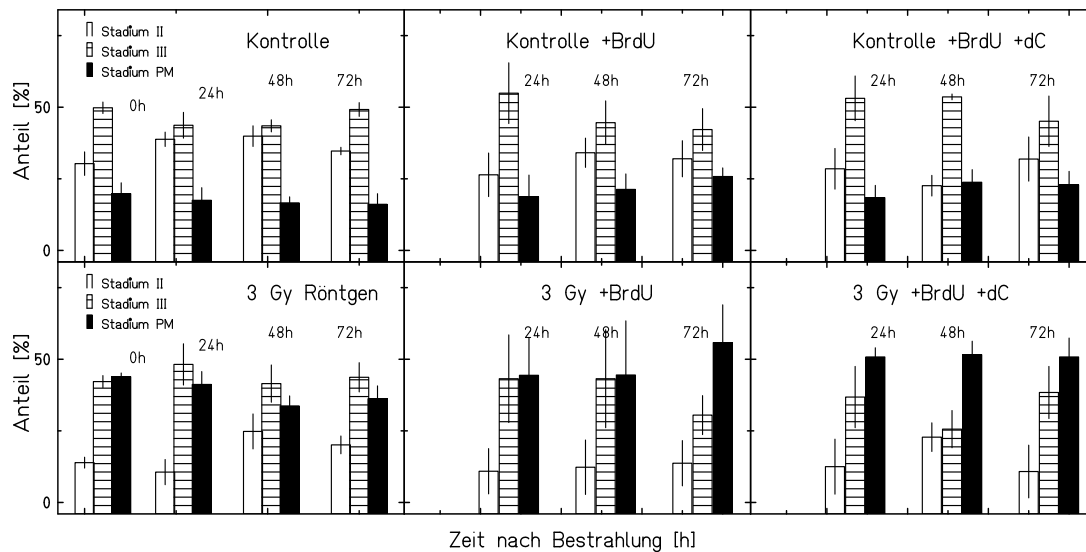


Abbildung 4.33: Differenzierungsmuster von AG-Zellen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit von $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU bzw. je $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU + dC nach Bestrahlung mit 3 Gy Röntgenstrahlung (Überlebensniveau 10 %; unten) und in einer unbestrahlten Kontrollpopulation (oben). Die Zellen wurden direkt im Anschluß an die Bestrahlung in BrdU-freiem, BrdU-haltigem bzw. BrdU + dC-haltigem Medium ausgesät.

4.3.6 Schwester-Chromatiden-Austausch (SCE)

In Untersuchungen im Hinblick auf die Induktion von SCEs in AG-Zellen wurden verschiedene Konzentrationen von BrdU ($0, 10, 20, 40, 80 \mu\text{mol/l}$) verwendet (Abschnitt 3.4.10) und nach 48 h Chromosomenpräparate angefertigt. Nach der differentiellen Färbung der Chromosomen wurden die Proben auf SCEs hin untersucht und die Anteile erster und zweiter Mitosen bestimmt (Abbildung 4.34). Die Anzahl SCEs je Chromosom nimmt mit steigender BrdU-Konzentration zu und geht für hohe Konzentrationen ($\geq 40 \mu\text{mol/l}$ BrdU) in Sättigung über. Gleichzeitig nimmt der Mitoseindex ab wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird. Auch der Anteil zweiter Mitosen an der Gesamtzahl Mitosen sinkt. Das Verhältnis erste zu zweite Mitosen steigt damit mit wachsender BrdU-Konzentration, was auf eine zunehmende Zellzyklus-Verzögerung hinweist.

4.3.7 Mitose-Index

Der Mitose-Index (3.4.9) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne Zusatz von BrdU in bestrahlten und unbestrahlten Zellen bestimmt. Auf einen Zusatz von dC wurde verzichtet, da in den vorhergehenden Tests kei-

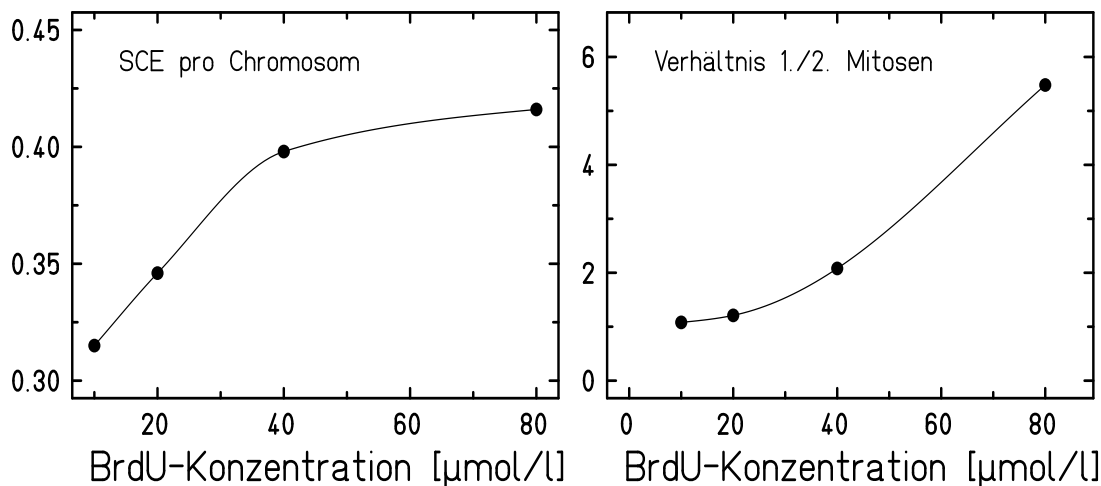


Abbildung 4.34: SCEs pro Chromosom in Abhängigkeit von der Konzentration BrdU im Zellkulturmedium 48 h nach Lösen der Kontaktinhibition. Mit zunehmender Konzentration steigt die Anzahl SCEs je Chromosom (links). Verhältnis 1. zu 2. Mitosen in Abhängigkeit von der Konzentration BrdU im Zellkulturmedium. Die Anzahl 2. Mitosen geht mit steigender BrdU-Konzentration deutlich zurück (rechts).

ne Verminderung der Toxizität von BrdU festgestellt werden konnte. In den in Abbildungen 4.35 und 4.36 gezeigten Experimenten senkt die Zugabe von BrdU deutlich den Mitoseindex. Der maximale Wert unbehandelter Zellen wird nach Zugabe von 10 µmol/l BrdU nur noch zu 40 - 55 % erreicht. Außerdem wird kein zweites Maximum erreicht, wie es in den unbehandelten Zellen bzw. nur bestrahlten Zellen nach 60 - 70 h auftritt (Abbildung 4.36). Die Integration des Mitoseindex über die Dauer der Messung zeigt, daß nach Zugabe von BrdU weniger Zellen die Mitose erreichen. Nach Bestrahlung mit Röntgen- oder Nickelstrahlung ergibt sich ein vergleichbares Bild.

4.3.8 Chromosomen-Analyse

Die Aberrationsrate (3.4.9) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit und ohne Zusatz von 10 µmol/l BrdU in bestrahlten und unbestrahlten Zellen bestimmt. Auf einen Zusatz von dC wurde verzichtet, da in den vorhergehenden Tests keine Minderung der Toxizität von BrdU festgestellt werden konnte.

Die Daten der Chromosomenanalysen mit und ohne BrdU sind in den Tabellen des Anhang C zusammengefaßt. Wie Abbildung 4.37 deutlich zeigt, beeinträchtigt die Zugabe von BrdU die Anzahl von Chromosomenschäden nach Röntgenbestrahlung nicht.

Nach Bestrahlung mit 4 Gy 9,9 MeV/u Nickelionen zeigt sich dagegen ein anderes

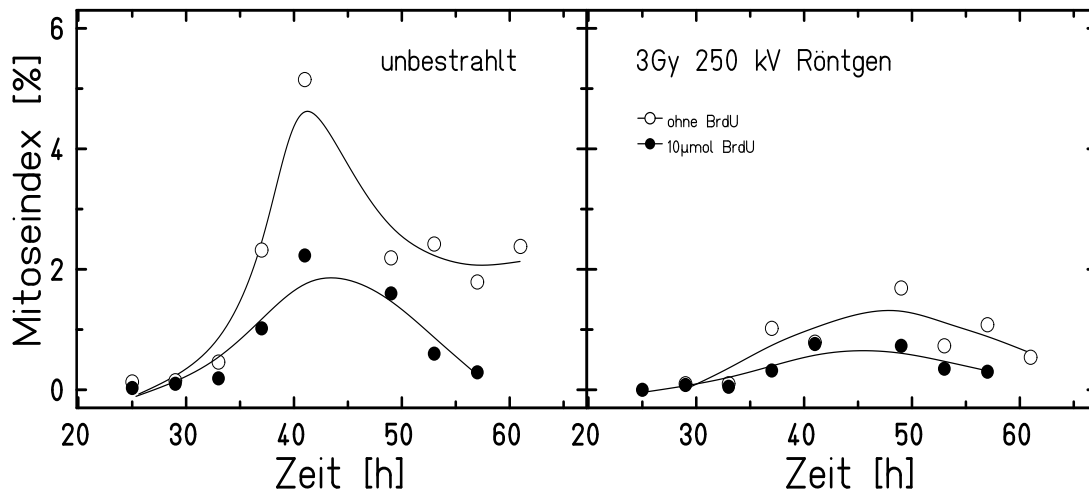


Abbildung 4.35: Mitoseindex unbestrahlter (links) und mit 250 kV Röntgen (rechts) bestrahlter AG-Zellen, jeweils ohne BrdU (offene Symbole) und nach Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU zum Kulturmedium (geschlossene Symbole).

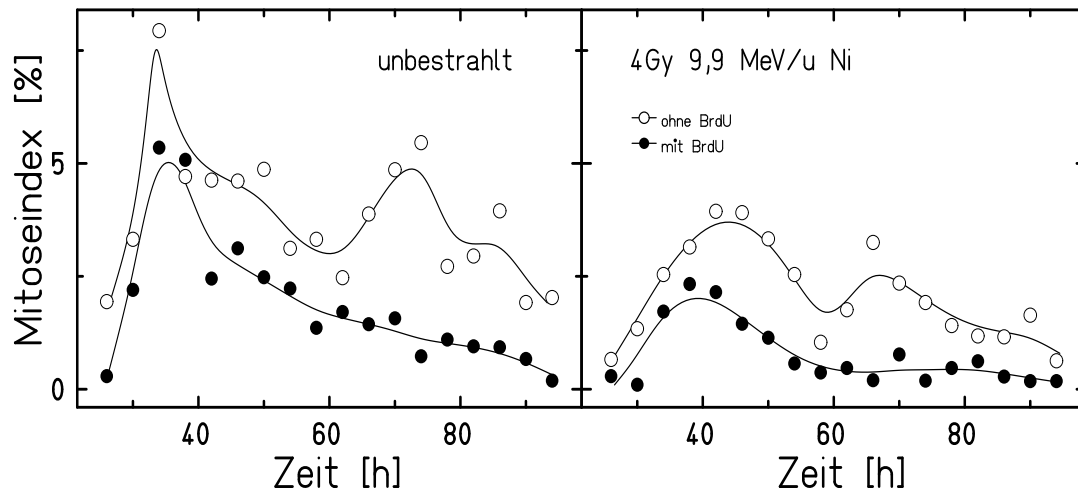


Abbildung 4.36: Mitoseindex unbestrahlter (links) und mit $9,9 \text{ MeV/u Ni}$ (rechts) bestrahlter AG-Zellen, jeweils ohne BrdU (offene Symbole) und nach Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU zum Kulturmedium (geschlossene Symbole).

Bild. Für frühe Zeitpunkte bewirkt BrdU keine Änderung der Schadensausbeute. Nach 45 h aber ergibt sich eine deutliche Differenz zwischen den Aberrationsraten mit und ohne BrdU-Einfluß, wie Abbildung 4.38 wiedergibt. Diese Differenz kann mit der Verdünnung der Aberrationsraten durch gering geschädigte 2. Mitosen

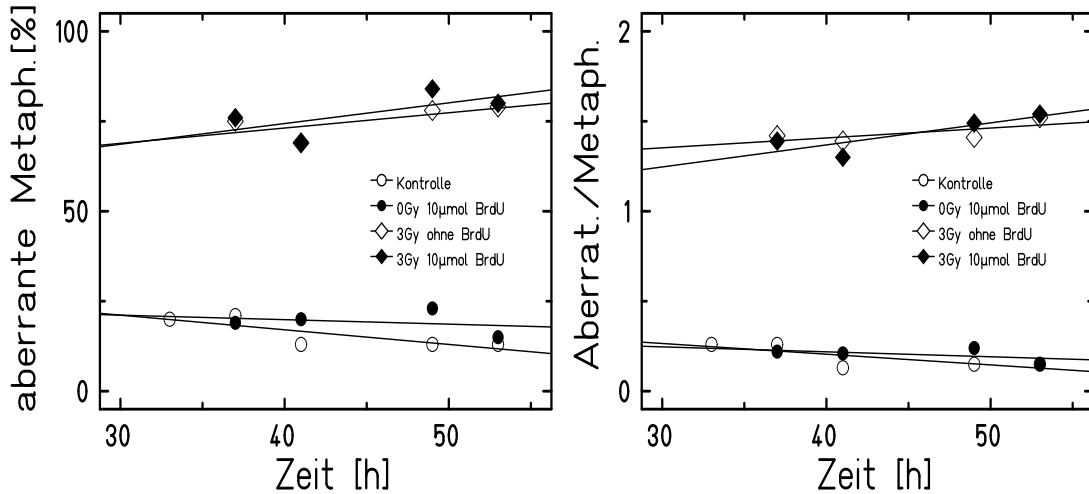


Abbildung 4.37: Anzahl aberranter Metaphasen und Aberrationsrate in unbestrahlten und mit 250 kV Röntgenstrahlung behandelten AG-Zellen, jeweils ohne BrdU (offene Symbole) und nach Zugabe von 10 μmol BrdU zum Kulturmedium (geschlossene Symbole). Die Zugabe von BrdU hat keinen Einfluß auf die Anzahl von Chromosomenschäden nach Röntgenbestrahlung.

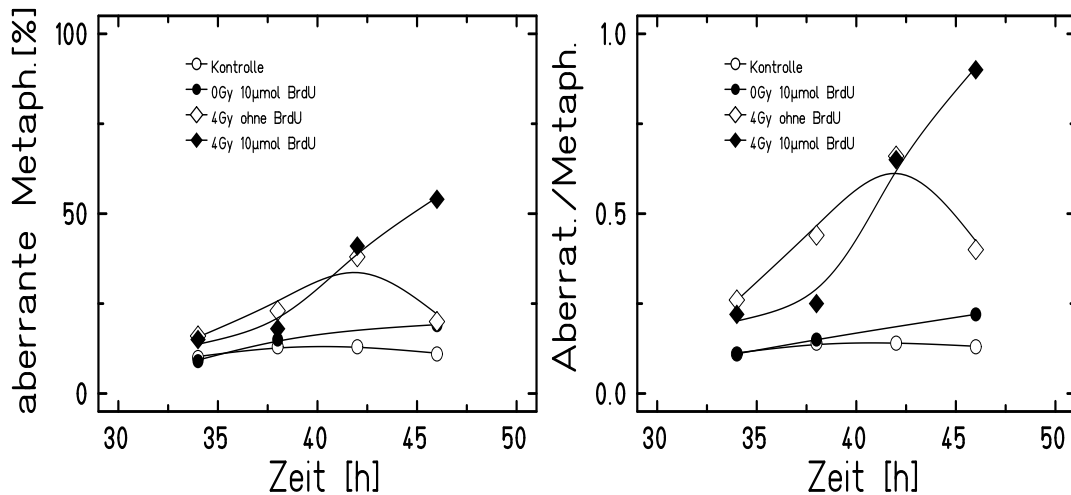


Abbildung 4.38: Anzahl aberranter Metaphasen und Aberrationen pro Metaphase in unbestrahlten und mit 9,9 MeV/u Nickelionen bestrahlten AG-Zellen, jeweils ohne BrdU (offene Symbole) und nach Zugabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ BrdU zum Kulturmedium (geschlossene Symbole). Die Zugabe von BrdU beeinflusst den Zellzyklus und damit den zeitliche Verteilung der Schäden.

und die zusätzliche Verzögerung aberranter Zellen erklärt werden. Die Aberrationsrate, sowie die Anzahl aberranter Metaphasen wird durch die Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ BrdU zum Medium demnach nicht beeinflusst. Bei der Interpretation von Daten kann seine Anwesenheit dennoch von Bedeutung sein, da der Einfluß auf die untersuchte Zellpopulation weitreichender sein kann, als in der vorliegenden Arbeit erfaßbar war.

Kapitel 5

Diskussion

Ziel der Arbeit war es primäre menschliche Fibroblasten und ihr Verhalten gegenüber hoch-LET-Strahlung mit häufig verwendeten aber partiell transformierten Zelllinien wie chinesischem Hamster zu vergleichen. Generell zeigt sich, daß für viele biologische Endpunkte ähnliche Verhalten in der Zellantwort auf Teilchenstrahlung verglichen mit dünnionisierender Strahlung gefunden werden. Allerdings zeigen sich auch signifikante Unterschiede. Dies betrifft einmal den starken Einfluß von BrdU auf den Zellzyklus, der eine Verwendung dieser Methode zur Unterscheidung verschiedener Zellgenerationen limitiert. Außerdem zeigt sich für primäre Zellen der starke Trend durch eine vorzeitige Differenzierung den Zellzyklus zu verlassen.

In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Ergebnisse im Vergleich mit der relevanten Literatur diskutiert und abschließend zusammengefaßt.

5.1 Zellinaktivierung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Koloniebildungsfähigkeit von Hautfibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgen-, Kohlenstoff- und Nickelstrahlung untersucht. Die nach Röntgenbestrahlung erhaltenen Dosis-Effekt-Kurven und daraus bestimmte Parameter sind mit den in der Literatur bereits beschriebenen Werten für AG1522-Zellen vereinbar [Cornforth and Bedford, 1987, Nagasawa und Little, 1988, Geard und Chen, 1990]. Unterschiede zwischen den Daten der verschiedenen Autoren sind nicht zuletzt darauf zurückzuführen, daß das Alter der Zellen und die Kulturbedingungen in den einzelnen Labors voneinander abweichen. So liegt die PE von AG-Zellen nach Nagasawa und Little (1988) zwischen 39,4 und 94,8 %, Geard und Chen (1990) dagegen finden eine PE von ca. 20 %. In dieser Arbeit wurde an Zellen mit einer CPD von 22 ± 1 eine PE von 33 ± 5 % bestimmt, welche zwischen beiden Werten liegt. Die von Nagasawa und Little (1988) bestimmte Dosis für ein Überleben von 10% D_{10}

Art der Strahlung	LET [keV/ μm]	Fluenz $\times 10^6$ [Gy $^{-1}$]	Initialschaden				24 h Erholung			
			D_{10} [Gy]	SF_2	α/β [Gy]	σ [μm^2]	D_{10} [Gy]	SF_2	α/β [Gy]	σ [μm^2]
Röntgen	2	-	3,8	0,35	8,5	-	8,0	0,59	50,4	-
$C_{200\text{MeV}/u}$	16	38	3,2	0,31	3,4	2,2	5,2	0,55	5,0	1,1
$C_{11\text{MeV}/u}$	153	4	2,4	0,08	∞	32,2	2,0	0,10	∞	29,0
$Ni_{9,9\text{MeV}/u}$	2450	0,25	9,4	0,63	∞	92,0	10,0	0,62	∞	96,8

Tabelle 5.1: Aus den Dosis- und Fluenz-Effekt-Kurven erhaltene Parameter für die verschiedenen verwendeten Strahlenarten nach 0 h und 24 h Erholungszeit.

von 3,73 Gy stimmt mit der in dieser Arbeit ermittelten D_{10} von 3,76 Gy sehr gut überein. Geard und Chen (1990) ermittelten ein α/β -Verhältnis von 10,3, was mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wert von 8,5 vergleichbar ist. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte stimmen sowohl für niedrig- als auch hoch-LET-Strahlung gut mit den Werten von Fournier (1999) überein.

Mit steigendem LET nimmt das Verhältnis α/β und damit die Schulter der Kurve ab, woraus ein zunehmend exponentieller Kurvenverlauf resultiert. Die Zellen zeigen demnach weniger Reparatur [Weyrather et al., 1999] und die entstehenden DNA-Schäden sind zunehmend letal [Ritter et al., 1977]. Die in Abbildung 4.7 und den Tabellen 4.1 und 5.1 dargestellten Daten geben die Abnahme des Überlebens mit steigendem LET der verwendeten Strahlung wieder. Für 11 MeV/u Kohlenstoffstrahlung ist die D_{10} mit 1,8 Gy minimal und steigt für Nickelionen wieder auf 9,4 Gy an. Parallel dazu sinkt die „surviving fraction at 2 Gy“ SF_2 von 0,35 auf 0,08 und steigt für Nickel wiederum auf 0,63 an. Es kommt hierbei zum sogenannten „overkill-effect“, bei dem mehr Energie im Zellkern einer Zelle deponiert wird, als zur Inaktivierung der Zelle notwendig ist. Ein großer Anteil der applizierten Dosis bleibt damit ungenutzt [Skarsgard et al., 1967]. Trägt man das Überleben wie in Abbildung 5.1 über der Fluenz auf, so zeigt sich, daß Nickelstrahlung je Teilchen effektiver ist als Kohlenstoffstrahlung der gleichen Energie. Dies drückt sich im Wirkungsquerschnitt σ aus, der mit dem LET weiter ansteigt, wie Tabelle 5.1 zeigt. σ gibt die Inaktivierungswahrscheinlichkeit je Teilchen an und wird nach Formel 3.5 bestimmt. Für sehr hohe LET-Werte ergibt sich für σ ein Plateau in dem Bereich, in dem der Wirkungsquerschnitt die Fläche des Zellkernes $\sigma_{\text{geometrisch}}$ erreicht [Wulf et al., 1985, Kraft, 1987], die für AG-Zellen $251 \pm 133 \mu\text{m}^2$ beträgt (Abbildung 4.1). Für Nickelionen mit einem LET von 2450 keV/ μm beträgt σ etwa 40 % der Zellkernfläche. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine Zelle durch den Durchgang von im Mittel einem Nickelion nicht inaktiviert wird, beträgt demnach 60 % und spiegelt sich einem entsprechenden Koloniebildungsvermögen wieder. Dies zeigt, wie auch Todd (1975) berichtet, daß ein Teil der Zellen den Durchgang eines Teilchens durch ihren Zellkern überlebt.

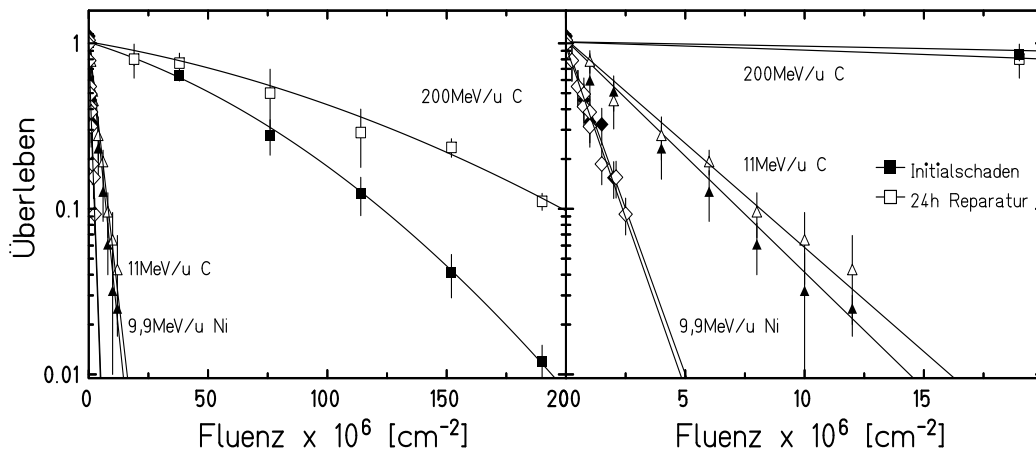


Abbildung 5.1: Zellüberleben von AG-Zellen nach 0 h (geschlossenen Symbole) und 24 h Erholungszeit (offene Symbole) in Abhängigkeit von der Fluenz nach Bestrahlung mit 200 MeV/u Kohlenstoffionen (LET 16 KeV/μm), 11 MeV/u Kohlenstoffionen (LET 153 KeV/μm) und 9,9 MeV/u Nickelionen (LET 2450 KeV/μm). Beide Abbildungen unterscheiden sich nur im Maßstab der Abszisse.

Um die Reparaturfähigkeit der entstandenen Schäden zu untersuchen, wurden konfluente Zellen nach Bestrahlung unterschiedlich lang weiter kultiviert. Während dieser Zeit können die Zellen nicht proliferieren und setzen statt dessen Reparaturprozesse in Gang. Diese Art der Erholung wird als „liquid-holding-recovery“ bezeichnet, wie z.B. bei Fornance et al. (1980) beschrieben ist, und so reparierte Schäden als potentiell letale Schäden PLD [z.B. Bedford (1991)]. Die Reparatur von PLD in Fibroblasten ist nach 6 h fast vollständig abgeschlossen [Fornance et al., 1980, Geard und Chen, 1990]. Diese auch in der vorliegenden Arbeit beobachtete Verbesserung des Überlebens nach unterschiedlichen Erholungszeiten ist in Abbildung 4.8 dargestellt. Es kommt hierbei zu einem dosisabhängigen Anstieg der Reparaturrate, wie auch Nagasawa et al. (1982) feststellte. Der absolute Restschaden steigt mit zunehmender Dosis weiter an. Dies wird in den Überlebenskurven nach 24 h Erholungszeit deutlich (Abbildung 4.10).

Die Erholung von Zellen nach „liquid-holding-recovery“ wurde auch von anderen Autoren untersucht [Cornforth and Bedford, 1987, Geard und Chen, 1990, Sasai et al., 1994, Heilmann et al., 1996] und deren Ergebnisse sind mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten vergleichbar. Nach Bestrahlung mit 5 Gy 100 kV Röntgenstrahlung wurde ein Erholungsverhältnis von 8 ± 2 beschrieben [Rutz und Little, 1989] und in dieser Arbeit betrug es bei Verwendung von 250 kV Röntgenstrahlung 7,4.

M.Suzuki (2001) verwendete humane bronchiale Epithelzellen, die den hier verwendeten AG-Zellen in ihrer Strahlenempfindlichkeit ähnlich sind, wie eine D_{10} von 3,26 Gy nach 0 h und von 5,45 Gy nach 24 h im Vergleich zu 3,76 und 8,0 Gy

für AG-Zellen zeigt. Er konnte ebenfalls PLD-Reparatur nach Bestrahlung mit ^{137}Cs γ -Strahlung zeigen. Nach Bestrahlung mit 1 GeV/u Eisenionen (LET ca. 140 keV/ μm) wurde nur ein geringer Anteil des Schadens repariert. In dieser Arbeit zeigt sich für die mit Hoch-LET-Strahlung behandelten Zellen nach 24 h Erholungszeit ebenfalls keine deutliche Verbesserung des Überlebens. Die Reparaturkapazität der Zellen zeigt eine deutliche LET-Abhängigkeit (Abbildung 4.9 und 4.10).

Die nach Schwerionenbestrahlung auftretenden Unterschiede in der Wirksamkeit des gleichen Ions verschiedener Energie und verschiedener Ionen gleicher Energie lassen sich durch den veränderten LET der Strahlung und die damit verbundene Energiedistribution der einzelnen Spuren und deren Überschneidung erklären [Wulf et al., 1985, Kraft, 1987, Scholz und Kraft, 1994]. Die bei hochenergetischen Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung großen Spurdurchmesser besitzen nur geringe Ionisationsdichte und führen damit zu eher leichteren Schäden mit höherer Reparabilität. Dies spiegelt sich in einem großen Anteil subletaler Schäden und einem meßbaren PLD wieder [Barendsen et al., 1963, Chadwick und Leenhouts, 1973, Fornance et al., 1980, Cornforth and Bedford, 1987, Bedford, 1991]. Niederenergetische Ionen mit einem hohen LET haben dagegen geringe Spurdurchmesser mit hohen Ionisationsdichten, die entweder zur Inaktivierung von Reparaturprozessen oder der Produktion nicht reparabler Schäden führen [Blakely, 1992, Krämer und Kraft, 1994]. Daher sind potentiell letale Schäden nach hoch-LET-Bestrahlung nicht mehr nachweisbar.

5.2 Proliferation und Zellzyklus-Arrest

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Schwerionenstrahlung auf die Proliferation der AG-Zellen mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht, da z.B. das klonogene Überleben keine Aussage über das Proliferationsverhalten direkt nach Bestrahlung zuläßt. Zahlreiche Experimente haben jedoch gezeigt, daß es durch hoch-LET-Strahlung schon im 1. Zellzyklus nach Bestrahlung zu Zellzyklus-Störungen kommt, die sich von den durch Röntgenstrahlung bewirkten unterscheiden [Lücke-Huhle et al., 1979, Collyn-d'Hooghe et al., 1981, Ritter et al., 1992, Scholz et al., 1994, Ritter et al., 1996, Scholz et al., 1998]. Diese Störungen beeinflussen Chromosomenexperimente durch einen verzögerten Eintritt von Zellen in die Mitose.

Strahlung vermindert die Teilungsfähigkeit der Zellen in Abhängigkeit von der Dosis und dem LET der Strahlung wie durch Collyn-d'Hooghe et al. (1981) beschrieben wurde und auch Abbildung 4.6 zeigt. Nach Bestrahlung mit 11 MeV/u Kohlenstoffionen wird das Wachstum der gesamten Population mit zunehmender Dosis vermindert. Die Auswirkung der Strahlung betrifft alle Zellen relativ gleich-

mäßig und die Population stellt nach und nach das Wachstum ein. Dies ist mit der Vorstellung eines „verzögerten Zelltodes“ vereinbar, die z.B. von Bedford et al. (1978) und Grote et al. (1981) nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung beschrieben wird. Danach werden die getroffenen Zellen nicht schon vor der ersten Mitose inaktiviert, sondern erst während einer der folgenden Teilungen (Abbildung 4.6, links). Nach Bestrahlung mit 9,9 MeV/u Nickelionen kommt es mit ansteigender Dosis zunächst zu einer immer ausgeprägteren Wachstumsverzögerung, die jedoch von einer steilen Wachstumsphase abgelöst wird (Abbildung 4.6, rechts). Dies kann damit erklärt werden, daß nach Nickelbestrahlung viele ungetroffene Zellen in der Population enthalten sind, die wie unbestrahlte Kontrollzellen proliferieren, wie in Abschnitt 4.1.1 dargestellt ist. Die Wachstumsverzögerung resultiert aus der um die inaktivierten Zellen verminderten Ausgangspopulation, die zu Beginn der Messungen die Zahlenwerte nur wenig beeinflussen kann. Die strahlungsbedingte Änderung der Proliferation der Zellpopulation hängt somit davon ab, wie die einzelnen Zellen innerhalb des Zellzyklus verzögert werden. Die Arretierung von Zellen findet dabei größtenteils vor der ersten Zellteilung statt.

Das Auftreten von Zellzyklusarresten wird in der Literatur vielfältig diskutiert. Danach soll die Arretierung von Zellen der genetischen Stabilität der Zellpopulation [Hartwell und Kastan, 1994, Gupta et al., 1996] und damit der Tumorsuppression [Sager, 1989] dienen. Säugerzellen antworten auf ionisierende Strahlung sehr schnell mit einem Zellzyklusarrest an einem Zellzyklus-Kontrollpunkt [DeSimone et al., 2000]. Diese Zellzyklus-Kontrollpunkte sind regulatorische Wege, die sicherstellen, daß bestimmte kritische Ereignisse wie die Verdopplung der DNA oder die Verteilung der Chromosomen mit einem hohen Maß an Genauigkeit ausgeführt und vollendet werden. Tritt ein DNA-Schaden auf, so resultiert an einem Kontrollpunkt ein Anhalten des Zellzyklus in der G1 oder G2/M-Phase, gelegentlich auch in der S-Phase [Bernhard et al., 1995, DeSimone et al., 2000]. Diese Zellzyklusarreste sollen der Zelle Zeit geben für die Reparatur geschädigter DNA vor Eintritt in die Mitose bzw. nicht intakte Zellen z.B. an der Teilung hindern. Nach Azzam et al. (2000) kann eine Zelle nach Beseitigung reparaturfähiger DNA-Schäden wieder in den Zyklus eintreten und proliferieren. Nicht reparable Schäden dagegen führten je nach Art der Zelle zum Tod durch Apoptose [Di Leonardo et al., 1994, K.Suzuki et al., 2001], oder zu einem permanenten Zellzyklusarrest, der Ausgangspunkt der Differenzierung [Goda et al., 1998, Dimitrijevic-Bussod et al., 1999] bzw. vorzeitigen Seneszens sein soll [Di Leonardo et al., 1994, Little, 1994, K.Suzuki et al., 2001]. Die Entfernung dieser Zellen aus dem proliferierenden Teil der Population soll zur Vermeidung von genetischen Schäden durch Fehler während der Replikation der geschädigten DNA und deren Fixierung im Genom geschehen und äußert sich letztlich in einem verminderten klonogenen Überleben [Di Leonardo et al., 1994, Brock et al., 1998, K.Suzuki et al., 2001].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fibroblasten sterben nach Be-

strahlung nicht durch Apoptose [Di Leonardo et al., 1994, Enns et al., 1998, Belyakov et al., 1999, Fournier, 2001], wie mit Hilfe des LDH-Testes bestätigt wurde. Stattdessen scheiden geschädigte Zellen durch Differenzierung vorwiegend in der G_1 -Phase des Zellzyklus [Rodemann et al., 1991] aus dem proliferierenden Anteil der Population aus [Brock et al., 1998]. Die Differenzierung der Zellen hat damit eine stark anti-onkogene Wirkung [Sager, 1989, Goldstein, 1990].

Wie in 2.1.1 und 3.4.7 bereits beschrieben, durchlaufen Fibroblasten verschiedene Differenzierungsstadien (MF I - III), bevor sie terminal zu Fibrozyten (postmitotische Fibroblasten PMF IV - VI) ausdifferenzieren und ihre Teilungsfähigkeit verlieren. Dieser Vorgang wird durch Bestrahlung noch beschleunigt [Rodemann et al., 1991, Fournier, 2001]. Die differenzierten Zellen werden im Koloniebildungstest nicht erfaßt, sind aber als lebende Einzelzellen noch nachweisbar [Brock et al., 1998, Fournier, 2001]. Der Zusammenhang zwischen zunehmender Differenzierung und abnehmendem Koloniebildungsvermögen mit steigender Dosis wurde 1999 von Fournier nach Bestrahlung mit schweren Ionen untersucht. Danach zeigt sich mit steigendem LET eine Zunahme der biologischen Wirksamkeit, für sehr hohe LET-Werte nimmt sie dagegen wieder deutlich ab.

Für die Differenzierung der AG-Zellen wurden RBW-Werte von 1 für 200 MeV/u Kohlenstoffionen (LET 16 keV/ μm), 1,7 für 11 MeV/u Kohlenstoffionen (LET 153 keV/ μm) und 0,4 für 9,9 MeV/u Nickelionen (LET 2450 keV/ μm) bestimmt [Fournier et al., 2001]. Dies ist mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten der RBW von 1,2, 2,1 und 0,4 für 10 % Überleben vergleichbar (Tabelle 4.1).

Ein Zellzyklusarrest in der G_2 -Phase wurde für asynchrone Hamsterzellen [Lücke-Huhle et al., 1979 und 1980], humanen Fibroblasten [Lücke-Huhle et al., 1982] und humanen Melanomzellen [Zölzer und Streffer, 2001] beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigen verschiedene Autoren den Arrest von menschlichen Fibroblasten vornehmlich in der G_1 -Phase des Zellzyklus [Nagasawa et al., 1985, Nagasawa und Little, 1988, Di Leonardo et al., 1994, Williams et al., 1997, Azzam et al., 2000]. Diese Unterschiede können z.B. darauf beruhen, daß der Status der Zellen in Bezug auf das für die Zellzykluskontrolle wichtige p53 einen G_1 -Arrest nicht zuließ, wie bei Azzam et al. (2000) ausführlich diskutiert wird. Zahlreiche Autoren beschreiben einen solchen p53-vermittelten Arrest in der G_1 -Phase des Zellzyklus an unterschiedlichen Zellarten [Di Leonardo et al., 1994, Hartwell und Kastan, 1994, Little, 1994, Bernhard et al., 1995, Gupta et al., 1996, Azzam et al., 2000, K.Suzuki et al., 2001]. Zellen, die jedoch erst nach Überschreiten des G_1/S -Kontrollpunktes eine Schädigung erfahren, können nicht mehr in der G_1 -Phase angehalten werden und erfahren einen G_2 -Arrest [Di Leonardo et al., 1994] oder werden in der folgenden G_1 -Phase arretiert.

Die in der vorliegenden Arbeit an G_1 -Phase-Fibroblasten (AG-Zellen) mit Hilfe der Durchflußzytometrie gewonnene Daten zeigen eine Arretierung der Zellen

vorwiegend in der G_1 -Phase (Abbildung 4.13 und 4.14), wie auch die Daten der S-Phasen-Markierung bestätigen (Abbildung 4.11). Das Ausmaß des Arrestes ist mit 23 - 32 % in G_1 arretierten Zellen nach 3 Gy Röntgenstrahlung mit den von Nagasawa et al. (1985, 1988) beschriebenen Werten vergleichbar. Andere Autoren beschreiben für normale menschliche Fibroblasten Werte zwischen 5 % [Di Leonardo et al., 1994] und 67 % [Williams et al., 1997] nach 4 Gy Röntgen- oder γ -Strahlung. Nach Bestrahlung mit 1 Gy hoch-LET-Kohlenstoffionen stieg der Anteil arretierter Zellen in der vorliegenden Arbeit auf 44 - 55%. Eine solche LET-abhängige Steigerung des Arrestes wurde auch von Azzam et al. (2000) gezeigt. Der Anteil dauerhaft in G_1 arretierter Zellen betrug dabei nach 4 Gy γ - bzw. 0,85 Gy α -Strahlung 11 %. Nach Di Leonardo (1994) folgt die Induktion eines permanenten Arrestes in G_1 einer Ein-Treffer-Kinetik, wie sich in einer linearen Beziehung zwischen dem Anteil in S-Phase markierter Zellen und der Dosis zeigt. Wie in Abbildung 4.12 dargestellt sind die Daten der vorliegenden Arbeit mit einer solchen Kinetik vereinbar. In den hier zitierten Arbeiten wurde zur Bestimmung des Anteils permanent arretierter Zellen die S-Phasen-Markierung nach Zugabe von H^3 -Thymidin oder BrdU verwendet. Zellen, die bei Erreichen eines Plateaus nicht markiert sind, werden dabei als permanent in G_1 arretiert bezeichnet. Die in Abschnitt 4.3 und 5.3 dieser Arbeit beschriebenen und diskutierten Untersuchungen zum Einfluß von BrdU auf den Zellzyklus zeigen jedoch, daß ein dauerhafter Arrest auch durch BrdU allein vermittelt werden kann.

Nach Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff- und Nickelionen erreichen etwa 60 % der Zellen, die in die S-Phase eintreten auch die erste Mitose nach Bestrahlung. Der Rest der Zellen wird vor Eintritt in die Mitose, also in S- oder G_2 -Phase arretiert. Während der nächsten Replikationsrunden werden nochmals Zellen an der weiteren Proliferation gehindert, da das klonogene Überleben geringer ist, als die Summe der Zellen, die die 1. Mitose nach Bestrahlung erreichen. In Abbildung 5.2 sind die Anteile von Zellen dargestellt, die bei ähnlichem Überleben (16 - 20 %) in den jeweiligen Zellzyklusphasen arretiert werden bzw. proliferieren und Kolonien bilden. Strahlung steigenden LETs bewirkt demnach, daß die Zellen zunehmend früher arretiert werden. Die Arretierung von Zellen und damit die Sicherung der genomischen Stabilität ist demnach nicht Aufgabe eines einzigen, sondern mehrerer Kontrollmechanismen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus, wie dies auch von Hartwell und Kastan (1994), DiLeonardo et al. (1994) oder Bernhard et al. (1995) diskutiert wird. Diese Mechanismen sind bei Mensch und Nager verschieden [Sager, 1989], wie z.B. parallele Untersuchungen an menschlichen und embryonalen Maus-Fibroblasten zeigen [Azzam et al., 2000] und hängen auch vom p53-Status der Zellen ab [Gupta et al., 1996]. Die Experimente der vorliegenden Arbeit an AG-Zellen und Untersuchungen an etablierten Hamsterzellen in der Abteilung Biophysik der GSI zeigen, daß auch der Anteil von Zellen an der Gesamtpopulation, die die erste Mitose nach Bestrahlung erreichen, bei primären menschlichen Zellen und etablierten Hamsterzellen

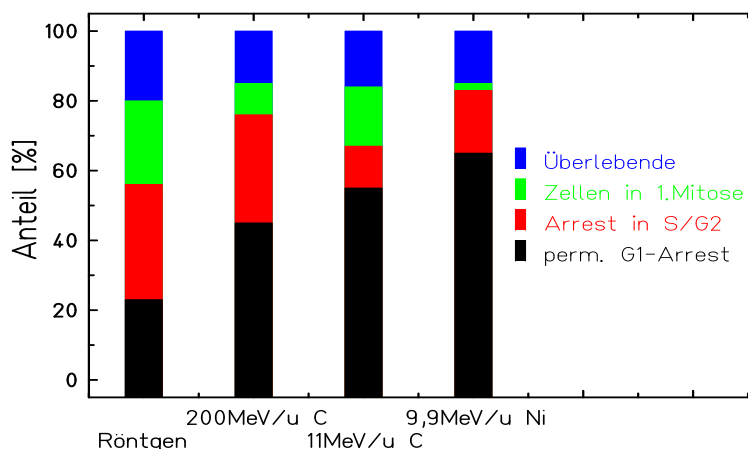


Abbildung 5.2: Anteile von Zellen an der Gesamtpopulation, die in den einzelnen Zellzyklusphasen des 1. Zellzyklus nach Bestrahlung arretiert werden bzw. proliferieren nach Bestrahlung mit 3 Gy Röntgen-, 3 Gy 200 MeV/u Kohlenstoff-, 1,5 Gy 11 MeV/u Kohlenstoff- und 8 Gy 9,9 MeV/u-Nickel-Strahlung, die in etwa das gleiche klonogene Überleben bewirken.

deutliche Unterschiede aufweist [Ritter et al., 2001]. Während CHO-Zellen auch nach 4 Gy Röntgenstrahlung noch zu 90 % die 1. Mitose nach Bestrahlung erreichen, sind es bei AG-Zellen noch 30 %, wie bereits in Abbildung 4.18 gezeigt. Die dauerhafte Arretierung von AG-Zellen konnte auch von anderen Autoren gezeigt werden [Nagasawa et al., 1985]. So erreichten z.B. nach dünnionisierender Strahlung 40-80 % der Zellen relativ zur Kontrollpopulation die erste Mitose [Cornforth and Bedford, 1983, Cornforth and Goodwin, 1991].

Während die etablierten Hamsterzellen nur eine geringe Abnahme der die Mitose erreichenden Zellen mit zunehmender Dosis zeigen, ist die Abnahme bei menschlichen Zellen deutlich ausgeprägt [Ritter et al., 2001]. Zudem konnte nachgewiesen werden, daß nach der Aussaat der Kontrollpopulation fast 100 % der etablierten Hamsterzellen die erste Mitose erreichen, während bei humanen Fibroblasten nur 10-20 % der Kontrollzellen in der Mitose beobachtet wurden (Abbildung 4.18).

Wegen der unterschiedlichen Kontrollmechanismen in menschlichen und Nagetier-Zellen [Sager, 1989] ist eine direkte Übertragung von Versuchsergebnissen und Versuchsprotokollen nicht immer ohne weiters möglich [Azzam et al., 2000]. Dies gilt, wie oben gezeigt, gerade auch für die Untersuchung und Beurteilung der in Abschnitt 5.4 diskutierten chromosomalen Schäden wie Aberrationen oder Mikrokernen, deren Expression durch Zellzyklusstörungen beeinflusst wird [Scholz et al., 1994, Ritter et al., 1996, Nasonova, 1998, Ritter et al., 2000]. Die Wirkung des im Verlauf der vorliegenden Arbeit vielfach verwendeten BrdU gerade auch auf den Zellzyklus wird im Folgenden ausführlich diskutiert.

5.3 Einfluß von BrdU auf zellbiologische Experimente

Wie auch in Abschnitt 3.4.9 beschrieben, ist die Unterscheidung der einzelnen Replikationsrunden während der Analyse von Chromosomenschäden für die Interpretation der Ergebnisse ausgesprochen wichtig, da bei jeder Zellteilung nach Bestrahlung die Aberrationsrate sinkt [Sasaki und Norman, 1967, Bedford et al., 1978, Scott und Lyons, 1979, Boei et al., 1996] und der Anteil zweiter Mitosen zu einer Unterschätzung des Schadens führen würde [Kolin-Gerresheim und Bauchinger, 1981]. Zur Unterscheidung von Mitosen in verschiedenen Zellzyklen dient üblicherweise die differentielle Färbung [Scott und Lyons, 1979, Fornance et al., 1980, Bender et al., 1988, Boei et al., 1996, Ritter et al., 1996, Yang et al., 1997, Nasonova, 1998, Anderson et al., 2000, Ritter et al., 2000, ?].

Ursprünglich wurden die einzelnen Replikationsrunden durch Markierung der DNA mit Tritium und anschließender Autoradiographie unterschieden [Carrano, 1973]. Die Auflösung war hierbei nicht sehr hoch und die Methode anfällig für die Bildung von Artefakten [Perry und Wolff, 1974]. Seit Entwicklung einer nichtradioaktiven Unterscheidung der mit BrdU substituierten DNA durch Hoechst-Quenching (siehe auch Abschnitt 3.4.5) [Latt, 1973] und einer permanenten Färbung der unterschiedlich substituierten Chromatiden [Perry und Wolff, 1974], wurde die Fluoreszenz-plus-Giemsa-Färbung (FpG) zur Standardmethode bei der Untersuchung von Chromosomenschäden [Bender et al., 1988]. Als zugrundeliegende Ursache der veränderten Anfärbbarkeit wird die Degradation der BrdU-haltigen DNA unter Einwirkung von UV-Licht vermutet [Sugiyama et al., 1976, Dean und Danford, 1984]. Die diskutierte Rolle der veränderten Bindungsfähigkeit von Proteinen an substituiertes Chromatin [Ikushima und Wolff, 1974, Perry und Wolff, 1974] scheint für die Färbung von untergeordneter Bedeutung zu sein [Sugiyama et al., 1976].

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der Anwendung des BrdU über viele Stunden hinweg eine Veränderung im Wachstumsverhalten der verwendeten Zellen. Etwa 50 h nach Zugabe des BrdU kam es zu einem Wachstumsstillstand der Fibroblastenpopulationen. Es wurde daher der Einfluß auf das Proliferationsverhalten von humanen Fibroblasten und die Induktion von Chromosomenschäden untersucht (Abschnitt 4.3), sowie dessen Konsequenzen für die zentralen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.

5.3.1 Zytotoxische Wirkung von BrdU

Die Veränderung des Proliferationsverhaltens von humanen Fibroblasten in Anwesenheit von BrdU in Abhängigkeit von der Zeit wird in Form von Wachstums-

kurven für AG-, NHLF- und GMC-Zellen in der vorliegenden Arbeit beschrieben (Abschnitt 4.3.3). Es zeigte sich eine deutliche Abnahme des Wachstums gegenüber der unbehandelten Kontrollpopulation etwa 2 Tage nach Zugabe des BrdU (Abbildung 4.29), im Falle der GMC-Zellen nach 8 Tagen. Es konnte gezeigt werden, daß durch eine weitere Kultivierung in Medium ohne BrdU nach Einwirkzeiten von 24 bis 96 h keine vollständige Erholung erreicht wird. Die Wachstumshemmung ist demnach nicht vollständig reversibel. Auch andere Autoren beschreiben an unterschiedlichen Zellarten eine konzentrationsabhängige und nicht vollständig reversible Wachstumshemmung durch BrdU [Smellie und Parson, 1979], die zum Teil 30 - 70 % betrug [Iliakis et al., 1989, Michishita et al., 1999]. In Zusammenhang mit einer Bestrahlung der Zellen zeigt sich, daß die Hemmung durch BrdU und Strahlung nur 2-5% größer ist, als durch die Bestrahlung allein verursacht (Abbildung 4.29). Dies gilt gleichermaßen für Röntgen- und niederenergetische Kohlenstoffstrahlung und zeigte sich für die verschiedenen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fibroblastenlinien. Daraus folgt, daß bei einem Vergleich von Daten, die unter Einwirkung von BrdU gemessen wurden, auch bei konstanten Versuchsbedingungen seine Anwesenheit berücksichtigt werden muß, da das Ausmaß der BrdU-Wirkung für jeden Datenpunkt verschieden sein kann und nicht direkt bestimmbar ist.

In den durchflußzytometrischen Untersuchungen in Abschnitt 4.3.4 der vorliegenden Arbeit zeigte sich in bestrahlten und unbestrahlten Zellen deutlich, daß ca. 50 h nach Zugabe des BrdU der überwiegende Anteil der AG-Zellen in derjenigen Phase arretiert wurden, in der sie sich gerade befanden. Ein relativ hoher Anteil der Zellen wurde dabei in der G_1 -Phase arretiert. Da nach Iliakis (1989) der Einbau von BrdU Voraussetzung für dessen Wirkung ist, ist für das Ausmaß des G_1 -Blocks der Einfluß der Bestrahlung ausschlaggebend, denn ein Großteil der Zellen hat nach Bestrahlung die erste S-Phase nicht erreicht und konnte damit kein BrdU einbauen. Im Widerspruch dazu zeigen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auch in unbestrahlten AG-Zellen unter Einwirkung von BrdU einen G_1 -Arrest. Der Einbau von BrdU ist daher nicht ausschlaggebend für die Wirkung, sondern seine Anwesenheit im Medium. Michishita et al. (1999) beschreiben ebenfalls einen G_1 -Arrest durch BrdU und einen geringen Anteil Zellen, die in der G_2 -Phase verblieben, obwohl es sich hierbei auch um polyploide G_1 -Zellen handeln könne. BrdU soll hemmenden Einfluß auf den Transit zwischen der G_0/G_1 -Phase und der S-Phase ausüben [Überblick in Morris, 1991], wie in einer humanen Tumorzelllinie und Nager-Lymphozyten gezeigt werden konnte. Die Verlängerung des Zellzyklus durch BrdU wurde in vielen Zelllinien beobachtet und wird auf Störungen im Nukleotid-Haushalt der Zellen zurückgeführt, die Einfluß auf die DNA-Replikation haben [Überblick in Morris, 1991]. Die durch BrdU bewirkte Veränderung der Regulation von Replikation und Genexpression wird vielfach beschrieben und für die Wirkung von BrdU verantwortlich gemacht [Rutter et al., 1973, Iliakis et al., 1989, Morris, 1991,

Michishita et al., 1999]. Die mit dem BrdU-Einbau verbundene Strukturveränderung des Chromatins bewirkt danach neben einer erhöhten Zugänglichkeit der DNA für Mutagene die Untauglichkeit von Erkennungssequenzen für Reparaturenzyme, da diese Thymidin erkennen können sollen, nicht aber BrdU. Zudem erhöht der BrdU-Anteil im Genom die Entstehungsrate von Mutationen durch Fehlpaarung der Enolform des BrdU mit Guanin während des Einbaus von BrdU und der Replikation BrdU-haltiger DNA-Abschnitte [Übersicht in Morris, 1991].

Die beschriebenen Wirkungen des BrdU auf die Proliferation der Zellen führen dazu, daß viele Zellen vor Eintritt in die Mitose arretiert werden. Der in dieser Arbeit gemessene Mitoseindex nach Zugabe von BrdU war zu jedem untersuchten Zeitpunkt geringer, als ohne BrdU (Abbildungen 4.35 und 4.36). Die Summe der Zellen, die die Mitose erreichen ist daher ebenfalls deutlich geringer. Das Verhältnis 1./2. Mitosen 48 h nach Lösen der Kontaktinhibition wächst mit steigender BrdU-Konzentration an und zeigt damit die zunehmende Verzögerung der Zellen innerhalb des Zellzyklus (Abbildung 4.34). Eine solche konzentrationsabhängige Abnahme des Anteils zweiter Mitosen wurde auch von anderen Autoren beschrieben [Kolin-Gerresheim und Bauchinger, 1981, Morris, 1991] und als „mitotic delay“ bezeichnet.

Während der Untersuchung des klonogenen Überlebens nach Zugabe von BrdU sank die PE von $33 \pm 5\%$ auf etwa $0,01\%$. Dies stimmt mit Untersuchungen von Meuth und Green 1974 an 3T3- und 3T6-Zellen (Maus) überein, in denen nach BrdU-Zugabe keine Koloniebildung mehr auftrat. Die Verwendung von dC konnte die Wirkung des BrdU auf die etablierten Maus-Fibroblasten jedoch vollständig aufheben. An humanen diploiden Fibroblasten konnte dies weder in der vorliegenden Arbeit noch bei Meuth und Green (1974) beobachtet werden. Auch viele andere Autoren haben die Wirkung von BrdU auf die Proliferation und Viabilität von Zellen mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht [Rutter et al., 1973, Smellie und Parson, 1979, Iliakis et al., 1989]. Die Viabilität der Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit aus dem Anteil toter Zellen bestimmt. Dazu wurde im Zellkulturüberstand von AG-Zellen wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben die Laktat-Dehydrogenase-Aktivität untersucht, wobei sich für unbehandelte Zellen ein Prozentsatz von $8,5 \pm 3,3\%$ toter Zellen ergab. Es konnte über 96 h und einen Konzentrationsbereich von 0-80 $\mu\text{mol/l}$ BrdU kein Anstieg beobachtet werden. Durch Zugabe von BrdU sinkt demnach die Anzahl koloniebildender Zellen in der Population, die Zellen bleiben aber dennoch als lebende Zellen erhalten, die auf ihren Differenzierungsgrad hin untersucht wurden.

In den in Abschnitt 4.3.5 dargestellten Untersuchungen des Differenzierungsgrades zeigten humane Hautfibroblasten einen 6,3 fachen Anstieg des Anteils postmitotischer und demnach differenzierter Zellen nach Behandlung mit BrdU ($10 \mu\text{mol/l}$). Die Zugabe von dC brachte keine Verminderung des Anteils differenzierter Zellen (Abbildung 4.33), wie dies auch Michishita et al. (1999) für verschiedene Zelllinien beschreiben.

Die Ergebnisse von Untersuchungen an normalen Fibroblasten (Huhn) wurden dahingehend interpretiert, daß BrdU Veränderungen hervorruft, die auch im Verlauf der zellulären Seneszens auftreten [Daniel, 1976]. Michishita et al. (1999) konnten die seneszens-ähnliche Veränderung der Morphologie und verschiedener biochemischer Marker an unterschiedlichen Zelltypen verschiedener Spezies durch Behandlung mit BrdU induzieren. Als Grundlage dieser Änderung sehen die Autoren einen Wechsel in der Interaktion zwischen der DNA und verschiedenen Proteinen, die eine veränderte Genexpression bewirken. Die Untersuchung der Differenzierung von AG-Zellen in der vorliegenden Arbeit zeigte, daß die Wirkung des BrdU sehr früh nach seiner Zugabe einsetzt. Beim Vergleich einer BrdU-Zugabe vor und nach Anheftung der Zellen wurde deutlich, daß BrdU schon die Anheftung der Zellen drastisch herabsetzt. Die Wirkung ist somit nicht allein an einen BrdU-Einbau gebunden (Abschnitt 4.3.5). Ein Einfluß auch auf andere Endpunkte ist daher sehr wahrscheinlich und sollte auch für bereits etablierte Methoden überprüft werden.

5.3.2 Induktion chromosomaler Schäden durch BrdU

In menschlichen Lymphozyten stellten Scott und Lyons (1979) keine Induktion von Chromosomenaberrationen durch BrdU fest. Auch beim Vergleich von bestrahlten Zellen, die in Medium ohne und mit Verwendung von BrdU kultiviert wurden, wurde von den Autoren keine erhöhte Aberrationsrate beobachtet. Die Untersuchungen wurden jedoch für Röntgenstrahlung durchgeführt und nur dizentrische Chromosomen als Aberration gewertet. Ein Anstieg anderer Aberrationstypen wäre somit unberücksichtigt geblieben. In CHO-Zellen ist dagegen von den Autoren eine Induktion von Aberrationen durch BrdU gezeigt worden. BrdU induzierte dabei besonders Chromatid-Typ-Aberrationen. In CHO-Zellen wird auch die Induktion von Mikrokernen als Ausdruck chromosomaler Schäden beschrieben, die in Lymphozyten nicht vermehrt auftraten [Übersicht in Morris, 1991].

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen (Abschnitt 4.3.8) zeigen, daß BrdU in unbestrahlten und mit Röntgenstrahlung behandelten Zellen die Aberrationsraten nicht beeinflusst (Abbildung 4.37), obwohl unter BrdU-Einfluß der Anteil der untersuchten Zellen an der Gesamtpopulation deutlich abnimmt (Abbildung 4.35 und 4.36).

Nach hoch-LET-Bestrahlung verlaufen die Aberrationsraten mit und ohne BrdU-Zugabe zu frühen Untersuchungszeiten parallel. Für späte Zeitpunkte dagegen zeigen sich deutliche Unterschiede (Abbildung 4.38). Dies ist damit zu erklären, daß der Anteil zweiter Mitosen, die in der BrdU-freien Population ohne Unterscheidung durch die FpG-Färbung unerkannt mituntersucht werden, die gemessene Aberrationsrate senkt [Kolin-Gerresheim und Bauchinger, 1981]. Berücksichtigt man die Minderung der Aberrationsrate durch Mitosen im zweiten

Zellzyklus, so bleibt die Aberrationsrate auch nach Bestrahlung mit hoch-LET-Strahlung von BrdU unbeeinflusst. Die Anwesenheit von BrdU bewirkt demnach keine Veränderung der Aberrationsraten nach Bestrahlung.

Auf Grund der schon oben beschriebenen Störung des Nukleotid-Haushaltes und der Chromatinstruktur durch BrdU kommt es zu einer dosisabhängigen Zunahme von SCEs nach BrdU-Zugabe. BrdU ist somit auch mutagen wirksam [Morris, 1991]. In der vorliegenden Arbeit wurde die SCE-Induktion in Abhängigkeit der BrdU-Konzentration untersucht (Abschnitt 4.3.6) und dabei eine Zunahme der SCE-Rate um 32% beobachtet. An V79-Zellen ist ein vergleichbarer konzentrationsabhängiger Anstieg der SCE-Rate gezeigt worden [Thompson et al., 1980]. Iliakis et al. (1989) zeigte, daß die Menge eingebautes BrdU nicht linear mit der Konzentration BrdU im Medium ansteigt, sondern einen Maximalwert erreicht, wie mit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Sättigung der SCE Induktion ab einer BrdU-Konzentration von 40 $\mu\text{mol/l}$ vereinbar ist.

Zusammenfassend wird festgestellt, daß unter Einfluß von BrdU in humanen Fibroblasten die Proliferation und damit auch der Mitoseindex und das klonogene Überleben der Zellpopulation sinkt. Im Gegenzug steigt gleichzeitig der Anteil differenzierter Zellen an. Es zeigt sich ein Anstieg der SCE-Rate in BrdU-behandelten Zellen, während die Rate der Chromosomenaberrationen nicht verändert wird. Die beobachteten Effekte werden jedoch erst sichtbar, wenn die Untersuchungen über längere Zeiträume hin ausgedehnt werden.

5.3.3 Einfluß auf die Meßergebnisse

Um die negativen Einflüsse von BrdU zu minimieren, wurde mit einer möglichst geringen BrdU-Konzentration (10 $\mu\text{mol/l}$) gearbeitet, die aber dennoch zu einer ausreichenden Unterscheidung erster und zweiter Mitosen führte und diese für alle Experimente verwendet, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Lange Meßzeiten von bis zu 100 h zur Untersuchung von Chromosomenschäden in der 1. Mitose nach Bestrahlung und deren Integration machen die Anwendung von BrdU notwendig, da die Auswertung unerkannter zweiter Mitosen zur Unterschätzung der Aberrationsraten führen würde. Eine andere Methode, die weniger Nachteile aufweist steht derzeit nicht zur Verfügung.

Inwieweit nicht auf ihre BrdU-Induzierbarkeit untersuchte Parameter beeinflusst werden, kann nicht beurteilt werden. Da die Verwendung von BrdU einen Eingriff in das Modellsystem Zelle darstellt, sollte für jede Zelllinie und Untersuchungsmethode das Ausmaß der Störung untersucht [Kolin-Gerresheim und Bauchinger, 1981, Nagasawa et al., 1985] und in die Diskussion der Ergebnisse einbezogen werden, auch wenn sich der Einfluß als eher gering erweist.

Die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende Wirkung von Schwerionen-Strahlung unterscheidet sich im Vergleich zu Röntgenstrahlung deutlich, wie sich trotz der durch BrdU bewirkten Veränderungen zeigt. Der Einfluß von BrdU auf die Meßergebnisse besteht vorwiegend in der Arretierung bzw. Differenzierung von Zellen und damit einer Veränderung der z.B. in Chromosomenexperimenten untersuchten Zellpopulation, wobei sich die Aberrationsraten in der vorliegenden Arbeit von BrdU unbeeinflusst zeigten.

5.4 Induktion chromosomaler Schäden durch Strahlung

5.4.1 Zeitliche Verteilung der Chromosomenschäden

Viele Autoren fanden nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung eine zeitlich konstante Aberrationsrate in V79-Hamster-Zellen [Carrano, 1973], Lymphozyten [Scott und Lyons, 1979] und in den auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten AG-Zellen [Cornforth and Bedford, 1987, Cornforth and Goodwin, 1991, Füssel, 1997] oder einen geringen Anstieg in Lymphozyten [Lloyd et al., 1977, Boei et al., 1996]. In der vorliegenden Arbeit wurde an humanen Fibroblasten eine zeitlich nahezu konstante Aberrationsrate von 1,4 Aberrationen/Metaphase nach 3 Gy Röntgenstrahlung bestimmt.

Während sich einige wenige Untersuchungen mit der Induktion von Chromosomenaberrationen in Zellen unterschiedlichen Ursprungs nach Röntgen- oder γ -Strahlung befassen, sind Untersuchungen der Wirkung schwerer Ionen gerade im Hinblick auf die zeitliche Verteilung der Chromosomenschäden rar. Die Untersuchung der Aberrationsfrequenz in Lymphozyten nach hoch-LET-Bestrahlung zeigte einen Anstieg für LET-Werte über $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ [Anderson et al., 2000, George et al., 2001]. Andere Autoren beschreiben deutlich ansteigende Aberrationsraten in Hamster-Zellen [Ritter et al., 1992, Ritter et al., 1996, Nasonova, 1998, Scholz et al., 1998, Ritter et al., 2000].

Die in Abschnitt 4.2.6 dargestellten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen Anstieg der Aberrationsrate mit der Zeit nach hoch-LET-Bestrahlung, der mit steigender Dosis und steigendem LET ausgeprägter wird. Der Anstieg nach Nickelbestrahlung ist steiler als nach Röntgen- oder Kohlenstoffstrahlung, die maximale Aberrationsrate jedoch niedriger (Abbildung 4.23). Im Vergleich ähnlicher Überlebensniveaus nimmt mit steigendem LET die Aberrationsrate bis zu einem Maximalwert zu, fällt danach jedoch unter den für Röntgenstrahlung bestimmten Wert ab (Abbildung 4.23).

Messungen von Ritter et al. (1992) an V79-Zellen nach Argon-Bestrahlung zeigten eine geringere Anzahl aberranter Zellen nach hoch-LET-Strahlung für gleiches Überleben, sowie eine Verschiebung des maximalen Anteils aberranter Zellen mit der Dosis nach späteren Zeiten hin. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nach Bestrahlung mit Nickel- und Kohlenstoffionen auch an humanen Fibroblasten beobachtet werden (Abbildung 4.21 und 4.22). Die Bestrahlung mit Nickelionen führte dabei zu geringeren absoluten Anzahlen aberranter Zellen, zeigte jedoch nach 4 Gy eine Sättigung des Effektes und keine weitere Steigerung mit der Dosis (Abbildung 4.22). Dies unterstützt die in Abschnitt 5.2 beschriebene Vermutung, daß Nickelbestrahlung zu stark ausgeprägten Zellzyklusarresten führt, die wiederum zur Selektion der untersuchten Zellpopulation führen. Der im Vergleich zu niederenergetischen Kohlenstoffionen geringe Anteil aberranter Zellen von ma-

ximal 50 % kann darauf zurückgeführt werden, daß der Anteil Zellen mit ungetroffenem Zellkern im Gegensatz zu den Zellen mit getroffenen Kern ungehindert proliferiert (Abschnitt 4.1.1). Zu frühen Untersuchungszeitpunkten unterscheiden sich daher die für die Kontrollpopulation und die bestrahlten Zellen bestimmten Werte kaum.

Um den zeitlichen Schwankungen nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenarten Rechnung zu tragen, wurden die gemessenen Werte mit dem jeweiligen Mitoseindex gewichtet und über die Zeit integriert (Abschnitt 3.4.9.3 und 4.2.6.2).

5.4.2 Integration der Aberrationen zum Gesamtschaden

Wie bereits oben beschrieben, ist die Zeitabhängigkeit der Aberrationsrate nur von wenigen Autoren berücksichtigt worden und nur für LET-Werte über $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ wurde ein Anstieg mit der Zeit gezeigt. Daher ist die Integration der Daten aus Chromosomenexperimenten bisher nur für die Hamsterzelllinie V79 beschrieben [Scholz et al., 1998, Ritter et al., 2000]. Die dort angewendeten Verfahren wurden in dieser Arbeit auf die Chromosomendaten von humanen Fibroblasten angewandt. Die Ergebnisse der Integration der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten und der von E.Nasonova (persönliche Kommunikation) bestimmten Werte sind in Abbildung 4.28 dargestellt. Aus den integrierten Daten ergab sich für Teilchenstrahlung auf Grund der mit dem LET sinkenden Anzahl von Zellen, die die Mitose erreichen, kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Dosis und Aberrationsrate. Der ausgeprägte Einfluß von Zellzyklusarresten auf humane diploide Zellen stört die Integration empfindlich, da nur 3 % (nach Bestrahlung) bis maximal 20 % der Zellen (in den Kontrollpopulationen) untersucht werden konnten. Im Falle von etablierten Hamster-Zellen, an denen die Integration der Daten von Scholz et al. (1998) gezeigt wurde, werden 80 - 100 % erreicht [Ritter et al., 1996, Ritter et al., 2000].

Wie auch für andere Endpunkte gezeigt, steigt die biologische Wirksamkeit im Bezug auf die Induktion von Chromosomenschäden mit zunehmendem LET bis zu einem Maximalwert an, der in der vorliegenden Arbeit durch niederenergetische Kohlenstoffstrahlung mit einem LET von $150 \text{ keV}/\mu\text{m}$ gekennzeichnet ist, und fällt für höhere LETs deutlich unter 1, wie im Fall der Nickelionen mit einem LET von $2450 \text{ keV}/\mu\text{m}$ (Abbildung 5.5).

Die Bestrahlung mit schweren Ionen hohen LETs ist ausgesprochen inhomogen und bewirkt in den getroffenen Zellen ausgeprägte Zellzyklusarreste [Kiefer, 1992]. Die hier beschriebene Wirkung dieser schweren Ionen ist daher weniger Ausdruck des erzeugten genetischen Schadens, als vielmehr der Selektion der untersuchten Zellpopulation durch die Inhomogenität der Bestrahlung, wie sie bereits in Abbildung 4.2 dargestellt wurde. Die so erhaltenen Werte unterschätzen den in der Gesamtpopulation vorhandenen chromosomalen Schaden, da

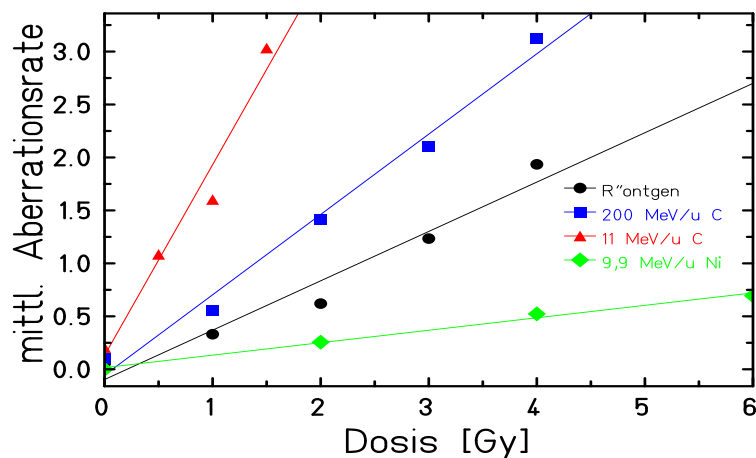


Abbildung 5.3: Mittlere Anzahl Aberrationen pro Metaphase in Abhängigkeit von der Dosis nach Bestrahlung mit Röntgen-Strahlung, 200 MeV/u Kohlenstoffionen, 11 MeV/u Kohlenstoffionen und 9,9 MeV/u Nickelionen. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus 6 - 14 Sammelzeitpunkten aus der vorliegenden Arbeit (11 MeV/u C und 9,9 MeV/u Ni) sowie der Arbeit von E.Nasonova (persönliche Kommunikation) (Röntgen und 200 MeV/u C).

nicht alle geschädigten Zellen die Mitose erreichen und damit auch nicht zum Gesamtschaden beitragen. Der erhaltene Wert gibt aber Auskunft darüber, welcher Schaden an die folgende Zellgeneration weitergegeben wird. Um die Induktion von Chromosomenschäden durch verschiedene Strahlenarten vergleichen und somit relative biologische Wirksamkeiten bestimmen zu können, ohne dabei auf die Zellzyklusverzögerungen einzugehen, kann die mittlere Aberrationsrate über die Zeit verwendet werden. Abbildung 5.3 gibt ihre lineare Abhängigkeit von der Dosis wieder.

5.4.3 Korrelation zwischen Chromosomenaberrationen und Inaktivierung

Kiefer diskutiert 1992 die Vorstellung, daß die überlebenden Zellen mit den Zellen einer Population gleichzusetzen seien, deren Kern nicht getroffen wurde und die daher keine Aberrationen tragen. Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen keinen einfachen Zusammenhang zwischen dem Anteil Metaphasen ohne Aberrationen und der überlebenden Fraktion erkennen. Der Einfluß des LET-Wertes auf den Anteil aberranter Zellen wurde von Ritter et al. (1992) an V79-Zellen untersucht und für gleiche Überlebensniveaus nach hoch-LET-Bestrahlung eine Abnahme aberranter Zellen festgestellt, was der Überlegung von Kiefer (1992) widerspricht.

In Abbildung 5.4 der vorliegenden Arbeit wurden die Daten über Chromosomena-

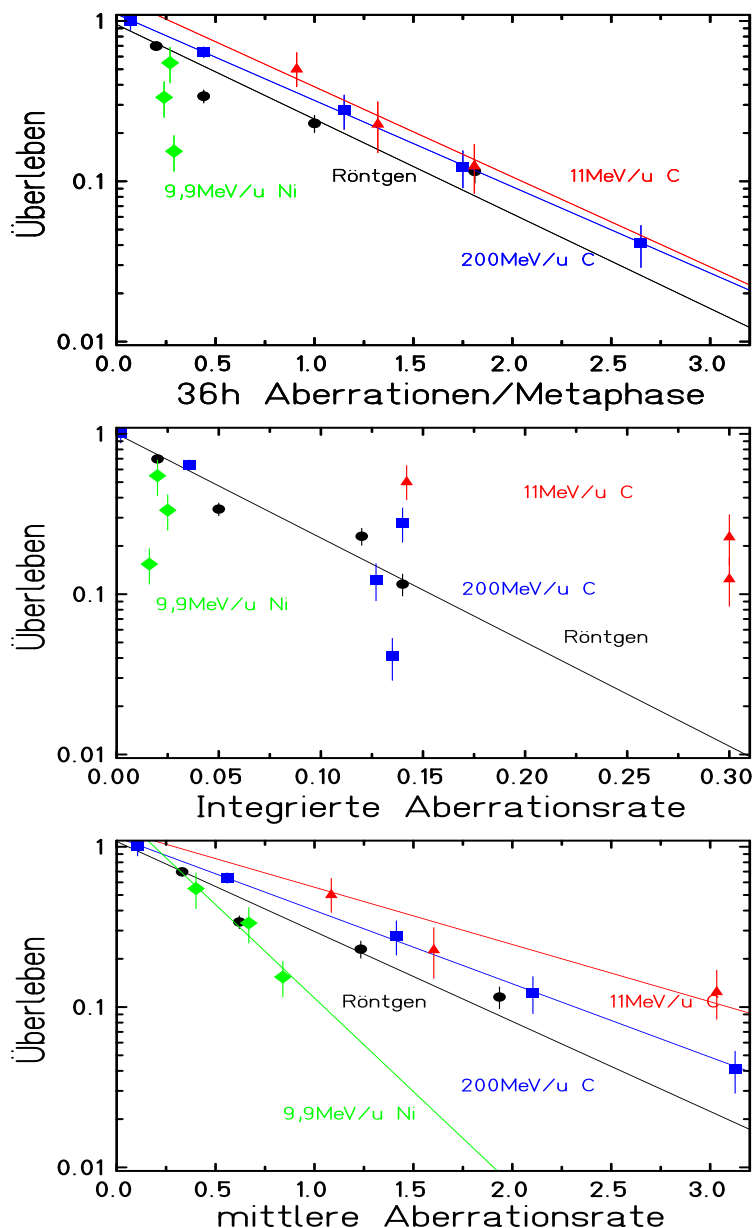


Abbildung 5.4: Zusammenhang zwischen klonogenem Überleben und der Anzahl von Aberrationen je Metaphase nach Bestrahlung mit Röntgen-Strahlung (LET etwa $2 \text{ keV}/\mu\text{m}$), 200 MeV/u Kohlenstoffionen (LET $16 \text{ keV}/\mu\text{m}$), 11 MeV/u Kohlenstoffionen (LET $150 \text{ keV}/\mu\text{m}$) und 9,9 MeV/u Nickelionen (LET $2450 \text{ keV}/\mu\text{m}$) 36 h nach Lösen der Kontaktinhibition (oben), bestimmt nach Integration der Daten (mitte) und aus dem Mittelwert von 6-14 verschiedenen Sammelzeitpunkten je Datenpunkt (unten). Es sind hier Daten der vorliegenden Arbeit (11 MeV/u C und 9,9 MeV/u Ni) sowie von E.Nasonova (persönliche Kommunikation) (Röntgen und 200 MeV/u C) dargestellt. Für die untere Abbildung wurden die Daten aus verschiedenen Experimenten auf den gleichen Anteil von Zellen in der jeweiligen Kontrollpopulation korrigiert, die die erste Mitose nach Bestrahlung erreichen.

berrationen von E.Nasonova (persönliche Kommunikation) und der vorliegenden Arbeit für Strahlung unterschiedlichen LETs in dreierlei Weise betrachtet. Dabei wurde das klonogene Überleben der Aberrationsrate zu einem Zeitpunkt, der über die Zeit integrierten Aberrationsrate bezogen auf die Ausgangspopulation und der über die Zeit gemittelten Aberrationsrate gegenüber gestellt.

Die Datenpunkte in Abbildung 5.4 (oben) entsprechen der von anderen Autoren für Fibroblasten beschriebenen Sammelzeit von 32 - 36 h nach Lösen der Kontaktinhibition [Nagasawa et al., 1985, Bedford and Cornforth, 1987, Cornforth and Bedford, 1987, Griffin et al., 1995, Pandita und Geard, 1996]. Wie sich zeigt, besteht für LET-Werte $< 160 \text{ keV}/\mu\text{m}$ zwischen der Anzahl Aberrationen je Metaphase und der Inaktivierung von Zellen ein exponentieller Zusammenhang, der Gleichung 5.1 folgt [z.B. Bedford und Cornforth, 1987].

$$S = e^{-Y_L} \quad \ln S = -Y_L \quad (5.1)$$

Hierbei beschreibt S das klonogene Überleben und Y_L die Anzahl Aberrationen je Metaphase. Die Daten für hoch-LET-Nickelstrahlung sind mit dieser Gleichung nicht vereinbar und korrelieren auch nicht in anderer Weise mit dem klonogenen Überleben. Der Grund hierfür ist in einem stark verzögerten Auftreten der Aberrationen zu suchen, wie schon in Abschnitt 5.4.1 dargestellt wurde.

Um trotz Verzögerung den Schaden vollständig zu erfassen und damit verschiedene Strahlenarten vergleichen zu können, wurde von Scholz et al. (1998) die Integration der mit dem Mitoseindex gewichteten Daten vorgeschlagen. Die von Ritter et al. 1996 und 2000 untersuchten Dosispunkte an Hamster-Zellen reichen jedoch nicht aus, um Aussagen über die Korrelation mit dem klonogenen Überleben zu treffen und andere integrierte Daten sind in der Literatur nicht verfügbar. Die Integration der gewichteten Aberrationsraten für Fibroblasten in der vorliegenden Arbeit führte nur nach Röntgenbestrahlung zu korrelierenden Werten, wie Abbildung 5.4 (mitte) veranschaulicht. Dies ist auf die immer geringere Anzahl von Zellen zurückzuführen, die nach Bestrahlung die Mitose erreichen und stimmt mit den in Abschnitt 5.4.2 diskutierten Beobachtungen überein. Da es sich bei den verwendeten Fibroblasten um primäre Zellen handelt, sollten an etablierten Zelllinien bestimmte Daten auch für Strahlung höheren LETs eine Korrelation zeigen.

Wurden dagegen wie in Abbildung 5.4 (unten) die Mittelwerte aus bis zu 14 Sammelzeitpunkten gebildet und dem klonogenen Überleben gegenübergestellt, so ergab sich für alle verwendeten Strahlenarten eine Korrelation, die der oben beschriebenen Formel 5.1 folgt. Bei gleichem Überleben zeigt sich mit steigendem LET ein Anstieg der Aberrationen je Metaphase. Bei Bestrahlung mit Nickelionen jedoch können nur noch geringe Anteile des Schadens im Metaphasenpräparat erfaßt werden und die Anzahl Aberrationen je Metaphase sinkt. Diese Beobachtung unterstützt nocheinmal die in Abschnitt 5.2 beschriebenen Vermutung, daß

hoch-LET-Strahlung zu stark ausgeprägten Zellzyklusarresten führt, die die untersuchte Population selektionieren. Die Korrelation mit der Inaktivierung besteht in gleicher Weise auch für die Mittelwerte aus den Anteilen aberranter Zellen.

Der Mittelwert aus mehreren Sammelzeitpunkten ermöglicht es, die Induktion von Chromosomenaberrationen verschiedener Strahlenarten ohne Berücksichtigung der Zellzyklusverzögerungen zu vergleichen. Dabei kann auf die Untersuchung vieler Zeitpunkte im Hinblick auf den Mitoseindex nicht verzichtet werden. Die aufwendige Auswertung der Chromosomenaberrationen jedoch kann auf 4 - 5 ausgewählte Zeitpunkte reduziert werden, die den Zeitverlauf des Index 1. Mitosen gleichmäßig abdecken.

Eine alternative Möglichkeit der Untersuchung chromosomaler Schäden unter Ausschluß von Zellzykluseffekten bietet die „premature chromosome condensation PCC“-Technik, die es erlaubt, den genetischen Schaden von Zellen in G_0/G_1 -Phase und damit ohne Einwirkung von Zellzyklusstörungen zu bestimmen. Die initiale Fragmentausbeute steigt mit zunehmendem LET in Abhängigkeit von der Fluenz an. Der Zusammenhang zwischen Fluenz und Fragmentausbeute ist dabei linear [z.B. Nasonova et al., 2001]. Dennoch ist auch die PCC-Technik in ihrer Anwendung limitiert, denn die Herstellung der Präparate und deren Auswertung verlangen einige Erfahrung vom Experimentator und nur wenige Aberrationstypen können ohne die aufwendige und teure Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) unterschieden werden.

5.4.4 Mikrokerne

Im Gegensatz zur Chromosomenanalyse ist die Bestimmung der Mikrokernfrequenz schnell und einfach durchzuführen und von der Erfahrung der auswertenden Person relativ unabhängig, so daß sie als Standardmethode diskutiert wird [z.B. Wolff, 1991].

Unter Mikrokerneln versteht man Chromosomen oder Chromosomen-Fragmente, die während der Teilung einer Zelle nicht in einen der beiden Tochterkerne integriert werden konnten und als Satellitenkern(e) im Zytoplasma einer oder beider Tochterzellen liegen [z.B. Geard und Chen, 1990]. Dabei zeigen Mikrokerne den Verlust von genetischem Material an, der durch DNA-Schäden oder Schäden am Spindelsystem der sich teilenden Zelle bewirkt wird. Viele Autoren beschreiben die Eignung des Testes als „predictive assay“ zur Untersuchung der Strahlensensibilität [Rudd et al., 1988, Wandl et al., 1989, Nachtrab et al., 1998, Sgura et al., 2000] oder der Wirkung von Umweltgiften [Au et al., 1991, Fenech, 1993], die erzielten Ergebnisse jedoch sind widersprüchlich [Abend et al., 1995, Guo et al., 1998, O’Driscoll et al., 1998, Abend et al., 2000, Akudugu et al., 2000].

Zur Vereinheitlichung der Methoden beschrieb 1993 Fenech ein Standardverfahren zur Untersuchung von Mikrokernen unter Verwendung von Cytochalasin B, das die Teilung der Tochterkerne, aber nicht des Zytoplasmas der Zelle erlaubt und damit sicherstellt, daß nur Zellen untersucht werden, die sich einmal geteilt haben. Dabei scheint die Anwendbarkeit der Methode stark durch die Zelllinie beeinflusst zu sein. Untersuchungen an Nagetier- und Tumor-Zellen [Wandl et al., 1989, Abend et al., 1995, Guo et al., 1998, Abend et al., 2000, Sgura et al., 2000], sowie an humanen Lymphozyten [Au et al., 1991, Fenech, 1993] wurden vielfach als aussagekräftig beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigte sich an menschlichen Fibroblasten, daß wie auch in der vorliegenden Arbeit, Cytochalasin B toxisch auf die Zellen wirkt [Nachtrab et al., 1998, Belyakov et al., 1999]. Zudem wird der Nachweis von Mikrokernen in menschlichen Fibroblasten durch Zellzyklusarreste beeinflusst [Belyakov et al., 1999], da vor der ersten Mitose nach Bestrahlung arretierte Zellen trotz Schaden keine Mikrokerne mehr ausbilden. Auch langsamwachsende Fibroblasten aus Patienten-Biopsien können nicht in „predictive assays“ verwendet werden, da sie nur wenige Mikrokerne ausbilden [Nachtrab et al., 1998, O'Driscoll et al., 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl Mikrokerne nicht unter Anwendung von Cytochalasin B, sondern im Rahmen der Auswertung der in S-Phase markierten Zellen bestimmt. Die so untersuchte Population ist bis zu 55 % größer, als der Anteil Zellen, der nach Bestrahlung Mikrokerne ausbilden konnte, wie Abbildung 5.2 zeigt. Die Daten wurden daher wie in Abschnitt 4.2.5 beschrieben korrigiert. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmte Spontanrate von Mikrokernen betrug zwischen 0 und 2,4 % und stimmt damit mit den ebenfalls an AG-Zellen gemessenen Wert von 1,5 % [Geard und Chen, 1990] und für andere Fibroblasten von 0,8-1,8 % überein. Nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenarten zeigt sich wie bei Fenech (1993) ein dosisabhängiger Anstieg der Mikrokernfrequenz. Der LET-abhängige Anstieg, den Sgura et al. (2000) an Hamsterzellen beschreibt, kann an den hier verwendeten AG-Zellen zunächst ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 4.19). Die Anzahl Zellen, die einen Mikrokern ausbilden, fällt jedoch nach Erreichen eines Maximums zwischen 100 und 200 keV/ μ m wieder deutlich ab (Abbildung 4.19, unten links). Beim Vergleich ähnlicher Überlebensraten unterschiedlicher Strahlung wurden ähnliche Mikrokernfrequenzen beobachtet, wobei jedoch für hoch-LET-Nickelionen wiederum ein geringerer Anteil mikrokernhaltiger Zellen auftrat.

Bei der Auswertung von Mikrokernen kann es zu verschiedenen Störungen kommen, die das Ergebniss beeinträchtigen. So kommt es vor, daß der Hauptkern Mikrokerne verdeckt oder daß sehr kleine Kerne nicht mehr sichtbar sind. Zum Teil entsteht aus einem azentrischen Fragment kein Mikrokern, sondern das genetische Material wird mit in einen der Tochterkerne integriert. So konnten z.B. von Cornforth und Goodwin (1991) nur 53-57 % der nach γ -Bestrahlung in Me-

taphase beobachteten azentrischen Fragmente als Mikrokern nachgewiesen werden. Aus den in der vorliegenden Arbeit bestimmten mittleren Aberrationsraten (Abbildung 5.3) und Mikrokernfrequenzen bezogen auf 100 geteilte Zellen (ohne Abbildung) ergibt sich, daß der zu Mikrokernen werdende Anteil von Chromosomenaberrationen mit steigendem LET für ähnliches klonogenes Überleben (etwa 20 %) von 55 % nach Röntgenstrahlung auf 15 % nach 11 MeV/u Kohlenstoffionen sinkt und für 9,9 MeV/u Nickelionen wieder auf 51 % steigt. Für eine größere Anzahl von Aberrationen, wie im Fall von 11 MeV/u Kohlenstoff, ist auch die Wahrscheinlichkeit höher, daß in einem Mikrokern mehrere Fragmente eingeschlossen werden oder genetisches Material mit in den Hauptkern integriert wird. Die Anzahl der Mikrokern ist daher kein direktes Maß für die Anzahl der Chromosomenaberrationen. Die Anzahl der Zellen mit Mikrokern je 100 geteilte Zellen ist mit dem mittleren Anteil aberranter Metaphasen vergleichbar, 46 - 66 % werden bei ähnlichem klonogenem Überleben im Mikrokerntest wiedergefunden.

Da menschliche Fibroblasten, wie schon in Abschnitt 5.2 diskutiert, über wirksame Kontrollmechanismen verfügen, spiegeln die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten nicht nur den entstandenen genetischen Schaden wieder, sondern auch den starken Einfluß von Zellzyklusarresten auf die Untersuchung genetischer Endpunkte (Abbildung 4.18). Dieser Einfluß ist bei den verschiedenen Strahlenarten unterscheidlich stark ausgeprägt und bewirkt eine Selektion der untersuchten Zellpopulation. Die Interpretation von Mikrokernmessungen sollte daher mit großer Vorsicht geschehen.

5.5 Relative biologische Wirksamkeit RBW und Wirkungsquerschnitte σ

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wirkung schwerer Ionen auf menschliche Hautfibroblasten. Dabei stand insbesondere die Induktion chromosomaler Schäden im Mittelpunkt des Interesses.

Wie bereits an unterschiedlichen Zelllinien gezeigt wurde, bewirkt Schwerionen-Strahlung stärkere Zellzyklusstörungen als dünnionisierende Strahlung [Lücke-Huhle et al., 1979, Collyn-d'Hooghe et al., 1981, Ritter et al., 1990, Scholz et al., 1994]. Um diese Störungen bei der Analyse von Chromosomenaberrationen auszugleichen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Daten wie in Abschnitt 3.4.9.3 beschrieben integriert. Die Diskussion der Ergebnisse in diesem Kapitel zeigt jedoch, daß die an etablierten Zelllinien entwickelten Methoden nicht ohne Weiteres auf humane diploide Zellen zu übertragen sind, da sich primäre menschliche Zellen und etablierte Hamster-Zellen in ihrer Zellzykluskontrolle unterscheiden. Um diese Einflüsse auf die Ergebnisse einzelner Meßmethoden soweit wie möglich auszugleichen, werden im Folgenden mehrere Endpunkte zum Vergleich von dünn- und dichtionisierender Strahlung verwendet. Dabei

dient die RBW dem Vergleich der Effektivität einer getesteten Strahlung mit einer Referenzstrahlung (wie hier 250kV Röntgenstrahlung). Die RBW hängt vom betrachteten biologischen Endpunkt und dem betrachteten Schadensniveau ab (Abbildung 2.2). Währenddessen beschreibt der Wirkungsquerschnitt σ die Wirksamkeit des einzelnen Teilchens und ist von der Wirkung einer Referenzstrahlung unabhängig (Abschnitt 3.4.3).

Die RBW von Strahlung ist von vielen Autoren für verschiedene Endpunkte wie Zellzyklusarrest, Aberrationsrate oder Überleben untersucht worden [Barendsen et al., 1963, Skarsgard et al., 1967, Lücke-Huhle et al., 1979, Pandita und Geard, 1996, Weyrather et al., 1999]. Dabei zeigte sich für alle Endpunkte ein Absinken der RBW mit ansteigender Dosis und ein Anstieg mit steigendem LET bis zu einem Maximalwert und einem anschließenden Abfall auf Werte unter 1 [Barendsen et al., 1963, Skarsgard et al., 1967]. Der Maximalwert zeigt mit steigender Ordnungszahl des Ions eine Verschiebung zu höheren LET-Werten und liegt für Protonen bei etwa 25 MeV/ μm und für Kohlenstoff zwischen 150 und 200 MeV/ μm [Kraft, 1999, Weyrather et al., 1999]. Die in der vorliegenden Arbeit für verschiedene Endpunkte bestimmten RBWs sind zur besseren Übersicht in Tabelle 5.2 zusammengestellt und in Abbildung 5.5 veranschaulicht. Die RBW-Werte stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Werten für AG-Zellen gut überein [Füssel, 1997, Wu et al., 1997, Fournier, 2001].

Darüberhinaus zeigen die Daten, daß neben der vielfach beschriebenen Abhängigkeit vom untersuchten Endpunkt, der Höhe des Schadensniveaus und des Dosisbereiches, die RBW auch stark davon abhängt, ob die untersuchten Endpunkte von Zellzykluseffekten beeinflusst werden. Die Messung von Zyklusarresten oder zeitlich weit davon entfernte Endpunkte wie das klonogene Überleben sind davon nicht betroffen. Alle Endpunkte dagegen, die zeitlich in der Nähe der ersten Mitose nach Bestrahlung bestimmt werden, wie z.B. Chromosomenaberrationen oder Mikrokerne Summe der verschiedenen Effekte dar. Dies kann zu einer Steigerung oder Unterdrückung der Wirkung z.B. durch Selektion der untersuchten Zellpopulation führen und für Referenz- und Test-Strahlung unterschiedlich stark ausgeprägt sein, wodurch wiederum die berechnete RBW beeinflusst wird.

Diese Einflüsse bewirken auch, daß je nach Art der Auswertung der Daten unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden, wie auch von Lücke-Huhle et al. (1979) gezeigt wurde. Abbildung 5.5 (rechts) zeigt die aus dem gleichen Datensatz bestimmte RBW für Chromosomenaberrationen nach unterschiedlicher Auswertung. Es werden dabei RBW-Werte zwischen 2,9 und etwa 9 bestimmt. Wie Abbildung 5.5 ebenfalls zeigt, werden besonders drastische Schwankungen im Bereich der maximalen RBW beobachtet, während für kleine und sehr große LET-Werte kaum Schwankungen auftreten.

Auf Grund der starken Schwankungen wird die Aussagekraft der RBW z.B. von Kiefer (1992) in Frage gestellt. Dabei stellt der Bezug auf die Dosis ein weiteres Problem dar, denn im Fall von hoch-LET-Strahlung gibt es keine geringen Dosen,

	200 MeV/u C	11 MeV/u C	9,9 MeV/u Ni
10% Überleben 0h	1,2	2,1	0,4
10% Überleben 24h	1,5	3,9	0,8
S-Phasen-Markierung *	1,9	4,3	1,0
Summe 1. Mitosen *	1,4	2,0	0,7
Aberrationsrate 36h *	1,5	2,9	<0,01
Aberrationsrate 65h *	1,9	4,6	0,4
integr. Aberrationsrate **	~1,7	~9	<0,01
mittl. Aberrationsrate *	1,6	5,9	0,3
Mittelwert ***s.u.	1,6	3,6	<0,5

Tabelle 5.2: RBWs für die unterschiedlichen biologischen Endpunkte, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. * Die RBWs wurden aus linearen Dosis-Effekt-Kurven bestimmt und sind daher vom Schadensniveau unabhängig. ** Berechnet für 0,1 Aberrationen/Metaphase. ***Bei der Berechnung des Mittelwertes aus allen untersuchten Endpunkten (Abb. 5.5 fett gedruckte Linie) wurden die Werte aus der integrierten Aberrationsrate (Abb. 5.5 gepunktete Linie) nicht berücksichtigt, da sie, wie in Abschnitt 5.4.2 und 5.4.3 diskutiert, eine vollständig andere Aussage beinhalten und von den anderen Endpunkten stark abweichen.

sondern nur wenige Treffer [Kiefer, 1992]. Außerdem wird bei der Betrachtung der Dosis die Struktur der Teilchenspur nicht berücksichtigt. Der beobachtete Effekt wie z.B. die Inaktivierung von Zellen ist jedoch für hoch-LET-Strahlung vorwiegend von der Trefferwahrscheinlichkeit und den Spurparametern abhängig [Barendsen et al., 1963, Krämer und Kraft, 1994].

Eine alternative Möglichkeit zum Vergleich der Wirkung von Teilchenstrahlung stellt der Wirkungsquerschnitt σ dar, der die Wirksamkeit einer Strahlung je Teilchen beschreibt. Im Unterschied zur RBW ist σ von einer Referenzstrahlung unabhängig. Wie in Tabelle 5.3 gezeigt ist, steigt σ im untersuchten LET-Bereich an und fällt auch für Nickelionen nicht wieder ab, wie bei der RBW beobachtet wurde. Die Wirksamkeit des einzelnen Teilchens steigt also mit dem LET der verwendeten Strahlung an. Die wenigen Vergleichsdaten für die Bestrahlung von humanen Fibroblasten mit schweren Ionen sind mit den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werten vereinbar [M.Suzuki et al., 2000].

Zusammenfassend wurde festgestellt, daß die bestimmten RBW-Werte mit den in der Literatur beschriebenen Daten vergleichbar sind und die gleiche Dosis- und LET-Abhängigkeit zeigen. Für hohe RBW-Werte ergibt sich jedoch auch eine sehr große Spanne, die die Aussagekraft der RBW in Frage stellt. Blanke Zahlenwerte ohne Angabe des verwendeten Zellsystems, des betrachteten Endpunktes und des verglichenen Schadensniveaus sind daher zur Beschreibung der Wirksamkeit einer Strahlung ungeeignet.

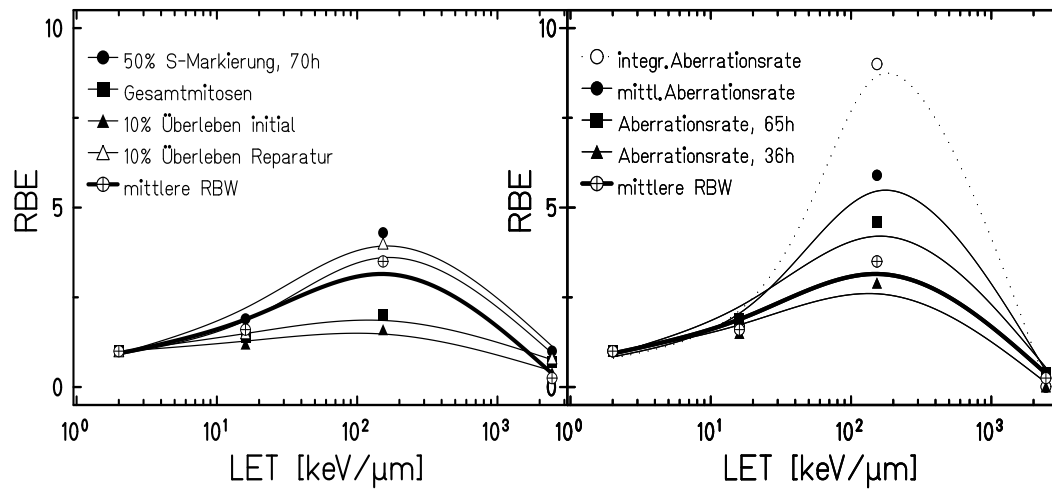


Abbildung 5.5: Die in Tabelle 5.2 zusammengefaßten RBEs werden in Abhängigkeit von LET gezeigt (links). Zur besseren Übersicht wurden die Werte, die aus dem gleichen Datensatz für Chromosomenaberrationen durch unterschiedliche Berechnung bzw. zu verschiedenen Zeiten erhalten wurden, getrennt dargestellt (rechts). In beiden Abbildungen ist die mittlere RBW als fettgedruckte Linie dargestellt.

σ [μm^2]	200 MeV/u C	11 MeV/u C	9,9 MeV/u Ni
Überleben 0h	2,2	32	92
Überleben 24h	1,1	29	97
S-Phasen-Markierung	0,9	9,4	46
Summe 1. Mitosen	1,2	15	107
mittlere Aberrationsrate	1,6	51	56
Mittelwert	1,4	27	80

Tabelle 5.3: Wirkungsquerschnitt σ für die unterschiedlichen biologischen Endpunkte, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Die RBWs wurden aus linearen Fluenz-Effekt-Kurven berechnet und sind daher vom Schadensniveau unabhängig.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Schwerionen auf primäre Fibroblasten zu untersuchen. Die hierbei bestimmten Daten zeigen deutlich, daß die Relative Biologische Wirksamkeit (RBW) nicht nur die vielfach beschriebene Abhängigkeit vom untersuchten Endpunkt, der Höhe des Schadensniveaus und des Dosisbereiches aufweist. Die RBW hängt vielmehr stark davon ab, wie die untersuchten Endpunkte von Zellzykluseffekten beeinflusst werden.

Die Messung von Endpunkten, die zeitlich weit von der ersten Mitose nach Bestrahlung bestimmt werden, wie z.B. das klonogene Überleben, sind von Zellzyklusstörungen nicht betroffen. Alle anderen Endpunkte dagegen, die in der zeitlichen Nähe bestimmt werden, wie z.B. die Induktion von Chromosomenaberrationen oder Mikrokernen spiegeln die Summe aus der Zellzyklusstörung und dem untersuchten Effekt wieder. Nach Bestrahlung stehen der geschädigten Zelle hierbei drei Wege zur Verfügung: Arretierung im Zellzyklus, Differenzierung und Apoptose, wobei letztere bei Fibroblasten keine Rolle spielt. Diese Zyklusstörungen können zu einer Steigerung oder Unterdrückung der Wirkung z.B. durch Selektion der untersuchten Zellpopulation führen und für Referenz- und Test-Strahlung unterschiedlich stark ausgeprägt sein, wodurch wiederum die berechnete RBW beeinflusst wird.

Ein Ziel der biologischen Strahlenforschung ist die Vorhersage der verschiedenen Wirkungen von Strahlung im sogenannten „predictive assay“ bzw. das Nachvollziehen einer Bestrahlung in der „biologische Dosimetrie“ [Bender et al., 1988, Wolff, 1991, Edwards, 1997, Yang et al., 1997, Testard und Sabatier, 1999]. Auf Grund ihrer Verfügbarkeit werden für die Risikoabschätzung z.B. im Strahlenschutz oftmals Chromosomendaten von etablierten Hamsterlinien herangezogen. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, daß primäre humane Fibroblasten im Gegensatz zu etablierten Hamster-Zelllinien bei einer Schädigung durch Strahlung aus dem Proliferationszyklus ausscheiden und in die vorzeitige Differenzierung gehen. Auch andere menschliche Zellsysteme wie z.B. Lymphozyten, die wegen ihrer guten Zugänglichkeit ein ideales Studienobjekt darstellen, verfügen ebenfalls über Mechanismen zur Stabilisierung des Genoms und sterben vielfach vor Erreichen der ersten Mitose nach Bestrahlung durch Apoptose oder treten aus der Ruhe-

phase nicht wieder in den Zellzyklus ein.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Einflüsse von Substanzen, deren Anwendung für die Durchführung bestimmter Methoden unerlässlich sind, wie z.B. BrdU, Colcemid oder auch Cytochalasin B bewirken Eingriffe in das Testsystem Zelle. In wieweit das Zellsystem durch die Untersuchung selbst gestört wird, darf bei der Interpretation der Daten nicht unbeachtet bleiben und sollte daher für jede Änderung der Versuchsbedingungen erneut überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Integration über die Zeit der genetische Gesamtschaden in der bestrahlten Zellpopulation bestimmt. Auf diese Weise wurden alle proliferierenden Zellen untersucht. Ein Großteil der Zellen erfährt nach Teilchenbestrahlung bedingt durch die hohen lokalen Ionisationsdichten einen permanenten Zellzyklusarrest bzw. eine beschleunigte Differenzierung. Nur ein kleiner Teil kann dagegen weiter proliferieren und einen genetischen Schaden auf die folgenden Generationen übertragen. Der Anteil geschädigter Zellen unter diesen Zellen ist viel kleiner, als anhand von Daten aus Hamster-Experimenten angenommen wurde. Es stellt sich daher die Frage, ob bisher getroffene Risikoabschätzungen nicht zu hoch waren. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß durch die Differenzierung nicht nur genetische Schäden unterdrückt, sondern auch andere Effekte wie z.B. die Ausbildung einer Fibrose bewirkt werden können.

Die im Vergleich von Daten aus Experimenten an etablierten Hamsterlinien und an primären menschlichen Zellen beobachteten Unterschiede lassen keine Rückschlüsse auf ihre Ursache zu. Gerade für die Beurteilung von Ergebnissen aus Tierexperimenten wäre es aber wünschenswert zu wissen, ob die Unterschiede auf der Art der Zellen, also etablierten und primären Zellen beruhen, oder von der Spezies abhängen. Dazu sind weitere Untersuchungen an primären Hamster-Zellen oder etablierten menschlichen Zellen notwendig. Weiterhin bleibt offen, inwieweit sich an Zellkulturen gewonnene Ergebnisse auf intakte Gewebe übertragen lassen und ob Nagetiere im *in vivo* Versuch für den Menschen relevante Ergebnisse liefern.

Anhang A

Abkürzungsverzeichnis

BIBA	biologische Bestrahlungseinrichtung
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
CCD	Charge Coupled Device
CPD	Cumulative Population Doubling
DAPI	4',6-Diamino-2-phenyl-indol
dC	Deoxycytidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Absorbance-Assay
EMEM	Earle's Minimum Essential Medium
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
ID	Initial Damage
LET	linearer Energietransfer [$\text{keV}/\mu\text{m}$]
LD	Lethal Damage
LDH	Laktat-Dehydrogenase

MEM	Minimum Essential Medium
MI	Mitose Index [%]
MF	mitotischer Fibroblast
n.d.	nicht durchgeführt
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblast
NHLF	Normal Human Lung Fibroblast
pA	pro analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline (Puffer)
PCC	Premature Chromosome Condensation
PE	Plating Efficiency
PI	Propidium Iodid
PLD	Potential Lethal Damage
PMF	post-mitotischer Fibroblast
pPDC	p-Phenylen-diamin-dihydrochlorid
RBW	relative biologische Wirksamkeit
S	Zellüberleben [%]
SCE	Schwester-Chromatiden-Austausch
SEETRAM	SEcondary Electron Transmission Monitor
SF_2	überlebende Fraktion bei 2 Gy
SIS	Schwer-Ionen-Synchrotron
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
UNILAC	Universal Linear Accelerator
Upm	Umdrehungen pro Minute
well	Vertiefung einer Mikro-Titer-Platte

Außerdem werden die allgemein üblichen Abkürzungen, sowie die Abkürzungen des SI-Einheiten-Systems verwendet.

Anhang B

Materialien

B.1 Chemikalien

Chemikalien:

Amphotericin	PAN, Aidenbach
Bisbenzimid Hoechst Nr.33258	Sigma, Deisenhofen
5-Brom-2'-desoxyuridin BrdU	Serva, Heidelberg und Boehringer, Mannheim
Colcemid 10 μ g/ml	Boehringer, Mannheim
Coomassie brillant blue G250	Serva, Heidelberg
Cytochalasin B	Sigma, Deisenhofen
2'-Deoxycytidin dC	Serva, Heidelberg
4',6-Diamino-2-phenylindol DAPI	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Earle's balanced salts solution 10 \times	Sigma, Deisenhofen
EDTA 1%ig	PAN, Aidenbach
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol pA	LS Labor Service, Darmstadt und Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid EtBr 10mg/ml	Sigma, Deisenhofen
Eukitt	O.Kindler, Freiburg
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt
L-Glutamin 200mM	PAN, Aidenbach

Glutaraldehyd 25%	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Serva, Heidelberg
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
May-Grünwald-Lösung	Merck, Darmstadt
MEM essentielle Aminosäuren 50×	Sigma, Deisenhofen
MEM nicht-ess. Aminosäuren 100×	Sigma, Deisenhofen
MEM Vitamine 100×	Sigma, Deisenhofen
Methanol pA	LS Labor Service, Darmstadt und Merck, Darmstadt
Methylenblau-Lösung, Löfflers	Merck, Darmstadt
Natrium-Bicarbonat-Lösung 7,5%	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat $\times 2H_2O$	Merck, Darmstadt
Natronlauge, 1N, steril	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen und Merck, Darmstadt
p-Phenylendiamindihydrochlorid pPDC	Sigma, Deisenhofen
Penicillin 10000U/Streptomycin 10000 μ g/ml	PAN, Aidenbach
PBS, sterile Lösung ohne Ca und Mg	PAN, Aidenbach
PBS, Pulver ohne Ca und Mg	Sigma, Deisenhofen
Propidium Iodid PI	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

Testkits:

BrdU-Labeling and Detection Kit I	Boehringer, Mannheim
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Boehringer, Mannheim
In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Boehringer, Mannheim
Mycoplasma Detection Kit	Boehringer, Mannheim

B.2 Lösungen und Puffer

Antifade	100 mg 10 ml 90 ml	pPDC PBS mit Carbonat-Puffer (42 g/l, pH 9) auf pH 8 einstellen Glycerin sterilfiltrieren, lagern -20°C
Bestrahlungs-Puffer	19,45 ml 0,55 ml	0,2M Dinatriumhydrogenphosphat 0,1M Zitronensäure
Coomassie-Lösung	0,055 g 20 ml 7,5 ml ad 100 ml	Coomassie brillant blue Methanol pA Eisessig Wasser
DAPI-Lösung	1 ng/ml	DAPI in PBS
Hoechst-Färbelösung	4 Teile 1 Teil 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	PBS Ethanol pA Hoechst Nr. 33258 Ethidiumbromid (optional)
Fixativ für Chromosomen	3 Teile 1 Teil	Methanol pA Eisessig
Fixativ Markierung	70 ml 10 ml 20 ml	Ethanol pA 500 mM Glycin-Lösung Wasser
Giemsa-Lösung	3-10%	Giemsa in Sörensen-Puffer
Glutaraldehyd-Lösung	1 Teil 4 Teile	25% Glutaraldehyd PBS
Methylenblau-Lösung	300 ml 90 ml 50 ml ad 1000 ml	Löfflers Methylenblau-Lösung 0,1% Kaliumhydroxid Methanol pA Wasser
Paraformaldehyd-Lösung	3,7% 2 ml	Paraformaldehyd in PBS 1N Natronlauge je 100 ml
Sörensen-Puffer	1 Teil 1 Teil	0,067M Kaliumdihydrogenphosphat 0,067M Dinatriumhydrogenphosphat
20 \times SSC	175,3 g 88,4 g ad 1000 ml	Natriumchlorid (= 3 M) Natriumcitrat $\times 2\text{H}_2\text{O}$ (= 0,3 M) Wasser

B.3 Medien und Seren

Zellkulturmedium:

Earle's balanced salts solution 10×	100 ml
MEM essentielle Aminosäuren 50×	40 ml
MEM nicht-ess. Aminosäuren 100×	20 ml
MEM Vitamine 100×	20 ml
Na-Bicarbonat-Lösung 7,5%	29,3 ml

mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt,
pH-Wert mit 1N NaOH auf 7,2 eingestellt,
sterilfiltriert

Sonderanfertigungen: PAN, Aidenbach P 04-08049 und
BioWhittaker BESP-134F

gebrauchsfertiges Medium:

Zellkulturmedium mit einem Zusatz von 10 oder 20% FCS, 1% L-Glutamin und unter Umständen Antibiotika (0,5%PS).

Einfriermedium:

Zellkulturmedium mit einem Zusatz von 20% FCS, 1% L-Glutamin, 10% Glycerin und in wenigen Fällen Antibiotika.

Serum:

fötales Kälberserum FCS, P30-33-2 PAN, Aidenbach

Trypsin:

Trypsin-Lösung (0,5g/l +1g/l EDTA) PAN, Aidenbach

B.4 Verbrauchsmaterialien

Cryoröhrchen	1,8ml (Greiner, Frickenhausen)
Deckgläschen	24×60mm (IDL, Nidderau)
Deckgläschen	rund, 50 und 30mm (IDL, Nidderau)
Mikrotiterplatten	96well Nunclon (Nunc, Wiesbaden)
Objektträger	76×26mm (IDL, Nidderau)
Sterilfilter	0,2µm Porengröße, Bottle Top (Nalgene, Rochster, USA)
Zellkulturflaschen	12,5, 25 und 75cm ² , 0,2µm vented blue plug seal cap (Falcon, Lincoln Park, USA)
Zellkulturschalen	35mm (Greiner, Sonderanfertigung)
Zellkulturschalen	60mm (Greiner, Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen	10, 12 und 50ml (Greiner, Frickenhausen)

B.5 Geräte

Brutschränke	Begasungsbrutschränke (Heraeus, Hanau)
Casy 1	Casy 1 Modell TT (Schärfe Systems, Reutlingen)
Durchflußzytometer	PAS II (Partec, Münster) Softwareprogramm MULTICYCLE (Partec, Münster) Softwareprogramm WinMDI (Freeware) Filter siehe [Kirchner, 1996]
ELISA-Reader	ELX 800 (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA)
Einfrierhilfe	(Nalgene, Lincoln Park, USA)
Flowboxen	LaminAir HLB 2448 (Heraeus, Hanau) und LaminAir MaxiSafe 2010 (Holten, Allerød, Dänemark)
Hamilton	Microlab 1000 (Hamilton, Schweiz)
Mikroskop I	Aristoplan (Leitz, Wetzlar)
Okular	Variophot (Leitz, Wetzlar)
Objektive	Imersionsobjektive 10 - 100× (Leitz, Wetzlar)
Photoautomatik	Orthomat E (Leitz, Wetzlar)
Mikroskop II	Fluoreszenzmikroskop DMRB (Leica, Wetzlar)
Objektive	Imersionsobjektive 10 - 100× (Leica, Wetzlar)
Photos	CCD-Kamera Typ VC44 (PCO, Kelheim) Fluoreszenzfilter A 513804 blau (Leica, Wetzlar) Fluoreszenzfilter I3 513808 grün (Leica, Wetzlar) Fluoreszenzfilter G/R 513803 grün/rot (Leica, Wetzlar) Fluoreszenzfilter N2.1 513812 rot (Leica, Wetzlar) Bildverarbeitung ISIS Version 1.90 (Meta-Systems)
Millipore-Anlage	Milli-Q Plus (Millipore, Eschborn)
Röntgenröhre	IV-320-12 (Seifert, Bridge Port, USA)
UV-Lampe	Wellenlänge 360nm (Novodirekt, Karlsruhe)
Zentrifugen	Megafuge 10 Rotor 270mm (Heraeus, Hanau) Minifuge RF Rotor 270mm (Heraeus Sepatech, Hanau)

Anhang C

Tabellen

C.1 Chromosomenaberrationen

In den Tabellen dieses Anhangs sind die Daten der Abschnitte 4.2.6 und 4.3.8 dargestellt. Für die Darstellung der einzelnen Aberrationsarten wurden die verschiedenen Gruppen von Aberrationen wie in Abschnitt 3.4.9 beschrieben zusammengefasst.

Die dargestellten Kategorien beinhalten:

- ctb Chromatidbrüche
- csb Chromosomenbrüche
- ar azentrische Ringe
- dic dizentrische Chromosomen mit begleitendem Fragment
- r zentrische Ringe mit begleitendem azentrischem Fragment
- cte Chromatid-Austausch und andere seltene Aberrationen

Eine genaue Beschreibung der einzelnen Aberrationsarten findet sich in Abschnitt 3.4.9. Die gezeigten Daten wurden für AG-Zellen bestimmt und beziehen sich auf 100 Metaphasen im 1. Zellzyklus nach Bestrahlung. Konnten keine 100 Metaphasen ausgewertet werden, so wurden die ermittelten Daten entsprechend umgerechnet. Die in den Tabellen angegebene Zeit bezieht sich auf das Ende des 4 h-Intervalls.

C.1.1 250 kV Röntgenstrahlung

0 Gy Röntgen mit BrdU

Zeit [h]	Aberrationen/100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]	Anteile Mit. [%]		
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.		1.	2.	3.
37	5	13	0	2	0	1	21	19	100	1.0	97.0	3.0	0
41	4	10	0	6	0	1	21	20	100	2.23	91.4	8.6	0
49	3	13	1	6	0	0	23	23	100	1.6	93.2	6.8	0
53	6	7	0	1	0	1	15	15	100	0.6	79.1	20.9	0

3 Gy Röntgen mit BrdU

Zeit [h]	Aberrationen/100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]	Anteile Mit. [%]		
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.		1.	2.	3.
37	10	47	32	39	3	8	139	76	90	0.3	100	10	0
41	12	30	27	53	5	3	130	71	100	0.8	100	0	0
49	4	43	34	66	1	1	149	84	100	0.7	100	0	0
53	4	65	24	54	3	4	154	80	100	0.4	94.5	5.5	0

0 Gy Röntgen ohne BrdU

Zeit [h]	Aberrationen /100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.	
33	13	8	1	1	0	2	26	20	100	0.5
37	12	4	4	4	0	2	26	21	100	2.3
41	5	3	3	0	0	2	13	13	100	5.2
49	3	6	0	3	0	3	15	13	100	2.2
53	3	3	3	6	0	0	15	13	100	2.4

3 Gy Röntgen ohne BrdU

Zeit [h]	Aberrationen /100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.	
37	10	37	31	57	4	2	142	75	100	1.0
41	10	36	41	46	1	3	139	69	100	0.7
49	4	42	37	55	1	2	141	78	100	1.7
53	6	41	38	65	1	1	152	79	100	0.7

C.1.2 11 MeV/u Kohlenstoff (LET 153 keV/ μm)

Kontrolle 0 Gy mit BrdU

Zeit [h]	Aberrationen/100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]	Anteile Mit. [%]		
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.		1.	2.	3.
38	11	7	0	1	0	0	19	17	100	2.5	98.5	1.5	0
46	7	12	2	7	0	3	31	22	100	1.6	62.5	37.5	0
54	0	14	2	6	0	0	22	18	50	1.1	18.9	79.9	1.2
62	4	6	2	6	0	0	18	18	50	0.8	13.1	70.1	16.8

0,5 Gy $\hat{=}$ 2×10^6 Teilchen/ cm^2 mit BrdU

Zeit [h]	Aberrationen/100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]	Anteile Mit. [%]		
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.		1.	2.	3.
32	13	36	10	20	3	3	85	44	100	0.1	100	0	0
36	7	21	24	20	2	1	75	49	100	1.1	100	0	0
40	10	45	27	31	1	1	115	66	100	1.4	40	0	0
44	6	48	15	26	1	0	96	59	100	1.8	98.1	1.9	0
48	9	51	26	41	2	1	130	69	100	0.6	85.1	14.9	0
52	2	39	27	37	1	4	111	57	100	0.7	76.0	24.0	0
56	2	47	30	35	1	3	118	64	100	0.7	53.1	46.5	0.3
60	6	26	27	36	3	0	98	61	100	0.7	33.8	62.0	4.2
64	8	46	38	42	0	6	140	75	52	0.6	28.2	63.8	8.0
68	3	34	39	32	0	3	111	58	38	0.4	28.1	56.1	15.8

1 Gy $\hat{=}$ 4×10^6 Teilchen/ cm^2 mit BrdU

Zeit [h]	Aberrationen/100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]	Anteile Mit. [%]		
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.		1.	2.	3.
32	7	39	22	28	7	1	104	54	100	0.1	100	0	0
36	8	46	24	43	1	0	132	65	100	1.6	100	0	0
40	5	68	41	54	7	1	175	77	100	2.2	99.1	0.9	0
44	4	74	34	66	3	0	181	79	100	1.0	100	0	0
48	1	60	49	61	2	3	179	88	100	0.9	95.5	4.5	0
52	7	67	38	51	3	1	167	74	100	0.7	76.6	23.4	0
56	7	50	60	67	7	1	192	85	100	0.26	57.6	42.0	0.4
60	3	61	47	53	5	4	173	78	100	0.3	43.3	56.7	0
64	2	72	30	56	7	2	169	84	47	0.1	48.1	50.0	1.9
68	21	65	29	62	3	0	180	82	34	0.1	38.0	53.7	8.3
72	6	36	69	31	6	4	152	77	48	0.3	38.2	54.1	7.6

1,5 Gy $\hat{=}$ 6×10^6 Teilchen/cm² mit BrdU

Zeit [h]	Aberrationen/100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]	Anteile Mit. [%]		
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.		1.	2.	3.
36	40	59	41	43	9	7	199	73	70	0.1	100	0	0
40	23	74	52	61	8	8	226	79	100	0.3	99.0	1.0	0
44	20	74	60	78	13	3	248	85	100	0.6	99.0	1.0	0
48	25	64	86	92	13	4	284	83	100	0.6	96.0	4.0	0
52	25	100	102	109	18	2	356	95	100	0.6	92.8	7.2	0
56	21	90	93	101	8	6	320	91	100	0.6	78.0	22.0	0
60	22	76	100	125	20	4	340	93	100	0.4	83.1	16.4	0.5
64	32	84	90	104	14	2	326	93	100	0.2	68.0	32.0	0
68	27	69	87	124	4	6	317	94	81	0.1	62.1	37.3	0.6
72	22	58	68	94	8	0	250	92	50	0.1	48.1	47.4	4.5
76	24	65	100	102	11	0	302	95	63	0.1	47.7	41.2	8.1
80	16	82	86	110	4	0	298	94	50	0.1	46.6	46.6	6.8
84	20	56	90	132	6	0	304	92	50	0.1	47.7	44.7	7.6

C.1.3 9,9 MeV/u Nickel (LET 2450 keV/ μm)

Kontrolle 0 Gy mit BrdU

Zeit [h]	Aberrationen/100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]	Anteile Mit. [%]		
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.		1.	2.	3.
30	3	2	0	4	1	0	10	10	100	2.2	100	0	0
34	6	3	0	1	0	1	11	9	100	5.4	100	0	0
38	6	6	0	2	0	1	15	15	100	5.1	96.4	3.6	0
46	11	7	1	3	0	0	22	19	100	3.1	53.6	46.4	0
54	0	5	5	10	0	0	19	14	21	2.7	17.5	82.5	0

2 Gy $\hat{=}$ $0,5 \times 10^6$ Teilchen/ cm^2 mit BrdU

Zeit [h]	Aberrationen/100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]	Anteile Mit. [%]		
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.		1.	2.	3.
30	9	5	2	4	0	0	20	19	100	0.1	100	0	0
34	10	9	2	4	0	0	25	21	100	2.6	98.6	1.4	0
38	6	9	3	10	0	1	29	23	100	4.5	100	0	0
42	6	12	2	9	0	0	31	26	100	2.6	97.4	2.6	0
46	7	20	6	22	0	0	59	35	100	1.8	79.2	20.8	0
50	5	18	6	23	3	0	56	37	100	1.2	64.4	35.6	0
54	1	20	14	21	1	0	61	44	100	1.2	29.9	69.7	0.4

4 Gy $\hat{=}$ 1×10^6 Teilchen/ cm^2 mit BrdU

Zeit [h]	Aberrationen/100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]	Anteile Mit. [%]		
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.		1.	2.	3.
34	5	10	4	3	0	0	22	15	100	1.7	98.8	1.2	0
38	1	9	4	7	1	0	25	18	100	2.3	98.3	1.7	0
42	3	26	12	21	2	0	65	41	100	2.2	89.0	11.0	0
46	9	36	19	22	1	0	90	54	100	1.5	68.0	32.0	0
50	9	38	23	32	1	3	107	58	100	1.1	39.3	59.2	1.5
54	7	46	15	16	3	2	92	56	98	0.6	26.3	70.9	2.8

8 Gy $\hat{=}$ 2×10^6 Teilchen/cm² mit BrdU

Zeit [h]	Aberrationen/100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]	Anteile Mit. [%]		
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.		1.	2.	3.
32	14	8	0	3	0	0	26	21	100	0.5	99.2	0.8	0
36	1	14	2	9	1	1	29	20	100	0.9	97.7	2.3	0
40	3	24	3	14	2	1	47	33	100	1.1	95.4	4.6	0
44	5	43	14	31	2	0	98	45	100	0.9	77.1	22.9	0
48	9	49	17	42	3	2	124	60	100	0.4	63.4	35.8	0.8
52	2	62	24	32	1	1	124	56	100	0.7	39.1	59.9	1.0
56	14	51	21	45	6	0	140	69	65	0.6	30.7	67.9	1.4

Kontrolle 0 Gy ohne BrdU

Zeit [h]	Aberrationen /100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.	
34	2	4	4	1	0	0	11	10	100	7.9
38	9	4	1	0	0	0	14	13	100	4.7
42	8	3	2	1	0	0	14	13	100	4.6
46	1	5	1	4	1	1	13	11	100	4.6

4 Gy $\hat{=}$ 1×10^6 Teilchen/cm² ohne BrdU

Zeit [h]	Aberrationen /100 Metaphasen							Mitosen		MI [%]
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	aber.	unters.	
34	3	6	10	7	0	0	26	16	100	2.5
38	2	18	12	11	0	1	44	23	100	2.3
42	4	31	12	17	1	1	66	38	100	3.9
46	5	15	11	9	0	0	40	20	100	3.9

C.2 Gemittelte und integrierte Aberrationsraten

C.2.1 11 MeV/u Kohlenstoff (LET 153 keV/ μm)

Mittelwerte

Dosis [Gy]	Aberrationen /100 Metaphasen							% aber. Metaphasen
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	
0	4,4	9,8	1,2	5	0	0,4	20,5	16,5
0,5	6,5	39,3	26,4	32	1,4	2,1	107,9	59,9
1	6,5	57,9	40,3	52	4,6	1,7	164	74,5
1,5	24,4	73,2	81,1	98	10,5	3,2	290	89,6

Integrierte Daten

Dosis [Gy]	Aberrationen /100 bestr.Zellen							aberrante Zellen	verlorene Zellen	ungeschäd. Zellen
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ			
0	0,1	0,1	0	0	0	0	0,2	1,4	91	8
0,5	0,3	2	1	1	0	0	4	4	93	3
1	0,3	3	2	3	0,2	0,6	8,5	5	93	2
1,5	0,7	2	2	3	0,4	0,1	8,5	3	97	0,4

C.2.2 9,9 MeV/u Nickel (LET 2450 keV/ μm)

Mittelwerte

Dosis [Gy]	Aberrationen /100 Metaphasen							% aber. Metaphasen
	ctb	csb	ar	dic	r	cte	Σ	
0	5,2	4,5	0,3	2,5	0,2	0,2	14,5	13,3
2	6,3	13,3	5,0	13,3	0,6	0,1	40,1	29,3
4	5,7	27,5	12,8	16,8	1,3	0,8	66,8	40,3
8	6,9	35,9	11,6	25,1	2,1	0,7	98,6	43,4

Integrierte Daten

Dosis [Gy]	Aberrationen/ 100Zellen	aberrante Zellen	verlorene Zellen
0	0,35	2,4	82
2	1,15	2,9	90
4	1,41	2,2	93
8	0,9	1,2	97

C.3 Aberrations-Verteilungen

C.3.1 250 kV Röntgen

Kontrolle 0 Gy mit BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9		
40	81	17	1	1								100
44	80	19	1									100
52	77	22	1									100
56	85	15										100

3 Gy mit BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9		
40	24	39	18	13	3	2						90
44	29	32	22	15	1	1						100
52	16	41	29	9	4			1				100
56	20	39	21	13	4	1	1	1				100

0 Gy ohne BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9		
36	80	16	3		1							100
40	79	17	3	1								100
44	87	13										100
52	87	11	2									100
56	87	12		1								100

3 Gy ohne BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9		
40	25	33	25	11	5		1					100
44	31	24	28	11	5	1						100
52	22	37	23	14	4							100
56	21	29	35	8	6	1						100

C.3.2 11 MeV/u Kohlenstoff (LET 153 keV/ μm)

0 Gy mit BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]											unters. 1.Mitosen
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9		
38	83	16		1								100
46	78	17	3		2							100
54	82	14	4									50
58	85	15										20
62	82	18										50

0,5 Gy $\hat{=}$ 2×10^6 Teilchen/ cm^2 mit BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]											unters. 1.Mitosen
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9		
32	56	22	13	6	2						1	100
36	51	32	11	3	3							100
40	34	33	20	10	3							100
44	41	35	14	7	3							100
48	31	36	18	9	3	1	1	1				100
52	43	28	15	5	7	2						100
56	36	27	27	6	2	1	1					100
60	39	37	16	5	3							100
64	25	39	17	15		2	2					52
68	42	26	18	11			3					38

1 Gy $\hat{=}$ 4×10^6 Teilchen/cm² mit BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9	
28	40	29	11	5	9	4		2			55
32	46	28	11	8	5	2					100
36	35	26	25	6	2	6					100
40	23	26	26	11	7	6	1				100
44	22	20	29	20	3	5	1				100
48	22	24	23	24	3	2	1		1		100
52	26	27	20	15	10	1				1	100
56	15	33	22	13	10	6	1				100
60	22	25	26	17	7	3					100
64	24	34	19	15	4	4					47
68	18	27	27	24	6						34
72	23	33	27	6	6	4					48
76	35	28	14	14	5		5				43

1,5 Gy $\hat{=}$ 6×10^6 Teilchen/cm² mit BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9	
36	27	23	21	13	7		3	3	1	1	70
44	15	23	18	16	10	10	4	4			100
48	17	12	17	17	19	9	4	2	1	2	100
52	5	11	12	21	20	18	8	3	1	1	100
56	9	16	14	19	15	12	9	4	11		100
60	7	11	15	23	21	5	9	6	2	1	100
64	7	10	17	22	27	8	5	2	1	1	100
68	6	12	26	11	20	15	6	1	2		81
72	8	24	22	10	18	4	2	2			50
76	5	14	25	25	11	6	10	2		2	63
80	6	18	18	20	24	4	6	4			50
84	8	10	20	22	10	6	2				50
88	5	13	21	26	3	11	3	8	8		38

C.3.3 9,9 MeV/u Nickel (LET 2450 keV/ μm)

0 Gy mit BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9		
30	90	10										100
34	91	7	2									100
38	85	15										100
46	81	16	3									100
54	86	10	5									21

2 Gy $\hat{=}$ $0,5 \times 10^6$ Teilchen/ cm^2 mit BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9		
30	81	18	1									100
34	79	17	4									100
38	77	18	4	1								100
42	74	23	1	2								100
46	65	19	12	2	1		1					100
50	63	22	11	4								100
54	56	33	6	4	1							100

4 Gy $\hat{=}$ 1×10^6 Teilchen/ cm^2 mit BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9		
34	85	9	5	1								100
38	82	11	7									100
42	59	26	9	3	3							100
46	46	30	16	5	2	1						100
50	42	30	15	7	4	2						100
54	45	32	14	6	3							100

8 Gy $\hat{=}$ 2×10^6 Teilchen/cm² mit BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9	
32	79	16	5								100
36	80	13	5	2							100
40	67	24	5	3	1						100
44	55	12	19	9	4	1					100
48	41	21	20	14	2	1			1		100
52	44	23	15	9	4	3	1	1			100
56	31	31	21	8	6	2		2			65

0 Gy ohne BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9	
34	90	9	1								100
38	87	12	1								100
42	87	12	1								100
46	89	9	2								100

4 Gy $\hat{=}$ 1×10^6 Teilchen/cm² ohne BrdU

Zeit [h]	1. Mitosen mit n Aberrationen [%]										unters. 1.Mitosen
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9	
34	84	10	3	2	1						100
38	77	11	7	2	2	1					100
42	62	20	10	6	2						100
46	80	9	7	1	1	2					100

Literaturverzeichnis

M.Abend, A.Rhein, K.P.Gilbertz, W.F.Blakely und D.Van Beuningen 1995
Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death.
Int. J. Radiat. Biol. 67, 315-326

M.Abend, K.Kehe, M.Riedel und D.Van Beuningen 2000
Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death
can be improved by considering other modes of cell death.
Int. J. Radiat. Biol. 76, 249-259

J.Akudugu, J.Slabbert, A.Serafin und L.Bohm 2000
Frequency of radiation-induced micronuclei in neuronal cells does not correlate
with clonogenic survival.
Rad. Res. 153, 62-67 (Abstract)

B.Alberts, D.Bray, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts und J.Watson 1995
Molekularbiologie der Zelle.
3.Auflage L.Jaenicke (Hg.), VCH Verlagsgesellschaft mgH, Weinheim

R.Anderson, S.Marsden, E.Wright, M.Kadhim, D.Goodhead and C.Griffin 2000
Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a poten-
tial biomarker of exposure to high-LET α -particles.
Int. J. Radiat. Biol. 76, 31-42

W.Au, D.Walker, J.Ward jr., E.Whorton, M.Legator und V.Singh 1991
Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smo-
kers.
Mutat. Res. 260, 137-144

E.Azzam, S.deToledo, A.Waker und J.Little 2000
High and low fluences of α -particles induce a G_1 checkpoint in human diploid
fibroblasts.
Cancer Res. 60, 2623-2631

G.Barendsen, H.Walter, J.Fowler und D.Bewley 1963
Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture:

III Experiments with cyclotron-accelerated particles and deuterons.

Rad. Res. 18, 106-119

M.Bauchinger und E.Schmid 1998

LET dependence of yield ratios of radiation-induced intra- and interchromosomal aberrations in human lymphocytes.

Int. J. Radiat. Biol. 74, 17-25

K.Bayreuter, H.P.Rodemann, P.I.Franz und K.Maier 1988

Differentiation of fibroblast stem cells.

J. Cell Sci. Suppl. 10, 115-130

K.Bayreuter, H.P.Rodemann, R.Hommel, K.Dittman, M.Albiez und P.I.Franz 1988

Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage.

Proc. Metl. Acad. Sci. USA 85/14, 5112-5116

J.Bedford, J.Mitchell, H.Griggs und M.Bender 1978

Radiation-induced cellular reproductive death and chromosome aberrations.

Rad. Res. 76, 573-586

J.Bedford und M.Cornforth 1987

Relationship between the recovery from sublethal X-ray damage and the rejoining of chromosome breaks in normal human fibroblasts.

Rad. Res. 111, 406-423

J.Bedford 1991

Sublethal damage, potentially lethal damage and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiations.

Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 21, 1457-1469

O.Belyakov, K.Prise, K.Trott und B.Michael 1999

Delayed lethality, apoptosis and micronucleus formation in human fibroblasts irradiated with X-rays or α -particles.

Int. J. Radiat. Biol. 75, 985-993

M.Bender, A.Awa, A.Brooks, H.Evans, P.Groer, L.Littlefield, C.Pereira, R.Preston und B.Wachholz 1988

Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation.

Mutat. Res. 196, 103-159

E.Bernhard, A.Maity, R.Muschel und W.McKenna 1995

Effect of ionizing radiation on cell cycle progression.

Radiat. Environ. Biophys. 34, 79-83

M.Bissell et al. 1997

Modeling human risk: cell and molecular biology in context.

Report Number: LBNL-40278 1997

G.Bjursell und P.Reichard 1973

Effects of thymidine on deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid in Chinese hamster ovary cells.

J.Biol.Chem. 248, 3904-3909

E.A.Blakely, F.Ngo, P.Chang, L.Lommel, W.Kraft-Weyrather, G.Kraft und C.Tobias 1980a

Heavy-ion cell cycle response and progression effects.

In: Biological and medical research with accelerated heavy ions at the BEVALAC (Hg. M.Pirucello und C.Tobias) LBL-Report 11220 125-135.

E.A.Blakely, C.Tobias, F.Ngo und S.Curtis 1980b

Physical and cellular radiobiological properties of heavy ions in relation to cancer therapy applications.

In: Biological and medical research with accelerated heavy ions at the BEVALAC 1977-1980. Berkeley 73-86

E.A.Blakely 1992

Cell inactivation by heavy charged particles.

Radiat. Environ. Biophys. 31, 181-196

J.Boei, S.Vermeulen und A.Natarajan 1996

Detection of chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization in the first three postirradiation divisions of human lymphocytes.

Mutat. Res. 349, 127-135

S.Brandt 1992

Datenanalyse: Mit statistischen Methoden und Computerprogrammen.

3.Auflage, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim

W.Brock, E.Abozina, S.Lankford, S.Bergh und F.Geaa 1998

Human diploid fibroblasts undergo terminal differentiation / senescence with minimal cell loss in response to low doses of ionizing radiation.

6th International Meeting on Progress in Radio-Oncology, Salzburg, Österreich, 35-41

A.Burger, H.Löffler, M.Bamberg und H.Rodemann 1998

Molecular and cellular basis of radiation fibrosis.

Int. J. Radiat. Biol 73, 401-408

A.Carrano 1973

Chromosome aberrations and radiation-induced cell death:

I transmission and survival parameters of aberrations.

Mutat. Res. 17, 341-353

K.Chatwick und H.Leenhouts 1973

A molecular theory of cell survival.

Phys. Med. Biol. 18, 78-87

J.Chapman, E.Blakeley, K.Smith, R.Urtasun. J.Lyman und C.Tobias 1978

Radiation biophysical studies with mammalian cells and a modulated carbon ion beam.

Rad. Res. 74, 101-110

D.Charlton 1986

The range of high LET effects from ^{125}I decays.

Rad. Res. 107, 163-171

M.Collyn-d'Hooghe, D.Hemon, R.Gilet, S.Curtis, A.Valleron und E.Malaise 1981

Comparative effects of ^{60}Co γ -rays and neon and helium ions on cycle duration and division probability of EMT6 cells. A time-laps cinematography study.

Int. J. Radiat. Biol. 39, 297-306

M.Cornforth und J.Bedford 1983

X-ray-induced breakage and rejoining of human interphase chromosomes.

Science 222, 1141-1143

M.Cornforth und J.Bedford 1987

A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts.

Rad. Res. 111, 385-405

M.Cornforth und E.Goodwin 1991

Transmission of radiation-induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts.

Rad. Res. 126, 210-217

S.Curtis und J.Letaw 1989

Galactic cosmic rays and cell-hit frequencies outside the magnetosphere.

Adv. Space Res. 9, 293-298

J.Daniel 1976

Changes in type of collagen synthesized by chick fibroblasts in vitro in the presence of 5-Bromodeoxyuridine.

Cell Differentiation 5, 247-253

- B.J.Dean und N.Danford 1984
Assay for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells.
In: Mutagenity testing - a practical approach
S.Venitt und J.M.Parry (Hg.) IRL Press.
- J.Debus, M.Wannemacher, H.ZurHausen, H.Specht, F.Pobell et al. 1998
Proposal for a dedicated ion beam facility for cancer therapy.
GSI Darmstadt 1998
- J.Debus, T.Haberer, D.Schulz-Ertner, O.Jäckel, F.Wenz, W.Enghardt, W.Schlegel, G.Kraft und M.Wannemacher 2000
Carbon ion irradiation of skull base tumors at GSI. First clinical results and future perspectives.
Strahlenther. Onkol. 176, 211-216
- J.DeSimone, H.Dolezalova, J.Redpath und E.Stanbridge 2000
Prolonged cell cycle arrest in irradiated human diploid skin fibroblasts: the role of nutrient deprivation.
Rad. Res. 153, 131-143
- A.Di Leonardo, S.Linke, K.Clarkin und G.Wahl 1994
DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G_1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts.
Genes & Development 8, 2540-2551
- M.Dimitrijevic-Bussod, V.Balzaretti-Maggi und D.Gadbois 1999
Extracellular matrix and radiation G1 cell cycle arrest in human fibroblasts.
Cancer Res. 59, 4843-4847 (Abstract)
- M.Durante, K.George und T.Yang 1997
Biodosimetry of ionizing radiation by selective painting of prematurely condensed chromosomes in human lymphocytes.
Rad. Res. 148, S45-S50
- M.Durante, Y.Furusawa, K.George, G.Gialanella, O.Greco, G.Grossi, N.Matsufuji, M.Pugliese und T.Yang 1998
Rejoining and misrejoining of radiation induced chromatin breaks.
IV. Charged Particles.
Rad. Res. 149, 446-454
- A.Edwards 1997
The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry.
Rad. Res. 148, S39-S44

- W.Enghardt, B.Hasch, R.Hinz, K.Lauckner, J.Pawelke, M.Sobiella 1994
A Positron Emission Tomograph for the online control of heavy ion tumor therapy.
GSI Scientific Report 1994, GSI-95-1, 216
- L.Enns, R.Barley, M.Paterson und R.Mirzayans 1998
Radiosensitivity in Ataxia Telangiectasia fibroblasts is not associated with deregulated apoptosis.
Rad. Res. 150, 11-16
- H.Evans 1974
Effects of ionizing radiation on mammalian chromosomes.
In: J.German (Hg.). Chromosomes and Cancer. John Wiley & Sons, New York
- M.Fenech 1993
The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations.
Mutat. Res. 285, 35-44
- A.Fornance, H.Nagasawa und J.Little 1980
Relationship of DNA repair to chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and survival during liquid-holding recovery in X-irradiated mammalian cells.
Mutat. Res. 70, 323-336
- C.Fournier, W.Kraft-Weyrather und G.Kraft 1997
Survival, differentiation and collagen secretion of human fibroblasts after irradiation with carbon ions and X-rays.
Physica Medica XIV, Suppl.1, 44-47
- C.Fournier 1999
Zelluläre und molekularbiologische Grundlagen der Fibrose nach Ionenbestrahlung.
Dissertation TU Darmstadt, GSI - Diss 99-14
- C.Fournier, M.Scholz, W.Weyrather, H.Rodemann und G.Kraft 2001
Changes of fibrosis-related parameters after high- and low-LET irradiation of fibroblasts.
Int. J. Radiat. Biol. 77, 713-722
- H.Fricke, E.J.Hart 1966
Radiation Dosimetry, Bd. 2
Academic Press, New York
- K.Füssel 1997
Chromosomenaberrationen in humanen Fibroblasten nach Bestrahlung mit

hochenergetischen Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung.
Dissertation TH Darmstadt.

C.Geard 1985

Charged particle cytogenetics: effects of LET, fluence and particle separation on chromosome aberrations.
Rad. Res. 104, S112-S121

C.Geard und C.Chen 1990

Micronuclei and clonogenicity following low- and high-dose-rate γ irradiation of normal human fibroblasts.
Rad. Res. 124, S56-S61

K.George, H.Wu, V.Willingham, Y.Furusawa, T.Kawata und F.Cucinotta 2001
High- and low-LET induced chromosome damage in human lymphocytes: a time-course of aberrations in metaphase and interphase.
Int. J. Radiat. Biol. 77, 175-183

C.Gerthsen und H.Vogel 1993

Physik, Ein Lehrbuch zum Gebrauch neben Vorlesungen.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

C.Gillespie, J.Chapman, A.Reuvers und D.Dugle 1975

The inactivation of Chinese hamster cells by X-rays: synchronized and exponential cell populations
Rad. Res. 64, 353-364

H.Goda, T.Sakai, M.Kurosumi und K.Inoue 1998

Prolactin-producing cells differentiate from G₀/G₁-arrested somatotrophs in vitro: an analysis of cell cycle phases and mammotroph differentiation.
Endocr. J. 45, 725-735

S.Goldstein 1990

Replicative Senescence: the human fibroblast comes of age.
Science 249, 1129-1133

D.Goodhead 1989

The initial physical damage produced by ionizing radiations.
Int. J. Radiat. Biol. 56, 623-634

E.Goodwin, E.Blakely, C.Tobias 1994

Chromosomal damage and repair in G₁-phase Chinese hamster ovary cells exposed to charged-particle beams.
Rad. Res. 138, 343-351

- C.Griffin, S.Marsden, D.Stevens, P.Simpson und J.Savage 1995
Frequencies of complex chromosome exchange aberrations induced by ^{238}Pu α -particles and detected by fluorescence in situ hybridization using single chromosome-specific probes.
Int. J. Radiat. Biol. 67, 431-439
- T.Grösser 1998
Untersuchung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung.
Diplomarbeit TU Darmstadt
- S.Grote, G.Joshi, S.Revell und C.Shaw 1981
Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability.
Int. J. Radiat. Biol. 39, 395-408
- G.Z.Guo, K.Sasai, N.Oya, T.Takagi, K.Shibuya, M.Hiraoka 1998
Simultaneous evaluation of radiation-induced apoptosis and micronuclei in five cell lines.
Int. J. Radiat. Biol. 73, 297-302
- N.Gupta, R.Vij, D.Haas-Kogan, M.Israel, D.Deen und W.Morgan 1996
Cytogenetic damage and the radiation-induced G_1 -phase checkpoint.
Rad. Res. 145, 289-298
- T.Haberer, W.Becher, D.Schardt, G.Kraft 1993
Magnetic scanning system for heavy ion therapy.
Nucl. Instr. Methods A330, 296-305.
- T.Haberer, J.Debus, H.Eickhoff, W.Enghardt, P.Heeg, G.Kraft und D.Schardt 2001
Heavy-ion therapy at GSI: Progress report.
GSI Scientific Report 2000, GSI-2001-1, 164-165
- E.J.Hall (Hg.) 1994
Radiobiology for the radiologist.
4.Auflage, J.B. Lippincott Company, Philadelphia
- W.Halle 1976
Zell- und Gewebezüchtung bei Tieren: Bausteine der modernen Physiologie 3.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- L.Hartwell und M.Lastan 1994
Cell cycle control and cancer.
Science 266, 1821-1828

- L.Hayflick und P.Moorhead 1961
The serial cultivation of human diploid strains.
Exp. Cell Res. 25, 585-621
- J.Heilmann, G.Taucher-Scholz, T.Haberer, M.Scholz, G.Kraft 1996
Measurement of intracellular DNA double-strand break induction and rejoining
along the track of carbon and neon particle beams in water.
Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 34, 599-608
- W.Heinrich, B.Wiegel, G.Kraft 1991
 $\beta, Z_{eff.}, dE/dx$, range and restricted energy loss of heavy ions in the region
 $1 \leq E \leq 1000$ MeV/u.
Techn Ber., GSI Preprint 1991, GSI 91-30
- E.Höglund, E.Blomquist, J.Carlsson und B.Stenerlöw 2000
DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial
fragmentation.
Int. J. Radiat. Biol. 76, 539-547
- T.Ikushima und S.Wolff 1974
Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodesoxyuridine-
and 5-iododeoxyuridine- substituted Chinese hamster chromosomes.
Exp. Cell Res. 87, 15-19
- G.Iliakis 1981
Charakterisation und properties of repair of potentially lethal damage as measu-
red with the help of β -Arabinofuranosyladenine in plateau-phase EAT cells.
Rad. Res. 86, 77-90
- G.Iliakis, S.Kurtzman, G.Pantelias und R.Okayasu 1989
Mechanism of radiosensitization by halogenated Pyrimidines: effect of BrdU on
radiation induction of DNA and chromosome damage and its correlation with
cell killing.
Rad. Res. 119, 286-304
- K.Jentsch 1983
Regulation des Wachstums und der Zellvermehrung, Wissensstand und Proble-
me.
Akademie-Verlag, Berlin
- J.Kiefer 1989
Biologische Strahlenwirkung.
2.Auflage, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin
- J.Kiefer 1992
Heavy ion effects on cells: chromosomal aberrations, mutations and neoplastic

transformations.

Radiat. Environ. Biophys. 31, 279-288

F.Kirchner 1996

Anwendungen der flukzytometrischen Auswertung des BrdU-Hoechst-Quenching-Effektes zur Untersuchung schwerioneninduzierter Proliferationsstörungen von Säugetierzellen.

Diplomarbeit Universität Gh Kassel

J.Kolin-Gerresheim und M.Bauchinger 1981

Dependence of the Frequency of harlequin-stained cells on BrdU concentration in human lymphocyte cultures.

Mutat. Res. 91, 251-254

G.Kraft, H.W.Daues, B.Fischer, U.Kopf, H.P.Leibold, D.Quis, H.Stelzer, J.Kiefer, R.Schöpfer, E.Schneider, U.Weber, H.Wulf, H.Dertinger 1980

Irradiation chamber and sample changer for biological samples.

Nucl. Instr. Methods 168, 175-179

G.Kraft 1987

Radiobiological effects of very heavy ions: inactivation, induction of chromosome aberrations and strand breaks.

Nucl. Sci. Appl. 3, 1-28

G.Kraft 1990

The radiobiological and physical basis for radiotherapy with protons and heavier ions.

Strahlenther. Oncol. 166, 10-13

G.Kraft, M.Krämer und M.Scholz 1992

LET, trackstructure and models.

Radat. Environ. Biophys. 31, 161-180

G.Kraft und M.Krämer 1993

Linear energy transfer and track structure.

Adv. Rad. Biol. 17, 1-51

G.Kraft, W.Kraft-Weyrather, G.Taucher-Scholz und M.Scholz 1997

What kind of radiobiology should be done at a hadrontherapy centre?

In: U.Amaldi, B.Larsson und Y.Lemoigne (Hg.). Advances in Hadrontherapy. Elsevier, Amsterdam

G.Kraft 1999

RBE and its interpretation

Strahlentherapie und Onkologie 175 Suppl. II 44-47

W.Kraft-Weyrather, G.Kraft, H.Penninger, S.Ritter, M.Scholz und S.Thiel 1989
Radiosensitivity of synchronized cells exposed to heavy-ion beams at low energy.
GSI Scientific Report 1988, GSI-89-1, 230

W.Kraft-Weyrather, T.Haberer und G.Kraft 1992
First survival curves irradiated with the magnetic scanning system at SIS.
GSI Scientific Report 1991, GSI-92-1, 301

M.Krämer und G.Kraft 1992
Heavy ion track structure calculations.
In: K.Chadwick, G.Moschini und M.Varma (Hg.) Biophysical modelling of radiation effects. Verlag Adam Hilger, Bristol, Philadelphia, New York

M.Krämer und G.Kraft 1994
Track structure and DNA damage.
Adv. Space Res. 14, 151-159

M.Krämer und G.Kraft 2000
Treatment planning for heavy-ion radiotherapy: Calculation and optimization of biologically effective dose.
Phys. Med. Biol. 45, 3319-3330

S.Latt 1973
Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3395-3399

J.Little 1994
Changing views of cellular radiosensitivity.
Rad. Res. 140, 299-311

D.Lloyd, G.Dolphin, R.Purrott und P.Tipper 1977
The effect of X-ray induced mitotic delay on chromosome aberration yields in human lymphocytes.
Mutat. Res. 42, 401-412

M.Löbrich, P.Cooper und B.Rydberg 1998
Joining of correct and incorrect DNA ends at double-strand breaks produced by high-linear energy transfer radiation in human fibroblasts.
Rad. Res. 150, 619-626

C.Lücke-Huhle, E.Blakely, P.Chang und C.Tobias 1979
Drastic G_2 arrest in mammalian cells after irradiation with heavy-ion beams.
Rad. Res. 79, 97-112

C.Lücke-Huhle 1980

Efficient G2-delay after very low doses (0.03-1 Gy) of alpha particles.
Radiat. Environ. Biophys. 17, 365 (Abstract)

C.Lücke-Huhle 1982

Alpha-irradiation-induced G2 delay: a period of cell recovery.
Rad. Res. 89, 298-308

C.Lücke-Huhle, W.Comper, L.Hieber und M.Pech 1982

Comparative study of G2 delay and survival after ²⁴¹Americium- α and ⁶⁰Cobalt- γ irradiation.
Radiat. Environ. Biophys. 20, 171-185

M.R.Malamed, P.F.Mullaney und M.L.Mendelsohn (Hg.) 1979

Flow cytometry and sorting.
John Wiley & Sons, New York

M.Meuth und H.Green 1974

Induction of a deoxycytidineless state in cultured mammalian cells by bromodeoxyuridine.
Cell 2, 109-112

E.Michishita, K.Nakabayashi, T.Suzuki, S.C.Kaul, H.Ogino, M.Fujii, Y.Mitsui und D.Ayusawa 1999

5-Bromodeoxyuridine induces senescence-like phenomena in mammalian cells regardless of cell type or species.
J. Biochem. 126, 1052-1059

E.Moore und R.Hurlbert 1966

Regulation of mammalian deoxyribonucleotide biosynthesis by nucleotids as activators and inhibitors.
J. Biol. Chem. 241, 4802-4809

S.Morris 1991

The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells.
Mutat. Res. 258, 161-188

T.Munro 1970

The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of the Chinese hamster fibroblast.
Rad. Res. 42, 451-470

U.Nachtrab, U.Oppitz, M.Flentje und H.Stopper 1998

Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy.
Int. J. Radiat. Biol. 73, 279-287

H.Nagasawa, A.Fornance jr., M.Ritter und J.Little 1982
Relationship of enhanced survival during confluent holding recovery in ultraviolet-irradiated human and mouse cells to chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and DNA repair.
Rad. Res. 92, 483-496

H.Nagasawa, S.Latt, M.Lalande und J.Little 1985
Effects of X-irradiation on cell-cycle progression, induction of chromosomal aberrations and cell killing in Ataxia Telangiectasia (AT) fibroblasts.
Mutat. Res. 148, 71-82

H.Nagasawa und J.Little 1988
Radiosensitivities of ten apparently normal human diploid fibroblast strains to cell killing, G_2 -phase chromosomal aberrations and cell cycle delay.
Cancer Res. 48, 4535-4538

E.Nasonova, S.Ritter, T.Fomenkova und G.Kraft 1998
Induction of chromosomal damage in CHO-K1 cells and their repair-deficient mutant XRS5 by X-ray and particle irradiation.
Adv. Space Res. 22, 569-578

E.Nasonova, E.Gudowska-Nowak, S.Ritter und G.Kraft 1998
Analysis of Ar-ion and X-ray-induced chromatin breakage and repair in V79 plateau-phase cells by the premature chromosome condensation technique.
Int. J. Radiat. Biol. 77, 59-70

H.Nikjoo, S.Uehara, W.Wilson, M.Hoshi und D.Goodhaed 1998
Track structure in radiation biology: theory and applications.
Int. J. Radiat. Biol. 73, 355-364

L.C.Northcliff und R.F.Schilling 1970
Range and stopping-power tables for heavy ions.
Nucl. Data Tables 7, 309

M.O'Driscoll, D.Scott, C.Orton, A.Kiltie, S.Davidson, R.Hunter und C.West 1998
Radiation-induced micronuclei in human fibroblasts in relation to clonogenic radiosensitivity.
Br. J. Cancer 78, 1559-1563 (Abstract)

T.Pandita und R.Geard 1996
Chromosome aberrations in human fibroblasts induced by monoenergetic neutrons. I. Relative biological effectiveness.
Rad. Res. 145, 730-739

- P.Perry und S.Wolff 1974
New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids.
Nature 251, 156-158
- T.Puck und O.Marcus 1955
A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors.
Proc. Natl. Acad. Sci. 41, 432-437
- M.Ritter, J.Cleaver und C.Tobias 1977
High-LET radiations induce a large proportion of non-rejoining DNA breaks.
Nature 266, 653-655
- S.Ritter, W.Kraft-Weyrather, M.Scholz und G.Kraft 1990
Influence of radiation quality on heavy ion induced chromosome aberrations in V79 cells.
Radiat. Prot. Dosimetry 31, 257-260
- S.Ritter, W.Kraft-Weyrather, M.Scholz und G.Kraft 1992
Induction of chromosome aberrations in mammalian cells after heavy ion exposure.
Adv. Space Res. 12, 119-125
- S.Ritter, E.Nasonova, M.Scholz, W.Kraft-Weyrather und G.Kraft 1996
Comparison of chromosomal damage induced by X-Rays and Ar ions with an LET of 1840keV/ μm in G_1 V79 cells.
Int. J. Radiat. Biol. 69, 155-166
- S.Ritter, E.Nasonova, E.Gudowska-Nowak, M.Scholz und G.Kraft 2000
High-LET-induced chromosome aberrations in V79 cells analysed in first and second post-irradiation metaphases.
Int. J. Radiat. Biol. 76, 149-161
- S.Ritter, S.Berger, T.Größer, P.Hessel, G.Kraft, E.Nasonova, K.Ando und E.Gudowska-Nowak 2001
Quantification of high LET induced chromosome aberrations.
GSI Scientific Report 2000, GSI-2001-1, 154
- H.Rodemann, K.Bayreuther, P.Franz, K.Dittmann und M.Albiez 1989
Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblast cell types in vitro.
Exp. Cell Res. 180, 84-93

- H.Rodemann, H.Peterson, K.Schwenke und K.von Wangenheim 1991
Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by irradiation.
Scanning Microscopy 5, 1135-1143
- V.Rudat, A.Dietz, Ch.Conradt, K.-J.Weber und M.Flentje 1997
In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with
acute radiation toxicity in patients with head and neck cancer.
Radiother. Oncol. 43, 181-188
- N.Rudd, D.Hoar, C.Greentree, L.Dimnik und U.Hennig 1988
Micronucleus assay in human fibroblasts: A measure of spontaneous chromosomal
instability and mutagen hypersensitivity.
Environmental and Molecular Mutagenesis 12, 3-13
- W.Rutter, R.Pictet und P.Morris 1973
Toward molecular mechanisms of developmental processes.
Ann. Rev. Biochem. 42, 601-646
- H.Rutz und J.Little 1989
Age-dependent modification by lactate of repair of potentially lethal damage in
normal human diploid fibroblasts.
Rad. Res. 118, 525-531
- R.Sager 1989
Tumor suppressor gens: the puzzle and the promise.
Science 246, 1406-1412
- K.Sasai, J.Evans, M.Kovacs und J.Brown 1994
Prediction of human cell radiosensitivity: comparison of clonogenic assay with
chromosome aberrations scored using premature chromosome condensation with
fluorescence in situ hybridisation.
Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 30, 1127-1132
- M.Sasaki und A.Norman, 1967
Selection against chromosome aberrations in human lymphocytes.
Nature 214, 202-203
- J.Savage 1975
Classification and relationship of induced chromosomal structural changes.
J. Med. Genet. 12, 103-122
- J.Savage 1988
A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromo-
somal aberrations.
Mutat. Res. 207, 33-36

- J.Savage 1989
Acentric chromosomal fragments and micronuclei: the time-displacement factor.
Mutat. Res. 225, 171-173
- L.Skarsgard, B.Kihlman, L.Parker, C.Pujara und S.Richardson 1967
Survival, chromosome abnormalities and recovery in heavy-ion- and X-irradiated mammalian cells.
Rad. Res. Suppl. 7, 208-221
- H.Schelin, L.Heilbronn, F.Deak, Z.Seres, J.Kasagi und T.Murakami 1993
Neutron production in heavy-ion reactions at 35 and 50 MeV/u.
Nucl. Sci. Eng. 113, 184-188
- W.Schimmerling 1992
Radiobiological problems in space: an overview.
Radiat. Environ. Biophys 31, 197-203
- M.Scholz, W.Kraft-Wayrather, S.Ritter und G.Kraft 1989
Cell cycle delays induced by heavy ion irradiation of synchronous mammalian cells.
Adv. Space Res. 9, 91-96
- M.Scholz 1992
Zellzyklusverzögerungen synchroner Zellpopulationen nach Schwerionenbestrahlung.
Dissertation Uni Heidelberg, GSI - Diss 92-28
- M.Scholz und G.Kraft 1992
A parameter-free track structure model for heavy ion action cross sections.
In: K.Chadwick, G.Moschini, M.Varma (Hg.) *Biophysical modelling of radiation effects*. Verlag Adam Hilger, Bristol, Philadelphia, New York
- M.Scholz, W.Kraft-Wayrather, S.Ritter und G.Kraft 1994
Cell cycle delays induced by heavy ion irradiation of synchronous mammalian cells.
Int. J. Radiat. Biol. 66, 59-75
- M.Scholz und G.Kraft 1994
Calculation of heavy ion inactivation probabilities based on track structure, X-ray sensitivity and target size.
Radiat. Prot. Dosimetry 52, 29-33
- M.Scholz, S.Ritter und G.Kraft 1998
Analysis of chromosome damage based on the time course of aberrations.
Int. J. Radiat. Biol. 74, 325-331

D.Scott und C.Y.Lyons 1979

Homogeneous sensitivity of peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage.

Nature 278, 756-758

A.Sgura, A.Antoccia, R.Cherubini, M.Vecchia, P.Tiveron, F.Degrassi und C.Tanzarella 2000

Micronuclei, CREST-positive micronuclei and cell inactivation induced in Chinese hamster cells by radiation with different quality.

Int. J. Radiat. Biol. 76, 367-374 Abstract

J.Sisterson 2001

Particles: a newsletter for those interested in proton, light ion and heavy charged particle radiotherapy.

<http://neurosurgery.mgh.harvard.edu/hcl/ptles.htm>

S.Smellie und P.Parson 1979

Effects of Thymidine analogues on murine and human cells.

AJEBAK 59, 563-573

T.Sugiyama, K.Goto und Y.Kano 1976

Mechanism of differential Giemsa method for sister chromatids.

Nature 259, 59-60

K.Suzuki, I.Mori, Y.Nakayama, M.Miyakoda, S.Kodama und M.Watanabe 2001
Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening.

Rad. Res. 155, 248-253

M.Suzuki, Y.Kase, H.Yamaguchi, T.Kanai und K.Ando 2000

Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams.

Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 48, 241-250

M.Suzuki, C.Piao, E.Hall und T.Hei 2001

Cell killing and chromatid damage in primary human bronchial epithelial cells irradiated with accelerated ^{56}Fe ions.

Rad. Res. 155, 432-439

I.Testard und L.Sabatier 1999

Biological dosimetry for astronauts: a real challenge.

Mutat. Res. 430, 315-326

L.Thompson, R.Baker, A.Carrano und K.Brookman 1980

Failure of phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate to enhance sister

chromatid exchange, mitotic segregation or expression of mutations in Chinese hamster cells.

Cancer Res. 40, 3245-3251

P.Todd 1967

Heavy-ion irradiation of cultured human cells.

Rad. Res. Suppl. 7, 196-207

P.Todd 1975

Heavy-ion irradiation of human and Chinese hamster cells in vitro.

Rad. Res. 61, 288-297

E.Wandl, K.ono, R.Kain, T.Herbsthofer, G.Hienert und K.Höbarth.

Linear correlation between surviving fraction and the micronucleus frequency.

Int. J. Radiat. Biol. 56, 771-775

J.Ward 1985

Biochemistry of DNA lesions.

Rad. Res. 104, S103-S111

W.Weyrather, S.Ritter, M.Scholz und G.Kraft 1999

RBE for a carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity.

Int. J. Radiat. Biol. 75, 1357-1364

K.Williams, J.Boyle, J.Birch, J.Norton und D.Scott 1997

Cell cycle arrest defect in Li-Fraumeni syndrome: a mechanism of cancer predisposition?

Oncogene 14, 277-282

J.Wilson, L.Townsend, W.Schimmerling, G.Khandelwal, F.Khan, J. Mealy, F.Cucinotta und J.Norbury 1991

Transport methods and interactions for space radiations.

In: NASA Reference Publication Nr.1257. National Aeronautics and Space Administrations, Washington, D.C.

S.Wolff 1991

Biological dosimetry with cytogenetic endpoints.

Prog. Clin. Biol. Res. 372, 351-362

H.Wu, M.Durante, K.George und T.Yang 1997

Induction of chromosome aberrations in human cells by charged particles.

Rad. Res. 148, S102-S107

H.Wulf, W.Kraft-Weyrather, H.Miltenburger, E.Blakety, C.Tobias und G.Kraft 1985

Heavy-ion effects on mammalian cells: inactivation measurements with different cell lines.

Rad. Res. 104, S122-S134

T.Yang, K.George, A.Johnson, M.Durante und B.Fedorenko 1997

Biodosimetry results from space flight Mir-18.

Rad. Res. 148, S17-S23

M.Zaider 1996

The combined effects of sublethal damage repair, cellular repopulation and redistribution in the mitotic cycle. II. the dependency of radiosensitivity parameters α , β and t_0 on biological age for Chinese hamster V79 cells.

Rad. Res. 145, 467-473

F.Zölzer und C.Streffer 2001

G_2 -Phase delays after irradiation and/or heat treatment as assessed by two-parameter flow cytometry.

Rad. Res. 155, 50-56

Publikationen

St.Berger, S.Ritter, E.Nasonova und G.Kraft 2000
Zellzykluseffekte und ihr Einfluß auf die Berechnung der RBW
aus Chromosomendaten.
Proceedings der 4. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische
Strahlenforschung ISBN 3-00-00-6800-7

S.Ritter, S.Berger, T.Größer, P.Hessel, G.Kraft, E.Nasonova,
K.Ando und E.Gudowska-Nowak 2000
Quantification of high LET induced chromosome aberrations.
GSI Scientific Report 2000 GSI-2001-1 ISSN 0174-0814, S.154

St.Berger, T.Größer, S.Ritter, E.Nasonova und G.Kraft 2000
Influence of cell cycle effects on the calculation of RBEs from
chromosomeaberration data.
7th Workshop on heavy charged particles in biology and medicine,
28. - 30. September 2000, Darmstadt
GSI Report 2000 - 04

S.Ritter, S.Berger, T.Größer, P.Hessel, E.Nasonova,
E.Gudowska-Nowak und G.Kraft 1999
Biological effects of heavy ion exposure to human skin fibroblasts
and their LET dependence.
GSI Scientific Report 1999 GSI-2000-1 ISSN 0174-0814, S.154

S.Ritter, S.Berger, T.Größer, E.Gudowska-Nowak,
P.Hessel, E.Kehr, E.Nasonova und G.Kraft 1998
High LET induced chromosomal damage in human fibroblasts.
GSI Scientific Report 1998 GSI-99-1 ISSN 0174-0814, S.134