

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie
Leitung Prof. Dr. E. Dikomey

Bedeutung letaler Chromosomenaberrationen für die Strahlenempfindlichkeit von normalen humanen Fibroblasten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Mirko Dede
aus Salzkotten

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 15.01.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der/die Vorsitzende: Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. J. Dahm-Daphi

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J. Lorenzen

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	5
1.1. Das Mammakarzinom.....	5
1.2. Therapie des Mammakarzinoms.....	6
1.3. Nebenwirkungen der Strahlentherapie.....	9
1.4. Quantifizierung der akuten und späten Nebenwirkungen.....	10
1.5. Voraussage akuter und später Nebenwirkungen.....	11
1.6. Variation der Normalgewebereaktion.....	11
1.7. Genetische Faktoren der Normalgewebereaktion.....	12
1.8. Chromosomenaberrationen als Indikator der Strahlenempfindlichkeit.....	13
1.9. Zelluläre Inaktivierung in humanen Fibroblasten.....	16
1.10. Fragestellung und Zielsetzung.....	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. Generelle Beschreibung der Patientinnen.....	19
2.2. Bestrahlung.....	20
2.3. Metaphasen-Technik.....	20
2.3.1. Synchronisation der Zellen in der G ₀ -Phase.....	20
2.3.2. Akkumulation der Zellen in der Metaphase.....	20
2.3.3. Herstellung von Chromosomenpräparaten.....	21
2.3.4. Auswertung und Klassifizierung der Chromosomenaberrationen.....	22
2.4. Koloniebildungstest.....	23
2.5. Konstantfeld-Gelelektrophorese.....	24
2.6. Auswertung und Statistik.....	24
2.7. Materialien, Nährmedien, Puffer und Lösungen.....	24
3. ERGEBNISSE	26
3.1. Nachweis strahleninduzierter Chromosomenaberrationen.....	26
3.1.1. Häufigkeitsverteilung der Chromosomenfragmente nach Bestrahlung.....	27
3.1.2. Strahleninduzierte Chromosomenaberrationen.....	30
3.1.3. Intraindividuelle Variation der Chromosomenaberrationen.....	31
3.1.4. Einfluss des Plattierens auf die Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen.....	32
3.2. Interindividuelle Variation der letalen Chromosomenaberrationen.....	34
3.3. Letale Chromosomenaberrationen und residuelle DNA-Doppelstrangbrüche.....	38
3.4. Beziehung zwischen letalen Chromosomenaberrationen und Zelinaktivierung.....	40
3.5. Bedeutung des Tumorsuppressorproteins TP53.....	41

4. DISKUSSION	45
4.1. Methodische Vorarbeiten	45
4.1.1. <i>Letale Chromosomenaberrationen.....</i>	<i>46</i>
4.1.2. <i>Inter- und Intravariabilität</i>	<i>47</i>
4.1.3. <i>Bedeutung des Plattierens auf letale Chromosomenaberrationen</i>	<i>48</i>
4.2. Letale Chromosomenaberrationen und residuelle DNA-Doppelstrangbrüche	49
4.3. Letale Chromosomenaberrationen und Zellinaktivierung in Fibroblastenlinien....	50
4.4. Bedeutung der terminalen Differenzierung	51
5. ZUSAMMENFASSUNG	53
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	55
7. LEBENSLAUF.....	62
8. DANKSAGUNG.....	63

1. EINLEITUNG

Die kurative Behandlung maligner Tumoren erfolgt durch Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie. Die Strahlentherapie stellt dabei neben der Chirurgie die wichtigste Behandlungsform dar. Eine Strahlentherapie wird in den meisten Fällen durchgeführt, um nach einem chirurgischen Eingriff das Risiko eines Rezidivs deutlich zu verringern. So kommt sie aber auch zur Anwendung, wenn die Tumoren chirurgisch nicht zu entfernen sind, auf eine chemotherapeutische Behandlung nicht ausreichend ansprechen oder die Erhaltung des betroffenen Organs gewünscht ist. Bei einer kurativen Strahlentherapie ist die vollständige Vernichtung des Tumorgewebes (lokale Tumorkontrolle) das Ziel der Therapie. Die hierfür benötigte Dosis hängt von einer Vielzahl von Parametern ab, wovon die wichtigsten die Tumorentität und das Volumen sind. Bei vielen dieser Tumorentitäten konnten beachtliche Heilungserfolge erzielt werden. Dies gilt insbesondere für Mamma- und Kopf-Hals-Tumoren sowie Prostata- und Zervixkarzinome als häufigste Entitäten.

1.1. Das Mammakarzinom

Jede neunte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Dabei ist das Mammakarzinom mit einem Anteil von 25% bei Frauen die häufigste Krebserkrankung. Die Inzidenz der Neuerkrankungen liegt in Deutschland bei 42.000 pro Jahr. Die Zahl der Todesfälle beträgt 17.000 pro Jahr. Dabei erhöht sich das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, mit zunehmendem Alter und zeigt einen Gipfel im fünften bis siebten Lebensjahrzehnt der Frau mit einem mittleren Erkrankungsalter von 63.5 Jahren. Der Anteil der erkrankten Frauen unter 40 Jahren scheint kontinuierlich zuzunehmen und beträgt derzeit etwa 35% (Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998). Häufig fehlen beim Mammakarzinom leicht erkennbare Symptome. Erst wenn der Tumor eine Mindestgröße von einem Zentimeter hat, kann er von der Patientin selbst getastet werden. Allerdings sind 40% aller Tumoren nicht palpabel und werden nur in der Mammografie entdeckt. Fortgeschrittene Tumoren können mit Retraktion von Haut und Mamille, Blutung, Schmerz oder entzündlich-ödematöser Veränderung der Brust einhergehen.

Als Präkanzerose gilt das *Carcinoma lobulare in situ (CLIS)*. Das *duktale Carcinoma in situ (DCIS)* ist demgegenüber schon als eine kurz vor der Invasion stehende Veränderung der Mamma anzusehen. Die invasiven Karzinome werden in duktales (80%) und lobuläres (10%) sowie muzinöses, medulläres und Paget-Karzinome unterteilt. In 95% der Fälle handelt es sich um infiltrierende Adenokarzinome, die verbleibenden 5% teilen sich in nicht-

infiltrierende duktale oder lobuläre Karzinome. Am häufigsten ist der Tumor im oberen äußeren Quadranten der Brust lokalisiert (40–50%), weniger häufig im zentralen Bereich inklusive der Mamille (25–30%), im oberen inneren (15%), im unteren äußeren (10%) und am seltensten im unteren inneren (5%) Quadranten. Die Ursache der unterschiedlichen Häufigkeiten ist auf die Verteilung des Brustdrüsengewebes zurückzuführen (Kreienberg *et al.* 2002).

Der Tumor wächst zunächst intraduktal, später in das extraduktale Drüsengewebe sowie in Lymph- und Blutgefäße. Sind die kutanen Lymphgefäße infiltriert, kommt es zu einem Hautödem, das in seiner ausgeprägten Form als sogenanntes Orangenhautphänomen (*peau d'orange*) beschrieben wird. In fortgeschrittenen Stadien kann es dazu kommen, dass die Haut tumorbedingt ulzeriert oder sich panzerförmig verhärtet (*cancer en cuirasse*) und die Thoraxwand infiltriert wird.

Mammakarzinome können sowohl solitär als auch multilokulär vorkommen. Die Prognose des Mammakarzinoms ist unberechenbar, was einerseits mit der irregulären Metastasierung und andererseits mit dem biologisch atypischen Verhalten des Mammakarzinoms zusammenhängt. Im Kollektiv der unbehandelten Fälle erreichen nur 15% der Patientinnen die 5-Jahres-Überlebensgrenze (Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998). Je nach histologischem Typ, Größe des Primärtumors und Lymphknotenbefall muss man in 13–70% der Fälle mit weiteren Tumorherden rechnen, da das Mammakarzinom sehr früh auf kanalikulärem, lymphogenem sowie hämatogenem Wege metastasiert. Die lymphogene Metastasierung geht dabei der hämatogenen voraus. Die Metastasierung erfolgt am häufigsten in das Knochensystem, gefolgt von Lunge, Pleura, Leber und lokoregionalen Bereichen. Es gibt eine Reihe prognostischer Kriterien bzw. Risikomerkmale wie die Größe des Primärtumors, seine histologischen Merkmale, eventuelle Multizentrität, Steroidrezeptoren,

Axillarmetastasen, Fernmetastasierung und Alter der Patientin (Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998). In vielen Fällen stirbt die Mammakarzinom-Patientin an ihrer generalisierten Metastasierung, die dann bereits zum Zeitpunkt der Primärtherapie vorgegeben ist.

1.2. Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms kombiniert Operation, Strahlentherapie und Chemo- bzw. Immuntherapie. Dabei ist die Operation in den meisten Fällen die erste wichtigste therapeutische Maßnahme. Die Ausdehnung der Operation ist abhängig von der Tumorgöße und dem Verhältnis von Tumor zur Restbrust. Entsprechend unterschiedlich sind

die Operationstechniken. Die axilläre Lymphadenektomie ist vor allem eine Einstufungsmaßnahme (*Staging*), da sie prognostische Aussagen ermöglicht. Wichtig für das therapeutische Konzept zur Behandlung des Mammakarzinoms ist die Tatsache, dass das Schicksal der Patientin weniger vom lokalen Geschehen als von der zum Zeitpunkt der Erstbehandlung schon vorhandenen Streuung bestimmt wird. Es handelt sich demnach sowohl um eine lokoregionäre als auch um eine disseminierte Erkrankung. Daher ist eine Kombination aus lokalen und systemischen Therapiemaßnahmen zum Erreichen einer Tumorheilung notwendig. Nur bei noch nicht invasivem *DCIS* oder *CLIS* mit einer Größe unter 2.5 cm, einem sicheren solitären Befund und ohne befallene Lymphknoten wird ausschließlich die organerhaltende *Lumpektomie* eingesetzt. Bei ausgedehnteren Befunden und vor allem bei Verdacht auf Multizentrität oder Bilateralität kann jedoch eine Nachbestrahlung oder eine *Ablatio* nötig werden. Bei den Tumoren mit einem geringen Risiko (*low risk*), d. h. bei einer Tumorgöße unter 2.5 cm, negativem axillären Lymphknotenbefund ohne Multizentrität und ohne histologische Hochrisiko-Faktoren wird ebenfalls eine Lumpektomie durchgeführt und die Therapie durch axilläre Lymphonodektomie und Nachbestrahlung der belassenen Brust ergänzt. Dies soll verhindern, dass eventuell doch vorhandene multizentrische, okkulte Herde Bedeutung gewinnen. Unterbleibt die Nachbestrahlung, ist mit einer fünf- bis sechsfach erhöhten Lokalrezidivquote zu rechnen. Bei Tumoren mit einem hohen Risiko (*high risk*) wird die modifiziert-radikale Mastektomie und die axilläre Lymphonodektomie durchgeführt. Anschließend erfolgt eine adjuvante medikamentöse Nachbehandlung und/oder eine adjuvante Nachbestrahlung (Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998).

Die Nachbestrahlung wird sowohl bei der brusterhaltenden Therapie als auch nach *Ablatio* und Lymphonodektomie angewendet. Nach brusterhaltender operativer Therapie ist eine Nachbestrahlung der belassenen Brust mit mindestens 50 Gy und im Bereich des Quadranten des vormaligen Tumorsitzes mit zusätzlich 10 Gy (*boost*) erforderlich. Bei Verzicht auf Nachbestrahlung kommt es innerhalb von fünf Jahren in 30–40% der Fälle zu Lokalrezidiven (Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998). Wenn im *Ablatiopräparat* Tumoranteile histologisch bis zum Resektionsrand reichen, ein ausgedehnter inflammatorischer Karzinomtyp oder ausgedehnte Multizentrität bei einem großen Tumor (T_3 , T_4) vorliegt und wenn Fernmetastasierung noch nicht evident ist, ist eine Nachbestrahlung der Thoraxwand mit 60 Gy (Hochvoltbestrahlung mit Kobalt-60- oder Beschleunigerphotonen) bzw. 48 Gy (Elektronen) indiziert. Eine Nachbestrahlung der Axilla ist dann indiziert, wenn ein massiver Befall vorliegt und/oder das axilläre Fettgewebe karzinomatös infiltriert ist. Die

Dosis beträgt in diesem Fall 50 Gy. Auch der supra-/infraklavikuläre Bereich kann mit einbezogen werden. Für die adjuvante Bestrahlung beim Mammakarzinom konnte in einer dänischen und einer kanadischen Studiengruppe an mehr als 3000 Patientinnen belegt werden, dass eine verbesserte lokoregionale Tumorkontrolle sich direkt in ein verbessertes Gesamtüberleben transformieren lässt (Kreienberg *et al.* 2002). Der Überlebensvorteil nach adjuvanter Bestrahlung der Lymphabflusswege besteht sogar unabhängig von der Anzahl entfernter axillärer Lymphknoten, dem Befallmuster der axillären Lymphknoten und der Dosisintensität der Chemotherapie (Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998).

Die Strahlentherapie nach operiertem Mammakarzinom setzt normalerweise vier Bestrahlungsfelder ein. Feld 1 richtet die Bestrahlung in den Bereich der Restbrust bzw. Thoraxwand mit Gegenfeldern bei einer Dosis von 45–50 Gy. Feld 2 richtet sich auf das Tumorbett, das bei Organerhaltung mit 10 Gy bestrahlt wird. Feld 3 ist das sogenannte Sternafeld, das bei medialem Tumorsitz mit 45 Gy bestrahlt wird und Feld 4 ist das Supra-Infra-Klavikularfeld, das nur in seltenen Fällen bei Totalausfall der Axilla mit 45–55 Gy bestrahlt wird (Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Therapie des Mammakarzinoms sowohl die lokalen als auch die systemischen Komponenten der Erkrankung abdecken muss. Die chirurgische Therapie beschränkt sich dabei auf das lokale Geschehen, während die medikamentöse Therapie den systemischen Charakter der Erkrankung einzudämmen versucht. Die Nachbestrahlung bei brusterhaltender Therapie bzw. auch nach Ablatio versucht die Metastasierung und somit die Rezidivrate des Mammakarzinoms zu verhindern und arbeitet demnach auf lokoregionärer Ebene.

Die Prognose des Mammakarzinoms ist vom Ausbreitungsgrad bei Therapiebeginn abhängig. Bei freier Axilla beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 80–85% und die 10-Jahres-Überlebensrate ca. 75%. Bei 1–3 positiven Lymphknoten sinken die Zahlen auf 60% bzw. 45%. Bei richtiger Indikationsstellung sind die Ergebnisse nach brusterhaltendem Vorgehen nicht schlechter (Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998). Wenn Lymphknoten befallen sind und damit die Prognose ungünstig ist, müssen zusätzliche Therapien wie Zytostase und Hormontherapie eingeleitet werden. Zu den regionalen Lymphknoten zählen die interpektoralen, die oberflächlichen und tiefen axillären, die paramammären und die parasternalen Lymphknoten. Wichtig ist ferner die lokalisationsabhängige Unterteilung in Ebenen. Ebene I bzw. Level I bedeutet, dass diese Lymphknoten lateral des Randes des *M. pectoralis minor* liegen. Level II bedeutet, dass sie zwischen dem medialen und latera-

len Rand des *M. pectoralis minor* sowie interpektoral und in Level III medial des medialen Randes des *M. pectoralis minor* einschließlich infraclavikulär liegen. Die Tumorausdehnung wird nach dem TNM-System eingeteilt. Bei Patientinnen mit ungünstiger Prognose ist die Behandlung mittels Chemotherapie indiziert. Bewährte Therapieschemata sind *CMF* (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil) und *VAC* (Vincristin, Adriamycin, Cyclophosphamid). Auch antihormonelle Therapien beim rezeptorpositiven, metastasierenden Mammakarzinom postmenopausaler Patientinnen mit Antiöstrogenen (Tamoxifen) oder mit Gonadotropin-Releasing-Hormonen oder eine Ovariectomie bei prämenopausalen Frauen kommen zum Einsatz.

Eine primäre Bestrahlung des Mammakarzinoms ist dagegen nur bei lokaler oder allgemeiner Inoperabilität der Patientin angebracht. Die erforderliche hohe Tumordosis wird durch eine kombinierte perkutane und interstitielle Bestrahlung erreicht. Ansonsten kommt die Strahlentherapie in Abhängigkeit von der Operationsmethode und dem operativen Befund in unterschiedlichem Ausmaß postoperativ zur Anwendung.

1.3. Nebenwirkungen der Strahlentherapie

Neben der Zerstörung des Tumorgewebes kommt es bei einer strahlentherapeutischen Behandlung immer auch zu einer Schädigung des Normalgewebes. Bei diesen Nebenwirkungen unterscheidet man zwischen akuten und späten Normalgewebereaktionen. Akute Nebenwirkungen treten bereits während oder kurz nach der strahlentherapeutischen Behandlung auf. Als späte Nebenwirkungen bezeichnet man jene Nebenwirkungen, die erst Monate nach der Therapie auftreten, wobei die Grenze auf 90 Tage nach Therapie festgelegt wurde. Beispiele für akute Nebenwirkungen sind die radiogene Mukositis und Dermatitis, während eine Strahlenmyelopathie oder eine Lungenfibrose typische späte Nebenwirkungen sind. Bei der Bestrahlung des Mammakarzinoms kann es noch während oder unmittelbar nach der Strahlentherapie zu akuten Nebenwirkungen kommen. Zu diesen Fröh-schäden werden z. B. der sogenannte Strahlenkater mit Störungen des Appetits, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Schwindelgefühl gerechnet. Außerdem kann sich eine Strahlendermatitis und/oder eine Strahlenpneumonitis ausbilden. Akute Nebenwirkungen der Strahlentherapie heilen in der Regel nach Beendigung der Bestrahlung schnell und ohne Folgen ab, mit Ausnahme von Nebenwirkungen, die als "*consequential late effects*" bezeichnet werden.

Demgegenüber sind späte Nebenwirkungen nicht reversibel und oft progredient. Als "*consequential late effects*" werden späte Nebenwirkungen bezeichnet, die als Folge einer

akuten Reaktion zu betrachten sind, wie z. B. Vernarbungen (Dörr und Hendry 2001). Ob ein Gewebe eher eine akute oder späte Nebenwirkung entwickelt, hängt von verschiedenen Kriterien ab. Gewebe, die einen hohen Zellumsatz, eine kurze Zellzyklusdauer, eine geringe intrazelluläre Erholung und eine große Repopulierungsfähigkeit besitzen, reagieren akut. Gewebe mit einem niedrigen Zellumsatz, einer langen Zellzyklusdauer, einer hohen intrazellulären Erholung und einer geringen Repopulierungsfähigkeit reagieren dagegen mit einer späten Reaktion auf eine Bestrahlung. Die sogenannten späten oder chronischen Nebenwirkungen erfolgen im Sinne einer Degeneration, Atrophie, Fibrosierung oder Nekrose. Typische Strahlenspätchäden bei Bestrahlung des Mammakarzinoms sind Strahlenfibrose, Strahlenulkus, Teleangiektasien, Lungenfibrose, Strahlenödem sowie Retraktion und Atrophie der belassenen Mamma. Weiterhin klagen die Patientinnen über Schmerzen im bestrahlten Sektor.

Das Ziel der strahlentherapeutischen Behandlung ist es, eine möglichst komplikationsfreie Kontrolle des Tumors zu erreichen. Bei der Festlegung der Gesamtdosis ist deshalb zwischen einer maximalen Inaktivierung des Tumors und der Toleranz des umgebenden Normalgewebes abzuwägen. Hierbei sind vor allem wegen ihres progredienten Verhaltens späte Nebenwirkungen zu berücksichtigen. Diese Reaktionen bestimmen somit ganz entscheidend die maximal applizierbare Gesamtdosis. Dieses Konzept der therapeutisch benötigten und der gesundheitlich möglichen Dosis wurde erstmals von Holthusen beschrieben (Holthusen 1936).

1.4. Quantifizierung der akuten und späten Nebenwirkungen

In der Strahlentherapie wurde bereits frühzeitig die Notwendigkeit erkannt, akute und späte Normalgewebereaktionen quantitativ zu erfassen. Eine solche Klassifikation sollte organspezifisch sein, den Zeitpunkt des Auftretens (akute oder späte Reaktion), die Schwere der Ausprägung, die Reversibilität bzw. chronische Ausbildung einer Veränderung berücksichtigen und, wenn möglich, eine objektive Beurteilung sowie eine Darstellung in bildgebenden Verfahren (Röntgen, CT, MRT) beinhalten.

Eine Arbeitsgruppe der *EORTC/RTOG* (europäische und nordamerikanische radioonkologische Gesellschaften) hat Mitte der achtziger Jahre eine solche Einteilung für akute und späte Nebenwirkungen erarbeitet, wobei folgende Schweregrade festgelegt wurden: 0 = keine, 1 = gering, 2 = mäßig, 3 = stark, 4 = lebensbedrohlich und 5 = Tod des Patienten. Diese Einteilung wurde in den kommenden Jahren weiter spezifiziert und das sogenannte *LENT*-Einteilungs-System entwickelt (engl.: *late effect normal tissue*). Es wurden

vier Kategorien zur Beschreibung der Reaktion miteinander verknüpft (*SOMA*): die subjektive Beschreibung, der objektive Befund, das Management (Behandlungsnotwendigkeiten) und die Analytik (Erfassung objektiver Befunde in Spezialuntersuchungen). Auch hier erfolgte eine Einteilung der Nebenwirkungen in die Schweregrade 0 (keine) bis 5 (tödlicher Ausgang). Mit diesem Einteilungssystem ist es möglich, die Belastung von Normalgeweben nach einer strahlentherapeutischen Tumorthherapie zu klassifizieren und verschiedene Behandlungsverfahren nicht nur hinsichtlich ihrer Tumorwirkung sondern auch hinsichtlich ihrer Nebenwirkungsgrade zu vergleichen.

1.5. Voraussage akuter und später Nebenwirkungen

Aufgrund der Bedeutung der Normalgewebereaktion für die maximal applizierbare Gesamtdosis besteht in der Strahlentherapie schon seit langem ein großes Interesse an einer prädiktiven Bestimmung dieser Reaktion. Die Suche nach einer verwendbaren und zuverlässigen Voraussage der Reaktion des Normalgewebes auf eine Strahlentherapie wurde als *“Holy Grail on Radiobiology“* bezeichnet (Peters 1990). Wilfried Budach (1997) legte dar, dass eine verlässliche Voraussage von Nebenwirkungen zu einer Individualisierung von Toleranzdosiskonzepten führen könnte. Diese Individualisierung von Toleranzdosiskonzepten könnte einerseits das Auftreten von Nebenwirkungen bei besonders strahlensensiblen Patienten verhindern und andererseits eine Dosissteigerung bei besonders strahlenresistenten Patienten erlauben. Derzeit orientiert sich das Toleranzdosiskonzept an der Dosis, die bei maximal 5% der Strahlentherapie-Patienten eine schwere Nebenwirkung hervorruft. D. h. für die anderen 95% der Strahlentherapie-Patienten könnte sich die Dosis erhöhen lassen. Die Folgen des Anstiegs der Behandlungsdosis wären eine Senkung der Morbidität von strahlenresistenten Strahlentherapie-Patienten (Jones *et al.* 1995) mit einer Zunahme der Tumorkontrollrate von 5–20% (West und Hendry 1991).

1.6. Variation der Normalgewebereaktion

Für das Auftreten einer Normalgewebereaktion wird eine Vielzahl von Parametern verantwortlich gemacht (West und Hendry 1991). Die wichtigsten sind die Höhe der Dosis und das Bestrahlungsvolumen (West *et al.* 1995). Das Risiko bzw. das Ausmaß einer Normalgewebereaktion nimmt mit der Dosis zu (Turesson 1990, Bentzen und Overgaard 1994, Turesson *et al.* 1996, Dörr 1997). Aber selbst bei einem identischen Fraktionierungsschema zeigte sich eine große Variation im Ausmaß der Spätreaktion, wie von Tucker *et al.* 1992 und Turesson *et al.* 1996 für das Auftreten von Hautreaktionen nach der Be-

strahlung von Mammakarzinomen detailliert gezeigt wurde. Eine genaue Analyse der Daten ergab, dass die Variation im Auftreten der Hautreaktion zu 25% auf eine Veränderung in der Hautdosis sowie des systolischen Blutdrucks, des menopausalen Status, der begleitenden Medikamente und des Alters zurückzuführen war, dass aber zu 75% individuelle und daher vermutlich genetisch bedingte Unterschiede hierfür verantwortlich gemacht werden müssen.

1.7. Genetische Faktoren der Normalgewebereaktion

Als genetische Faktoren, die das Ausmaß einer Spätreaktion bestimmen, kommen eine Fülle von Parametern in Frage. Als der wichtigste derzeit diskutierte Parameter gilt die genetisch festgelegte zelluläre Strahlenempfindlichkeit. Erste Hinweise diesbezüglich gründen sich auf Beobachtungen an Patienten mit dem Syndrom *Ataxia telangiectasia* (AT). Diese Patienten zeigten nach einer Bestrahlung eine ausgeprägte Normalgewebereaktion, was auf eine extrem hohe zelluläre Strahlenempfindlichkeit zurückgeführt werden konnte (Hart *et al.* 1987). Auch für andere Syndrome (*Bloom-Syndrom*, *Fanconi-Anämie* (FA), *Li-Fraumeni-Syndrom* (LFS), *Naevusbasalzell-Syndrom*, *Neurofibromatose* (NF), *Nijmegen-Syndrom* (NBS) und *Retinoblastom* (RB) konnte ein ähnlicher Zusammenhang beobachtet werden (Peters 1990, Streffer 1997).

Von Burnet *et al.* (1992) wurde erstmalig postuliert, dass nicht nur bei Patienten mit bestimmten Syndromen, sondern möglicherweise bei allen Patienten das Ausmaß der Normalgewebereaktion durch die genetisch determinierte, individuelle Strahlenempfindlichkeit bestimmt wird. Diese Annahme basierte auf der Analyse von sechs Patienten, bei denen das Ausmaß der Telangiektasie bzw. des Hauterythems mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit korrelierte. Auf diesen Zusammenhang hatten zuvor bereits Woods *et al.* (1988) und Plowman *et al.* (1990) hingewiesen, da sie entdeckten, dass die zelluläre Empfindlichkeit strahlenempfindlicher Patienten deutlich über der gesunder Spender liegt. Smith *et al.* (1980) und Weichselbaum (1976) konnten solch einen Unterschied allerdings nicht feststellen.

Die von Burnet (1994) aufgestellte Hypothese konnte von Johansen *et al.* (1996) in einer Studie mit 31 Brustkrebspatientinnen bestätigt werden. Auch hier zeigte sich eine Korrelation zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit und dem Risiko, eine Fibrose zu entwickeln. Dabei zeigten Patientinnen mit einer erhöhten zellulären Strahlenempfindlichkeit im Mittel ein größeres Risiko für eine Fibrose als solche mit einer geringen Empfindlichkeit. Dieser Zusammenhang galt allerdings nur für späte, nicht aber für akute Normal-

gewebereaktionen. Auch Ramsay und Birrell (1995) berichteten von einer Korrelation zwischen dem Ausmaß der Normalgewebereaktion und der individuellen Strahlenempfindlichkeit.

Dem stehen Publikationen gegenüber, in denen keine entsprechende Korrelation aufgezeigt wird. So wiesen Begg *et al.* (1993) bei zwölf Brustkrebspatientinnen nach, dass keine Beziehung zwischen der individuellen Strahlenempfindlichkeit und den akuten Nebenwirkungen der Haut bestand. Auch Brock *et al.* (1995) zeigten weder für die akuten noch die späten Reaktionen einen Zusammenhang mit der individuellen Strahlenempfindlichkeit auf. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Rudat *et al.* (1997 und 1999) für akute bzw. späte Nebenwirkungen sowie Peacock *et al.* (2000) und Kuhlmann (2003) für späte Normalgewebereaktionen. Insgesamt lag zum Beginn dieser Arbeit somit ein sehr uneinheitliches und z. T. widersprüchliches Bild bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der individuellen Strahlenempfindlichkeit und dem Auftreten einer Normalgewebereaktion nach Strahlentherapie vor. Um dieses heterogene Bild der vorliegenden Studien aufzuklären, sind zukünftige Arbeiten notwendig, die sich den molekularen Mechanismen der individuellen Strahlenempfindlichkeit widmen.

1.8. Chromosomenaberrationen als Indikator der Strahlenempfindlichkeit

Für das unklare Bild über den Zusammenhang zwischen der individuellen Strahlenempfindlichkeit und dem Auftreten einer Normalgewebereaktion wird eine Reihe von Faktoren verantwortlich gemacht. Als eine mögliche Ursache wird diskutiert, dass in den Untersuchungen die Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit auf ganz unterschiedliche Weise erfolgte. In den meisten Untersuchungen wurde dieser Parameter der individuellen Strahlenempfindlichkeit von isolierten Fibroblasten aus Hautbiopsien bestimmt. Dabei wurde entweder die Überlebensrate nach einer Bestrahlung mit 2 oder 3.5 Gy (SF_2 oder $SF_{3.5}$) als Indikator verwendet oder die Dosis ($D_{0.01}$), die benötigt wurde, um die Überlebensrate auf 1% zu reduzieren.

Alternativ zum Kolonietest kann die Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten auch über die Zahl der induzierten Chromosomenaberrationen bestimmt werden. Der Nachweis von Chromosomenaberrationen ist technisch sehr einfach und die Identifikation dieser Aberrationen weitgehend unproblematisch. Der Nachweis dieser Aberrationen geschieht in der Regel mit dem sogenannten Metaphasen- oder auch G1-Assay. Bei dieser Methode sind die Fibroblasten in der G1-Phase zu bestrahlen. Eine solche synchrone Zellpopulation kann durch Anreicherung der Zellen in der Plateauphase erreicht werden, wodurch nahezu

100% der Fibroblasten in die G1-Phase gebracht werden können. Nach der Bestrahlung können durch Aussaat bei geringer Dichte die Zellen zur Proliferation in den Zellzyklus angeregt werden. Die Zellen werden dann in der ersten Mitose mittels eines Spindelfaser-giftes wie z. B. Colcemid in der Metaphase angehalten. Durch einen hypotonischen Schock können die arretierten Metaphasezellen aufgerissen und die Chromosomen ausgespreizt werden. Anschließend können die Präparate lichtmikroskopisch analysiert werden.

Die so behandelten Zellen zeigen nach einer ionisierenden Bestrahlung charakteristische Aberrationen. Dies sind neben dizentrischen Chromosomen, terminalen und interstiti-ellen Deletionen nach höheren Dosen auch komplexe und unvollständige Aberrationen (Cornforth 2001). Terminale Deletionen sind eher seltene Ereignisse (Fomina *et al.* 2000). Bereits deutlich häufiger treten dizentrische Chromosomen auf. Die weitaus häufigsten Schäden sind jedoch interstitielle Deletionen (Fomina *et al.* 2000). Ab Dosen von 1 bis 2 Gy sind auch komplexe und unvollständige Aberrationen zu berücksichtigen, die ab einer Dosis von 5 Gy sogar die bedeutsamste Aberration darstellten (Cornforth 2001).

Die oben beschriebenen Aberrationen sind für die Zelle wegen der Entstehung eines azentrischen Fragments ein letales Ereignis. Dem azentrischen Fragment fehlt der Anknüp-fungspunkt für die Spindelfasern, sodass das Fragment während der Metaphase in der Äquatorialebene verbleibt und in der Anaphase nicht zu einem der Spindelpole gezogen werden kann. Dieses Fragment wird während der Zytokinese mit einer Extramembran um-geben und dann in Form eines Mikrokerns aus der Zelle geschleust. Den beiden Tochter-zellen geht auf diese Weise DNA verloren, sodass der Zelle langfristig genetische Informa-tion fehlt. Es kann daher zu einer Abnahme von essentiellen Proteinen kommen, sodass die Zelle nach spätestens 2 bis 3 Teilungen irreversibel ihre Teilungsfähigkeit verliert. Dizen-trische Chromosomen können darüber hinaus auch über das Entstehen von Anaphasebrük-ken zum Verlust des Teilungsvermögens beitragen.

In zahlreichen Untersuchungen, sowohl mit Fibroblasten als auch mit anderen Normal-oder Tumorzellen, wurde gezeigt, dass die Zahl der letalen Chromosomenaberrationen direkt mit der Strahlenempfindlichkeit der Zellen korreliert (Cornforth und Bedford 1987, Schwartz 1992, Coco-Martin *et al.* 1994, Russell *et al.* 1995). Fasst man die Daten der Li-teratur zusammen, so zeigt sich für ganz unterschiedliche Zelltypen, dass eine größere Strahlenempfindlichkeit stets mit einer vermehrten Anzahl letaler Aberrationen korrelierte.

Von Jones *et al.* (1995) wurde erstmals der Nachweis von Chromosomenaberrationen zur Charakterisierung der individuellen Strahlenempfindlichkeit von Strahlentherapie-

Patienten genutzt. Hierzu wurden den Patienten Blutproben entnommen und dann *in vitro* mit 3 Gy bestrahlt. Allerdings wurden in dieser Untersuchung nicht alle Chromosomenaberrationen, sondern nur die Zahl dizentrischer Chromosomen bestimmt. Es fand sich in dieser Untersuchung kein Zusammenhang zwischen der so ermittelten individuellen Strahlenempfindlichkeit und dem Auftreten einer schweren Normalgewebereaktion, da für Patienten mit extremen akuten oder späten Nebenwirkungen die Zahl dizentrischer Chromosomen genau so hoch war wie für gesunde Spender.

Die alleinige Auszählung der dizentrischen Chromosomen ergab in einer Studie des hiesigen Labors für die Untersuchung von acht Patienten mit extremen späten Nebenwirkungen sowie acht Patienten mit sehr geringen Nebenwirkungen das gleiche Ergebnis (Borgmann *et al.* 2002). Dagegen konnte bei Berücksichtigung der zusätzlichen azentrischen Fragmente ein deutlicher Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen, mit mehr Aberrationen bei den Patienten mit schweren Nebenwirkungen, gezeigt werden. Die Berücksichtigung der zusätzlichen azentrischen Fragmente ist auch deshalb sinnvoll, weil – wie oben bereits dargestellt – die zusätzlichen azentrischen Fragmente weitaus häufiger sind als die dizentrischen Chromosomen und zudem eine deutlich größere individuelle Schwankung zeigen (Borgmann *et al.* 2002). Auch Neubauer *et al.* (1996 und 1997) fanden sowohl für akute als auch späte Nebenwirkungen heraus, dass Lymphozyten von Patienten mit extremen Reaktionen mehr Chromosomenaberrationen zeigten als Lymphozyten von Patienten mit geringen Nebenwirkungen. In diese Untersuchungen wurden sowohl letale als auch nicht-letale Chromosomenaberrationen einbezogen. Insgesamt sind dies allerdings zu wenige Daten, um Chromosomenaberrationen *in vitro* bestrahlter Lymphozyten als Methode zur Identifizierung von Patienten mit extremen Nebenwirkungen zu empfehlen.

Die Bedeutung letaler Chromosomenaberrationen *in vitro* bestrahlter Fibroblasten als Indikator für die individuelle Strahlenempfindlichkeit ist bislang nur unzureichend geklärt. Einige Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen individueller Strahlenempfindlichkeit und dem Grad oder dem Risiko einer Normalgewebereaktion nach Strahlentherapie auf. So fanden Burnet *et al.* (1998) für sechs Brustkrebspatientinnen einen Zusammenhang zwischen der individuellen Strahlenempfindlichkeit der Patientinnen und dem Ausmaß der frühen und späten Normalgewebereaktion. Johansen *et al.* (1996) ermittelten für 32 Brustkrebspatientinnen einen Zusammenhang zwischen der individuellen Strahlenempfindlichkeit und dem Fibrosiserisiko. Geara *et al.* (1993) bestimmten für 20 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der individuellen Strahlenemp-

findlichkeit und der Spätreaktion, nicht aber für die Akutreaktion. Kiltie *et al.* (1999) fanden für 39 Brustkrebspatientinnen eine Korrelation mit dem Grad der Fibrose, nicht aber mit dem Grad der Teleangiektasie bei Bestimmung der individuellen Empfindlichkeit über die Zahl der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche. Oppitz *et al.* (1999) fanden für 88 Patienten, überwiegend mit Brustkrebskrankungen, eine Korrelation zwischen individueller Strahlenempfindlichkeit und den Akut-, nicht aber den Spätreaktionen.

Es gibt aber auch eine Reihe von Studien, die keinen solchen Zusammenhang aufklärten. So fanden Brock *et al.* (1995) für 22 Brustkrebspatientinnen, Jones *et al.* (1995) für 17 Brustkrebspatientinnen, Russell *et al.* (1998) mit einer sehr großen Studie mit 79 Brustkrebspatientinnen sowie Rudat *et al.* (1999) für 23 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und Peacock *et al.* (2000) keinen Zusammenhang zwischen individueller Strahlenempfindlichkeit und dem Grad der Akut- oder Spätreaktionen nach Strahlentherapie. Auch in dem hiesigen Labor konnte von Kuhlmann (2003) keine Beziehung von letalen Chromosomenaberrationen und Normalgewebereaktionen bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom ermittelt werden. Dies könnte möglicherweise auf die Besonderheiten bei der Inaktivierung von Fibroblasten zurückzuführen sein, die im Gegensatz zu anderen Zelltypen nicht nur durch den mitotischen Zelltod, ausgelöst durch letale Chromosomenaberrationen, sondern auch durch die terminale Differenzierung inaktiviert werden. Genauere molekulare Untersuchungen zu diesem Phänomen stehen noch aus.

1.9. Zelluläre Inaktivierung in humanen Fibroblasten

Zellen können nach ionisierender Bestrahlung durch den mitotischen Zelltod, Apoptose und terminale Differenzierung inaktiviert werden. Welche Form des Zelltods eingeleitet wird, ist vom Zelltyp abhängig. So sterben Zellen des Darmepithels und des hämatopoetischen Systems durch Apoptose oder den mitotischen Zelltod. Fibroblasten werden dagegen durch den mitotischen Zelltod oder die terminale Differenzierung inaktiviert.

Der mitotische Zelltod wird durch letale Chromosomenaberrationen herbeigeführt. Durch einen DNA-Doppelstrangbruch kommt es bei jeder letalen Chromosomenaberration zu mindestens einem azentrischen Fragment. Um dieses azentrische Fragment bildet sich in der auf die Bestrahlung folgenden Zytokinese der Mitose eine separate Membran und es entsteht ein sogenannter Mikrokern. Die auf diesem Fragment sich befindliche genetische Information geht beiden Tochterzellen verloren und die durch diese Gene kodierten Proteine verdünnen sich im Verlauf der nächsten Zellteilungen. Die Reduktion der Verfügbarkeit essentieller Proteine bewirkt letztendlich das Absterben der Zellen.

Zellen, die nicht proliferieren, können folglich nicht mitotisch absterben. In humanen Fibroblasten, die zu zirka 70% nicht proliferieren, kann ionisierende Bestrahlung einen vollständigen Zellzyklusarrest mit nachfolgender vorzeitiger Differenzierung auslösen. So wurde für eine Lungenfibroblastenlinie nach einer Dosis von 1 Gy gezeigt, dass 80% der Zellen vorzeitig differenzierten. Der entscheidende Schritt der terminalen Differenzierung ist der permanente G1-Arrest. Als Resultat des permanenten G1-Arrests verlassen die Zellen den Zellzyklus aktiv in der G1-Phase und scheren in die sogenannte G0-Phase aus. Die terminale Differenzierung verläuft dann in mehreren Stufen, in denen die Zellen von teilungsfähigen Fibroblasten zu funktionellen Fibrozyten degenerieren, welche ihre Teilungsfähigkeit verloren haben und nicht mehr in ihren Zellzyklus zurückkehren können (Bayreuther *et al.* 1988, Bayreuther *et al.* 1991, Bayreuther *et al.* 1992, Rodemann *et al.* 1989). Dieses postmitotische Stadium kann automatisch durch eine ausreichende Anzahl von Zellteilungen oder durch zellulären Stress, wie z. B. ionisierende Bestrahlung ausgelöst werden (Rodemann *et al.* 1989). Die übliche Differenzierung von Fibroblasten verläuft normalerweise über drei teilungsaktive (I–III), sogenannte mitotische und drei postmitotische Entwicklungsstadien (IV–VI) (Bumann *et al.* 1995, Rodemann *et al.* 1996). Die mitotische Phase umfasst zirka 25–35 Teilungen, die Zellen werden auch als Vorläuferfibroblasten bezeichnet. Darauf folgt die postmitotische Phase mit hoher metabolischer Aktivität, an deren Ende der postmitotische Fibrozyt VI steht. Durch Einleitung der Apoptose (Rodemann und Bamberg 1995) degeneriert der postmitotische Fibrozyt VI. Postmitotische Fibrozyten VI stellen das letzte Stadium des Fibroblasten-Stammzellen-Systems dar. Die apoptotisch entfernten Fibrozyten VI werden nach ihrem Untergang regelmäßig durch sich differenzierende, mitotische Vorläuferfibroblasten ersetzt. Somit machen sich Störungen im Differenzierungsprozess unmittelbar in Veränderungen der zellulären Zusammensetzung des Bindegewebes bemerkbar.

Im Bindegewebe menschlicher Haut liegen mitotische und postmitotische Fibroblasten in einem Verhältnis von 2 : 1 vor. Durch dieses ausgewogene Verhältnis wird die einwandfreie Funktion des dermalen Bindegewebes gewährleistet. Änderungen im Verhältnis der Zellzusammensetzung führen schließlich zu schwerwiegenden Veränderungen der Gewebeeigenschaften. So kann durch Bestrahlung die Differenzierung beschleunigt werden und bei Patienten unter Beteiligung anderer Zellen zur radiogenen Fibrose führen, die wegen der niedrigen Erneuerungsrate des Bindegewebes zu den Spätschäden des Gewebes zählt. Die Fibrose zeichnet sich durch eine gesteigerte Kollagensynthese des Typs I, III und V

und Synthese verschiedener Proteoglykane aus (Rodemann und Bamberg 1995, Rodemann *et al.* 1996).

Die molekularen Ursachen der vorzeitigen terminalen Differenzierung nach ionisierender Bestrahlung sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Man nimmt an, dass der Prozess durch nach Bestrahlung entstandene DNA-Doppelstrangbrüche eingeleitet wird, indem es zu einer durch das Tumorsuppressorprotein 53 (*TP53*) abhängigen, vermehrten Expression des *p21*-Proteins (*CDKN1*) kommt. Der Anstieg des *p21*-Proteins führt zur Hemmung der Cyklin-abhängigen-Kinasen *CyklinD/Cdk4* und *CyklinE/Cdk2* und verhindert die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins und die Freisetzung des *E2F*-Proteins (Vogelstein *et al.* 2000, Lenardo *et al.* 1994). Die Transaktivierung der Signalkaskade wird verhindert und die Zellen können nicht mehr von der G1- in die S-Phase wandern, scheren in die G0-Phase aus und leiten die Differenzierung und Seneszenz ein (Rodemann *et al.* 1991, Ross 1999).

1.10. Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, welche Bedeutung die letalen Chromosomenaberrationen für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten haben, in welcher Beziehung letale Chromosomenaberrationen und residuelle DNA-Doppelstrangbrüche stehen und ob das Tumorsuppressorprotein *TP53* für die Inaktivierung von Fibroblasten bedeutsam ist. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Experimente an Fibroblastenlinien von 12 Brustkrebspatientinnen und einem Normalspender mit folgenden Schwerpunkten durchgeführt:

- Beziehung zwischen letalen Chromosomenaberrationen und residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen.
- Beziehung zwischen letalen Chromosomenaberrationen und *in vitro*-Strahlenempfindlichkeit im Koloniebildungstest.
- Bedeutung des *TP53*-Proteins für die Inaktivierung nach ionisierender Bestrahlung in Zelllinien mit funktionellem bzw. inaktivem *TP53*.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Generelle Beschreibung der Patientinnen

Die Studie wurde durchgeführt mit 12 Fibroblastenlinien von Brustkrebspatientinnen, die nach einer Strahlentherapie unterschiedlich stark ausgeprägte subkutane Fibrosen entwickelten. Die Patientinnen wurden aus einer Kohorte von 229 ausgewählt, die zwischen 1978 und 1982 infolge eines Mammakarzinoms am Universitätsklinikum der Universität Århus, Dänemark zunächst chirurgisch und nachfolgend strahlentherapeutisch behandelt wurden. Die Bestrahlung der Patientinnen erfolgte durch ein schräg angelegtes Photonenfeld auf die axillären und infraklavikulären Regionen sowie ein Elektronenfeld auf die angrenzende Brustwand. Der Narbenbereich in der Achsel wurde durch eine Wachsschicht geschützt. Alle Patientinnen erhielten eine Strahlentherapie von 12 Fraktionen mit je zwei Fraktionen pro Woche und einer Mindestzieldosis von 36.6 Gy, spezifiziert auf das Niveau der Achselmitte. Der Bereich der absorbierten Dosis pro Fraktion bei einer Referenztiefe von 4.1 mm rangierte zwischen 2.7 und 3.9 Gy. Keine der Patientinnen erhielt eine Chemotherapie (Johansen *et al.* 1994).

Primäre Hautbiopsien von 5 mm Durchmesser wurden aus einer unbestrahlten Region des Oberarms der Patientinnen entnommen. Als Kontrolle wurde die Fibroblastenlinie *HHNF1* eingesetzt, die aus einer Nabelschnur etabliert wurde. Die Biopsien wurden zerkleinert, in Petrischalen (*Falcon*) überführt und mit dem Nährmedium *Dulbecco-minimal-essential-Medium (DMEM, Gibco)* unter Zusatz von 15% fetalem Kälberserum (*Gibco*) versetzt. Die Kulturen wurden bei 37°C in einem Inkubator mit 10% CO_2 verwahrt. Nach Auswachsen der Fibroblasten wurden die Biopsiestückchen entfernt, sodass reine Fibroblastenkulturen zurückblieben.

Die Zellkulturhaltung erfolgte durch Aussaat der gewonnenen Fibroblasten in Gewebekulturflaschen (75 cm², *Falcon*) unter Zugabe des Nährmediums *DMEM (Gibco)* bei 37°C in einem Inkubator bei 95%iger Luftfeuchtigkeit unter Luftsauerstoff, angereichert mit 10% CO_2 . Ein- bis zweimal wöchentlich wurde das Medium entfernt und die Zellen für zirka 1 min mit 4 ml 0.25% Trypsin (*Difco*) versetzt, um die Haftung der Zellen am Flaschenboden aufzuheben. Die abgelösten Zellen wurden in *DMEM* resuspendiert und in geringerer Dichte neu ausgesät. Für die Experimente wurden ausschließlich Fibroblasten der Passagen 3 bis 6 verwendet. Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt.

2.2. Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mit einer 200 kV Röntgenröhre (*RT200*, C. H. F. Müller, Hamburg) bei einem Röhrenstrom von 20 mA und einer Spannung von 200 kV. Als Zusatzfilter wurde ein 0.5 mm starker Kupfer-Filter angebracht. Zur Eichung der Röntgenröhre wurde ein Duplexdosimeter (*PTW*) verwendet, welches mit einer Strontium-Radium-Ionisationskammer kalibriert wurde. Die Fibroblastenlinien wurden in der Plateauphase mit einer Dosisrate von 2 Gy/min bei Raumtemperatur bestrahlt.

2.3. Metaphasen-Technik

Für die vorliegende Studie waren ausschließlich Chromosomenaberrationen von Interesse, die für das Absterben der Zellen nach Bestrahlung verantwortlich sind. Die letalen Chromosomenaberrationen der G1-Phase sind gegenüber den Chromosomenaberrationen der G2-Phase von größerer Bedeutung, da sich die Schädigung auf beide Chromatiden bezieht. Die Chromosomenaberrationen wurden mit der Metaphasen-Technik untersucht.

2.3.1. Synchronisation der Zellen in der G0-Phase

Die Fibroblastenkulturen wurden vor der Bestrahlung durch Kontaktinhibition in der G0-Phase synchronisiert. Dazu wurden 6.6×10^5 Zellen in 75 cm^2 Gewebekulturflaschen (*Falcon*) ausgesät und mit 10 ml *DMEM* (*Gibco*) versetzt. Nach einem Zeitraum von fünf Tagen waren die ausgesäten Zellen zu einem dichten Zellrasen zusammengewachsen und hatten ihre Teilungsaktivität eingestellt. Diese Kontaktinhibierung bewirkt, dass die Zellen den Zellzyklus verlassen und in der sogenannten G0- bzw. Plateauphase angehalten werden. Durch diese Synchronisierung konnten 97% der Zellen in der G0-Phase angehalten werden. Die Zellen ließen sich in diesem als Konfluenz bezeichneten Zustand mehrere Tage bis Wochen halten. Die Fibroblastenkulturen wurden acht Tage nach Aussaat für die Experimente eingesetzt.

2.3.2. Akkumulation der Zellen in der Metaphase

Die Analyse der Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G0-Phase erfolgte anhand von Chromosomenpräparaten in der Metaphase der Mitose. Zu Beginn der Mitose, in der Prophase, kondensiert das Chromatin zu distinkten Chromosomen, die ihren stärksten Kondensierungsgrad in der Metaphase der Mitose aufweisen. Nur in dieser Zellzyklusphase ist es möglich, die Chromosomenaberrationen zu untersuchen. Die Fibroblasten wurden, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, synchronisiert und bestrahlt. Sechs Stunden nach Bestrahlung wurden die Fibroblasten mit Trypsin (*Difco*) behandelt, in einer geringe-

ren Konzentration von zirka 6×10^5 Zellen/Flasche ausgesät und in 10 ml *DMEM* resuspendiert. Durch das Aussäen bei geringerer Dichte wurden die Zellen zur Proliferation stimuliert. Nach 44 h erfolgte die Zugabe von 25 µl Colcemid (Endkonzentration: 0.025 µg/ml, *Gibco*). Colcemid ist ein Spindelfasergift, welches die Ausbildung funktionsfähiger Spindelfasern unterbindet und dadurch verhindert, dass die Chromatiden während der Zellteilung zu den entgegengesetzten Polen gezogen werden. Die Chromatiden werden durch Colcemid temporär in der Äquatorialebene der Metaphase arretiert. Da die Fibroblasten nach der Stimulierung zeitlich versetzt in den Zellzyklus eintraten, erfolgte die Inkubation mit Colcemid für 16 h. Durch diese lange Inkubationszeit konnten 1 bis 5% der ausgesäten Zellen nach Stimulation in den Zellzyklus in der Metaphase arretiert werden.

Durch Abklopfen wurden die mitotischen Zellen von den Interphasezellen getrennt. Hierbei wurde das Phänomen genutzt, dass sich mitotische Zellen abrunden, wodurch ihre Anhaftung am Flaschenboden im Vergleich zu Interphasezellen reduziert wird. Durch dieses Trennverfahren beträgt der Anteil mitotischer Zellen im Überstand zirka 95%. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des *Coulter CountersTM* (*Counter Electronics*, Dunstable).

2.3.3. Herstellung von Chromosomenpräparaten

Für die Untersuchung der Chromosomenaberrationen mussten zunächst auswertbare Präparate mit Chromosomen in der Metaphase hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurden die mitotischen Zellen in ein Falconröhrchen überführt, hypotonisch behandelt, fixiert, auf Objektträger getropft und gefärbt.

Hypotonische Behandlung und Fixierung: Für jeden Dosiswert wurden die suspendierten Metaphasezellen in je zwei Falconröhrchen (14 ml, *Falcon*) überführt und bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe bis 1 ml über dem Sediment entfernt. Das Sediment wurde auf dem Schüttler resuspendiert und der Inhalt in ein Röhrchen überführt. Um Mediumreste zu entfernen, wurden der Suspension anschließend 12 ml *PBS* (*phosphate buffered saline, pH 7.0*) tropfenweise auf dem Schüttler hinzugegeben. Es wurde 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um die Zellen langsam in ein hypotones Milieu zu überführen, wurde auf die gleiche Weise 12 ml 0.0075 M *KCl* (*Merck*) hinzugefügt. Die Gabe von *KCl* bewirkte eine Vergrößerung der Zellen. Daran schloss sich wiederum ein Zentrifugationsschritt bei 1000 U/min für 5 min an und der Überstand wurde abermals entfernt. Danach wurden die Zellen tropfenweise mit 12 ml "*Carnoy's Fixativ*" (*Sigma*), Methanol und Essigsäure im

Verhältnis 3 : 1 dehydratisiert und durch die Entfernung der wässrigen Anteile konserviert. Nach erneutem Abzentrifugieren und Entfernen des Überstands wurde dieser Fixierungsschritt wiederholt. Die so aufbereiteten Zellen konnten bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.

Anfertigung der Präparate und Färbung mit Giemsa: Für die Herstellung der Chromosomenpräparate wurde ein Objektträger (*Engelbrecht*) mit einem dünnen Wasserfilm vollständig überzogen. In die Mitte des Objektträgers wurden $25\ \mu\text{l}$ der in "*Carnoy's*" fixierten Zellsuspension pipettiert. Durch die Reaktion zwischen Wasser und Alkohol wurden die Zellen mit dem Wasserfilm getragen und auf dem Objektträger verteilt. Durch die bei diesem Vorgang einwirkenden mechanischen Kräfte zerplatzten die durch *KCl*-Zugabe hypotonisch vergrößerten Zellen. Die in den Zellen befindlichen Chromosomen wurden so gut voneinander abgrenzbar auf dem Objektträger ausgespreizt. Die Objektträger wurden 20 min an der Luft getrocknet.

Zur Färbung der Chromosomen wurden die Objektträger für 8.5 min in einem Küvettenständer mit 1.5 ml Giemsa (2%ig, *Sigma*) in 70 ml *PBS* gegeben. Der überschüssige Giemsa-Farbstoff wurde durch drei kurze Waschschriffe entfernt. Danach wurden die Objektträger getrocknet. Anschließend wurde auf die Objektträger ein Tropfen Kunstharz (*Entellan*, *Merck*) gegeben und das Präparat mit einem Deckgläschen (*Marienfeld*) versehen. Die erhaltenen Präparate wurden bei Raumtemperatur gelagert und unter dem Lichtmikroskop (*Zeiss*) ausgewertet.

2.3.4. Auswertung und Klassifizierung der Chromosomenaberrationen

Strukturelle Chromosomenaberrationen, die nach einer Bestrahlung während der G₀- bzw. G₁-Phase des Zellzyklus entstehen können, werden in intra- und interchromosomale Aberrationen unterteilt. Bei der Bildung intrachromosomaler Aberrationen war je ein Chromosom an der Entstehung der Aberration beteiligt und bei interchromosomalen Aberrationen je zwei oder mehrere Chromosomen (Savage 1975). Zu den intrachromosomalen Aberrationen gehören terminale Deletionen, interstitielle Deletionen, zentrische Ringchromosomen und Inversionen und zu den interchromosomalen Aberrationen gehören dizentrische Chromosomen und reziproke Translokationen.

Die Auswertung der mit Giemsa gefärbten Präparate erfolgte mit einem Lichtmikroskop (*Axioplan 2*, *Zeiss*) unter Ölimmersion bei einer 1250-fachen Vergrößerung. Zur Verbesserung der Auswertung wurde eine computergestützte Bildauswertung (*Optimas 5.01*) hinzugezogen. Für jede der 13 Fibroblastenlinien wurden zwei unabhängige Experimente durch-

geführt. Pro Dosiswert wurden zwei Objektträger angefertigt und pro Objektträger mindestens 50 Zellen ausgezählt. Die Zählung erfolgte verschlüsselt. Bei der Zählung wurde die Anzahl aller Chromosomenfragmente pro Zelle bestimmt. Von der Anzahl strahleninduzierter Fragmente wurde die Zahl der Fragmente in unbestrahlten Zellen subtrahiert (Anzahl der zusätzlichen Fragmente). Folgende Aberrationen wurden gezählt:

1. Terminale und interstitielle Deletionen, die auch als intrachromosomale Aberrationen bezeichnet werden. Die weitere Differenzierung ist mit einheitlicher Giemsa-Färbung nicht möglich, sodass beide Formen der Deletion unter dem Begriff "zusätzliche azentrische Fragmente" zusammengefasst wurden. Zusätzliche azentrische Fragmente wurden durch Abzug der Chromosomenfragmente unbestrahlter Zellen ermittelt.
2. Dizentrische Chromosomen, die auch als interchromosomale Aberrationen bezeichnet werden. Sie entstehen durch asymmetrischen Austausch der Chromosomenfragmente zweier geschädigter Chromosomen, wobei ein Austauschpartner die beiden Chromosomenfragmente mit Zentromeren erhält und der andere die Chromosomenfragmente ohne Zentromer. So resultiert aus diesem Austausch ein Chromosom mit 2 Zentromeren, ein dizentrisches Chromosom und ein azentrisches Chromosom ohne Zentromer (Savage 1975).

Die Dosisabhängigkeiten der genomischen und partiellen Aberrationshäufigkeiten wurden mit einer linear-quadratischen Funktion $Y = aD + bD^2$ mit Hilfe der Parameter a und b berechnet. Hierfür wurde die Software *GraphPad PrismTM* verwendet. Die Verteilungen der strahleninduzierten Aberrationen folgten der Poisson-Verteilung.

2.4. Koloniebildungstest

In Kultur befindliche Fibroblasten der Passagen 3–8 wurden mit einer Dichte von $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ in *AmnioMax C 100* (Gibco) mit 7.5% fetalem Kälberserum (Gibco) in 25 cm² Kulturflaschen (Falcon) bei 37°C mit 5% ausgesät und für 7 Tage bis zum Erreichen der Konfluenz inkubiert. Um die Koloniebildungsfähigkeit zu bestimmen, wurden die Zellen in Petrischalen (5 cm Ø) plattiert und anschließend für 14 Tage bei 37°C inkubiert. Pro Petrischale wurden so viele Zellen eingesetzt, daß maximal 100 Kolonien zu erwarten waren. Für die Auszählung wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit 0.9% NaCl gewaschen und mit 70% Ethanol für 5 min fixiert, im Anschluss mit 5% Kristallviolett gefärbt und alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen ausgezählt. Die Überlebensrate zeigt das Verhältnis der Anzahl gebildeter Kolonien zur Anzahl eingegebener Zellen.

2.5. Konstantfeld-Gelelektrophorese

Die DNA-Doppelstrangbrüche wurden mit der Konstantfeld-Gelelektrophorese bestimmt (Dahm-Daphi und Dikomey 1996). Konfluente Zellen wurden bestrahlt, nach 14 h bei 37°C trypsiniert, zentrifugiert und in Medium ohne FCS (4°C) resuspendiert. Die Zellen wurden 1 : 1 mit Agarose (70°C, *low-melting-point*) mit einer Zellkonzentration von 6×10^5 Zellen/ml und einer Agarose-Endkonzentration von 0.8% resuspendiert. Nach Abkühlung wurden die Zellen in $2 \times 2 \text{ mm}^2$ Agaroseblöckchen geschnitten, für 16 h bei 37°C lysiert (0.4 mol/l EDTA, 2% SDS, 1 µg/ml Proteinase K, $pH = 8$), danach mit TE-Puffer gewaschen und in ein 0.8%iges Agarose-Gel überführt. Die Elektrophorese wurde für 40 h bei 0.6 V/cm durchgeführt. Das mit Ethidiumbromid (0.5 µg/ml) gefärbte Gel wurde mit einer CCD-Kamera densitometrisch analysiert (*Optimas*). Die Fraktion der ausgewanderten DNA wurde mit $FDR = f_{rel} / (f_{plug} + f_{rel})$ berechnet, wobei f_{plug} und f_{rel} die relative Fluoreszenz der DNA, die im Agaroseblöckchen verblieb bzw. auswanderte, beschreibt.

2.6. Auswertung und Statistik

Je Experiment wurden, wenn nicht anders erwähnt, mindestens drei Versuche durchgeführt. Aus den Werten wurden jeweils der Mittelwert und der Standardfehler berechnet.

2.7. Materialien, Nährmedien, Puffer und Lösungen

Material

<i>EntellanTM</i>	<i>Merck</i>
Objektträger	<i>Engelbrecht</i>
Deckgläser	<i>Marienfeld</i>
Licht-Mikroskop <i>Axioplan 2</i>	<i>Carl Zeiss, Jena</i>
<i>Optimas 5.01</i>	computergestützte Bildauswertung, <i>Optimas</i>
<i>Graph Pad PrismTM</i>	Statistik
<i>Coulter CounterTM</i>	<i>Counter Electronics, Dunstable</i>
Röntgenröhre <i>RT200</i>	200 kV, <i>C. H. F. Müller, Hamburg</i>

Nährmedien

<i>DMEM</i>	Dulbecco-minimal-essential-Medium, <i>Gibco</i>
<i>FCS</i>	fetales Kälberserum, <i>Gibco</i>
<i>AmnioMax 100</i>	<i>Gibco</i>

Puffer und Lösungen

Colcemid

Gibco, (Endkonzentration: 0.025 µg/ml)

Carnoy's Fixativ

Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1, *Sigma*

Gewebekulturflaschen

Falcon

Giemsa

Endkonzentration 2%ig in *PBS*, *Sigma*

Trypsin-*EDTA*-Lösung

Difco

PBS

phosphate buffered saline pH 7.0

8 g Natriumchlorid

0.2 g Kaliumchlorid

1.15 g Natriumhydrogenphosphat

0.2 g Kaliumhydrogenphosphat

gelöst in 1 Liter *Aqua bidest.*

3. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, in welchem Ausmaß bei humanen Fibroblasten letale Chromosomenaberrationen die zelluläre Strahlenempfindlichkeit bestimmen und welche Beziehung zwischen diesen Aberrationen und residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen besteht. Zu diesem Zweck wurden 12 Brustkrebspatientinnen aus einer Kohorte von 229 Patientinnen einer klinischen Studie der onkologischen Abteilung des Universitätsklinikums der Universität in Århus, Dänemark ausgewählt, die nach einer Mastektomie eine Strahlentherapie im Zeitraum zwischen 1978 und 1982 erhielten. Diesen 12 Patientinnen wurden Hautbiopsien entnommen und daraus Zellkulturen hergestellt. Für diese 12 Zellkulturlinien wurde mittels Koloniebildungstest die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ermittelt. Des Weiteren wurde die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen und residueller DNA-Doppelstrangbrüche bestimmt. Um die Verlässlichkeit der Methode zu überprüfen, wurde zunächst die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen für einen gesunden Spender untersucht.

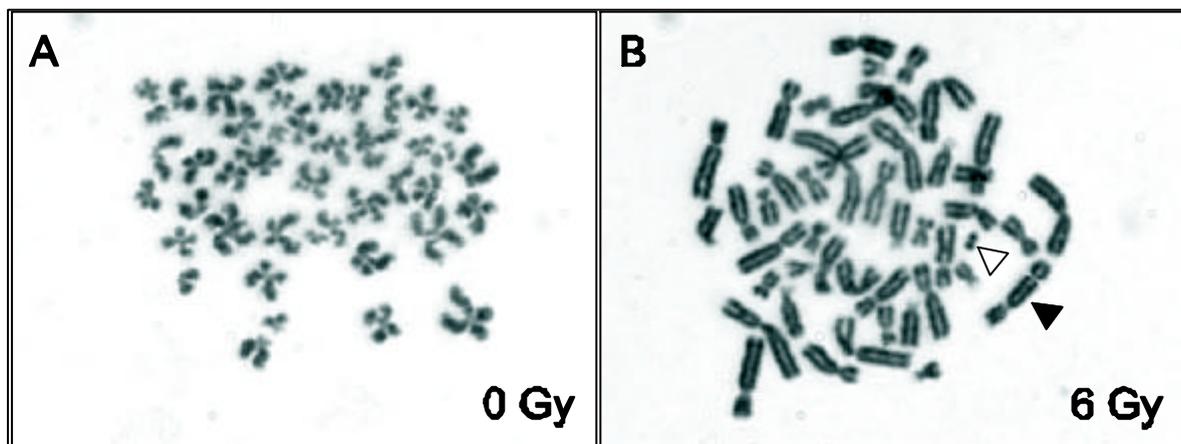


Abb. 3.1: Nachweis von Chromosomenaberrationen in humanen Fibroblasten mittels Metaphasentechnik. A) unbestrahlte Zelle; B) bestrahlte Zelle (offener Pfeil: azentrisches Fragment; solider Pfeil: dizentrisches Chromosom)

3.1. Nachweis strahleninduzierter Chromosomenaberrationen

Die Etablierung der Methode zum Nachweis der letalen Chromosomenaberrationen wurde an Hautfibroblasten einer der Nabelschnur entnommenen Biopsie durchgeführt. Abb. 3.1 A zeigt das Karyogramm eines unbestrahlten Fibroblasten. Mit 46 kondensierten Chromosomen zeigte sich der für Metaphase typische diploide Chromosomensatz. Jedes Chromosom wies eine Einschnürung im Bereich des Zentromers auf. Abb. 3.1 B zeigt einen mit 6 Gy bestrahlten Fibroblasten. Neben den 46 Chromosomen traten Chromosomen-

fragmente ohne Zentromer, die als azentrische Fragmente bezeichnet werden, und Chromosomen mit 2 Zentromeren, den sogenannten dizentrischen Chromosomen, auf. Azentrische Fragmente sind das Resultat interstitieller und terminaler Deletionen, dizentrischer Chromosomen und unvollständiger Austauschereignisse.

Tabelle 3.1: Chromosomenfragmente eines gesunden Spenders nach Bestrahlung

<i>Dosis</i>	<i>Anzahl der Zellen</i>	<i>Verteilung der CF</i>	<i>Mittelwert CF</i>	<i>ZAF pro Zelle</i>	<i>DC pro Zelle</i>	<i>LC pro Zelle</i>
0 Gy	50	45 bis 47	46.06 ± 0.06	0.00	0.00	0.00
2 Gy	50	45 bis 51	47.00 ± 0.18	0.94	0.04	0.98
4 Gy	50	46 bis 51	47.76 ± 0.18	1.70	0.14	1.84
6 Gy	50	44 bis 51	47.38 ± 0.20	1.32	0.34	1.66
8 Gy	45	44 bis 52	47.87 ± 0.25	1.81	0.33	2.14
10 Gy	51	44 bis 53	49.84 ± 0.32	3.78	0.84	4.62
12 Gy	9	47 bis 54	50.00 ± 0.65	3.94	0.78	4.72

CF = Chromosomenfragmente, *ZAF* = zusätzliche azentrische Fragmente, *DC* = dizentrische Chromosomen, *LC* = letale Chromosomenaberrationen

3.1.1. Häufigkeitsverteilung der Chromosomenfragmente nach Bestrahlung

Für die Bestimmung der Häufigkeitsverteilung von Chromosomenfragmenten nach Bestrahlung wurden Fibroblasten in der Plateauphase von 0 bis 12 Gy bestrahlt, für 14 h bei 37°C kultiviert (verzögertes Plattieren) und im Anschluss bei geringerer Dichte ausgesät. Die Neuaussaat bei geringerer Dichte wird als Stimulus eingesetzt, um die Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten zu lassen. Für die Präparation von Chromosomen in der Metaphase wurde den Fibroblasten 44 h nach Umsetzen ein Spindelfasergift hinzu gegeben. Das Spindelfasergift Colcemid verhindert, dass die Zellen die Mitose verlassen können und somit in der Äquatorialebene der Metaphase verbleiben. Die Inkubation mit Colcemid erfolgte für 16 h. Durch die sehr lange Colcemidinkubation bei niedriger Konzentration konnte eine mit zirka 5% ausreichende Menge an Fibroblasten in der Metaphase ange-reichert werden. Nach Abschluss der Colcemidinkubation wurden die sich in der Metaphase befindlichen Fibroblasten durch Abklopfen von den am Flaschenboden anhaftenden, sich in der Interphase befindlichen Fibroblasten getrennt, in neues Medium überführt, hypotonisch behandelt und fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen auf Objektträger getropft und mittels Giemsa-Farbstoff gefärbt. Es wurden jeweils 50 Zellen pro Dosispunkt ausgewertet und jeweils der Mittelwert berechnet. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Abb. 3.2 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Chromosomenfragmente in Abhängigkeit von der Dosis für die Fibroblastenlinie *HHNF1* eines gesunden Spenders. Für unbestrahlte Fibroblasten zeigte sich eine Häufigkeitsverteilung der Chromosomenfragmente von 44 bis 47 Fragmenten pro Zelle. Die Verteilung zeigt eine geringe Variation in der Anzahl der Chromosomenfragmente. Das Maximum liegt mit 41 Zellen bei 46 Chromosomenfragmenten. Im Mittel ergibt sich daraus ein Wert von 46.1 ± 0.1 Fragmenten pro Zelle, welcher dem diploiden Chromosomensatz humaner Zellen entspricht. Mit steigender Dosis verschob sich die Verteilung der Fragmente zu höheren Werten und umspannte dabei ein breiteres Spektrum. Nach einer Dosis von 2 Gy zeigten die Zellen eine Häufigkeitsverteilung von 45 bis 51 Chromosomenfragmenten mit einem Mittelwert von 47.0 ± 0.2 und einem Maximum von 20 Zellen mit 46 Chromosomenfragmenten. Die mit 4 Gy bestrahlten Zellen zeigten eine Häufigkeitsverteilung von 46 bis 51 Fragmenten pro Zelle mit einem Mittelwert 47.8 ± 0.2 . Das Maximum lag mit 15 Zellen bei 48 Chromosomenfragmenten pro Zelle. Nach einer Dosis von 6 Gy zeigte die Verteilung der Fragmente ein Spektrum von 44 bis 52 Fragmenten. Der Mittelwert von 47.4 ± 0.2 zeigte einen um 0.3 Fragmente niedrigeren Wert als nach einer Dosis von 4 Gy. Das Maximum lag mit 17 Zellen bei 47 Fragmenten. Nach einer Bestrahlung mit 8 Gy zeigte die Häufigkeitsverteilung Werte von 44 bis 52 Chromosomenfragmenten pro Zelle mit einem Mittelwert von 47.9 ± 0.3 . Das Maximum lag mit 12 Zellen bei 47 Chromosomenfragmenten. Die Bestrahlung mit einer Dosis von 10 Gy führte zu einem Spektrum der Verteilung von 44 bis 53 Chromosomen, einem Mittelwert von 49.8 ± 0.3 und einem Maximum von 11 Zellen bei 52 Chromosomenfragmenten. Nach einer Dosis von 12 Gy konnten nur 9 Zellen ausgewertet werden. Es zeigte sich eine sehr breite Häufigkeitsverteilung von 47 bis 54 Chromosomenfragmenten. Der Mittelwert zeigte mit 50.0 ± 0.7 den höchsten Wert. Das Maximum der Einzelwerte lag mit drei Zellen bei 49 Chromosomenfragmenten der neun ausgewerteten Zellen. Insgesamt zeigte sich mit zunehmender Dosis eine breitere Verteilung der Einzelwerte mit einer deutlichen Verschiebung zu höheren Werten.

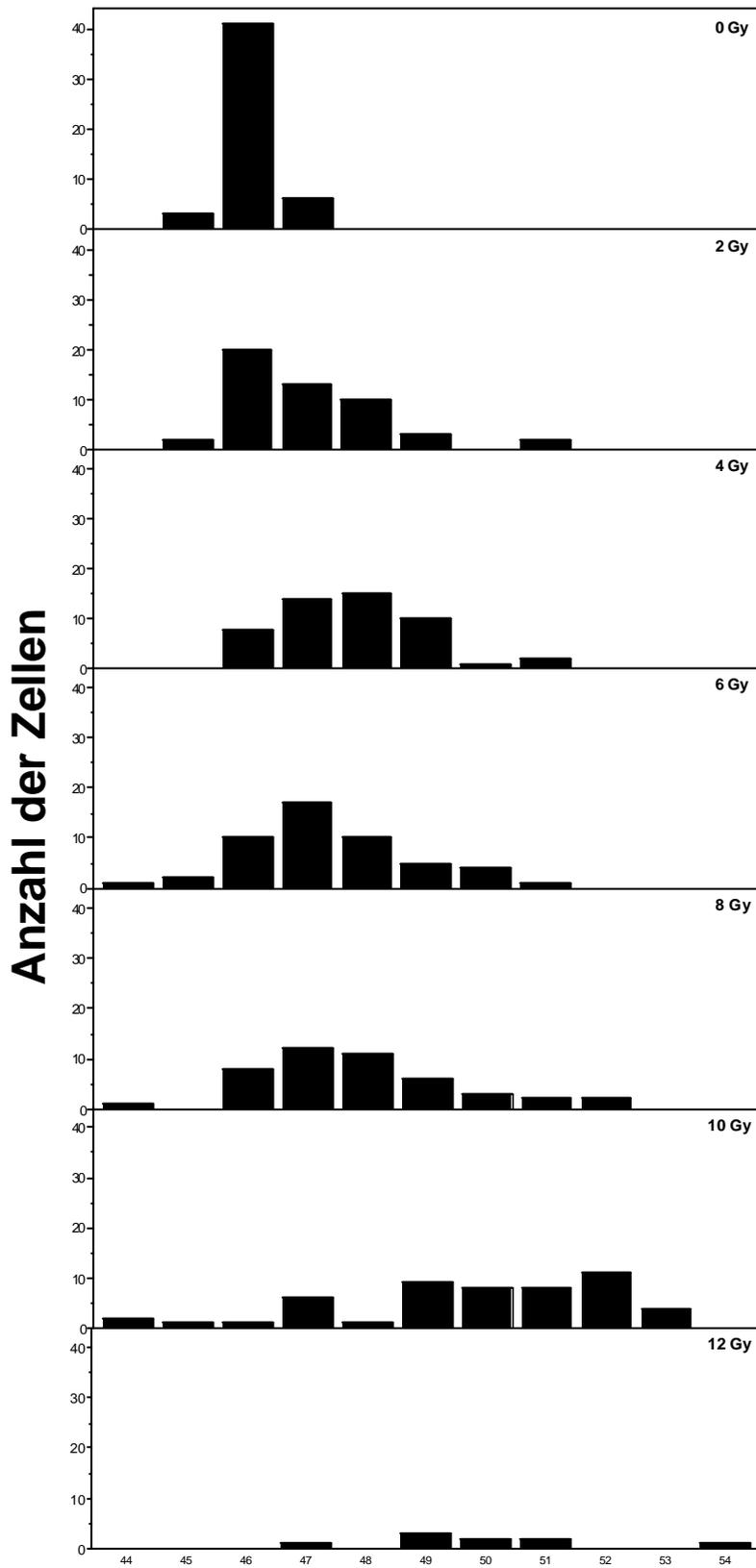


Abb. 3.2: Häufigkeitsverteilung der Chromosomenfragmente in Fibroblasten nach Bestrahlung. Die Zellen wurden in der G1-Phase bestrahlt und in der 1. Metaphase nach Bestrahlung untersucht. Pro Dosispunkt wurden jeweils 50 Zellen (bei 12 Gy nur 9 Zellen) ausgezählt und die Anzahl der Fragmente aufgetragen.

3.1.2. Strahleninduzierte Chromosomenaberrationen

Abb. 3.3 zeigt die Zahl zusätzlicher azentrischer Fragmente und dizentrischer Chromosomen sowie deren Summe, die als letale Chromosomenaberrationen bezeichnet werden, für die Fibroblastenlinie *HHNF1* eines gesunden Spenders (siehe auch Tabelle 3.1). Die Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente je Dosispunkt ergab sich aus den Mittelwerten der Verteilungen der Einzelwerte nach Subtraktion des Mittelwertes unbestrahlter Zellen. Bei einer Dosis von 2 Gy wurden 0.9 zusätzliche azentrische Fragmente ermittelt, bei 4 Gy 1.7, bei 6 Gy 1.3, bei 8 Gy 1.8, bei 10 Gy 3.8 und bei 12 Gy 3.9. Mittels nicht-linearer Regressionsanalyse konnte ein linear-quadratischer Anstieg mit der Dosis für die Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente beschrieben werden.

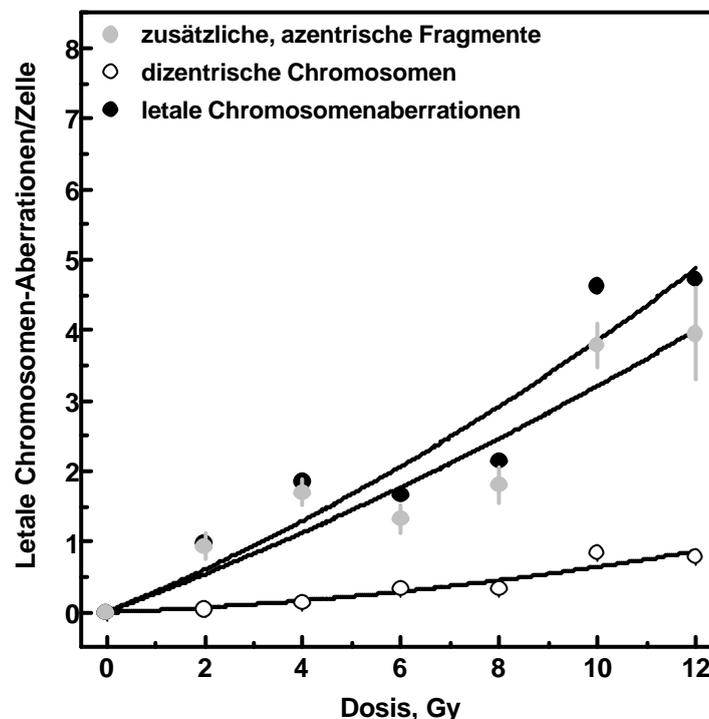


Abb. 3.3: Anzahl der zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmente, dizentrischen Chromosomen und letalen Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit von der Röntgendosis für eine humane Fibroblasten-Linie. Die Zahl der Chromosomenfragmente bestrahlter Fibroblasten ergab sich durch Subtraktion der Werte für unbestrahlte Zellen. Die Daten wurden mittels nicht-linearer Regression angepasst.

Ein linear-quadratischer Anstieg mit der Dosis konnte ebenfalls für die Anzahl dizentrischer Chromosomen (Tabelle 3.1) bestimmt werden. Im Vergleich zur Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente fiel der Anstieg allerdings deutlich geringer aus. So wurden bei einer Dosis von 0 Gy keine dizentrischen Chromosomen, bei 2 Gy nur zwei (0.04/Zelle),

bei 4 Gy sieben (0.14/Zelle), bei 6 Gy 17 (0.34/Zelle) und bei 8 Gy 15 (0.33/Zelle) dizentrische Chromosomen in den jeweils ausgezählten Zellen bestimmt. Deutlich höhere Werte zeigten sich bei den Dosen 10 und 12 Gy mit 42 in 50 Zellen (0.84/Zelle) und sieben in 9 Zellen (0.78/Zelle). Es wurde kein Ringchromosom bestimmt.

Die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen ergab sich durch Addition der Werte aller Chromosomenaberrationen, die zu einem azentrischen Fragment führen. In dieser Untersuchung handelte es sich dabei um zusätzliche azentrische Fragmente aus terminalen und interstitiellen Deletionen sowie dizentrischen Chromosomen. Es zeigte sich ein linear-quadratischer Anstieg mit der Dosis. Die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen wurde von der Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente dominiert.

3.1.3. Intraindividuelle Variation der Chromosomenaberrationen

Abb. 3.4 zeigt die Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente, dizentrischer Chromosomen sowie deren Summe, die letalen Chromosomenaberrationen für zwei unabhängige Experimente (Abb. 3.4 A und B) mit der Fibroblastenlinie *HHNF1*. Die Zellen wurden im Abstand von zwei Wochen unter gleichen Bedingungen kultiviert, synchronisiert, bestrahlt und präpariert. Für jeden Dosispunkt wurden in beiden Experimenten jeweils 50 Zellen verschlüsselt ausgezählt und die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen, zusätzlicher azentrischer Fragmente und dizentrischer Chromosomen gegen die Dosis aufgetragen.

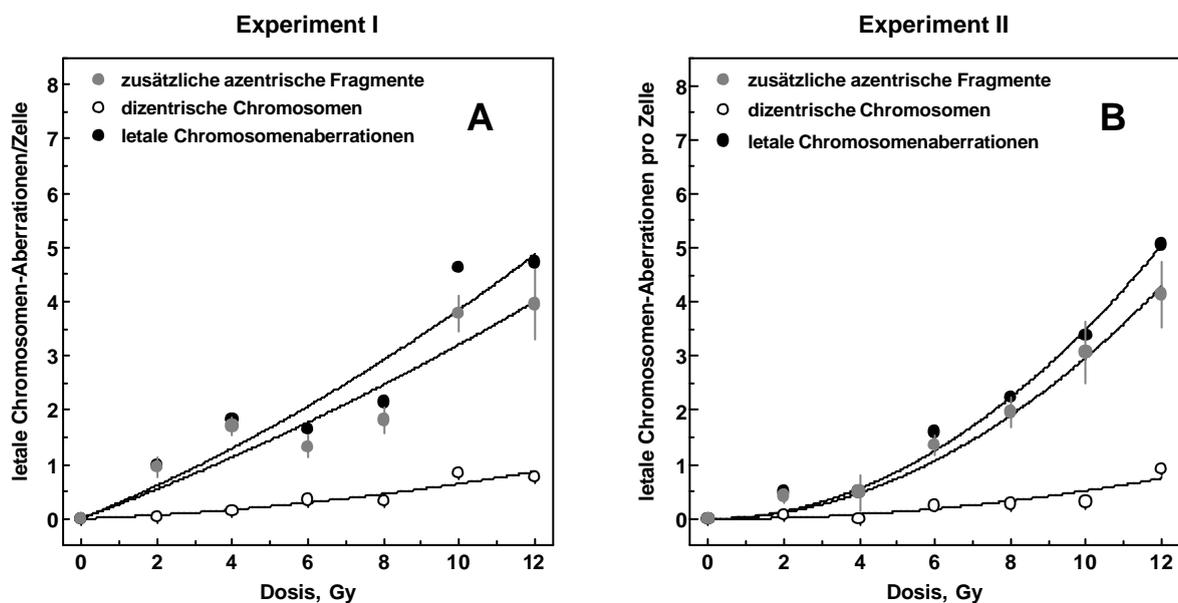


Abb. 3.4: Anzahl der zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmente, dizentrischen Chromosomen und letalen Chromosomenaberrationen zweier unabhängiger Experimente (I und II) für die Fibroblastenlinie *HHNF1* in Abhängigkeit von der Dosis. Die beiden Experimente wurden im Abstand von 2 Wochen durchgeführt. Die Daten wurden mittels nicht-linearer Regression angepasst.

Es zeigte sich in beiden Experimenten ein linear-quadratischer Anstieg der zusätzlichen azentrischen Fragmente, der dizentrischen Chromosomen und der letalen Chromosomenaberrationen mit der Dosis für die humane Fibroblastenlinie *HHNF1*. Dabei zeigte sich eine nur geringe Schwankung zwischen den beiden Experimenten, die bei den Dosispunkten 2, 4 und 10 Gy im Vergleich zu den Dosispunkten 6, 8 und 12 Gy ausgeprägter war. Letztere wiesen eine geringfügige Variation zwischen den beiden Einzelwerten auf. Bezogen auf die Werte bei 6 Gy ergab sich ein Variationskoeffizient von 3%.

3.1.4. Einfluss des Plattierens auf die Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen

Abb. 3.5 zeigt die Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente, dizentrischer Chromosomen sowie deren Summe, die als letale Chromosomenaberrationen bezeichnet werden, nach sofortigem (Abb. 3.5 A) und verzögertem (Abb. 3.5 B) Plattieren in Abhängigkeit von der Dosis für die Fibroblastenlinie *HHNF1*. Die Fibroblasten wurden in der Plateauphase mit 0 bis 12 Gy bestrahlt und entweder direkt nach Bestrahlung (sofortiges Plattieren) oder nach einer Inkubation von 14 h bei 37°C (verzögertes Plattieren) bei geringerer Dichte ausgesät. Das verzögerte Plattieren gibt den bestrahlten Zellen Zeit für die Reparatur von DNA-Schäden. Die während dieser Inkubationszeit behobenen DNA-Schäden werden als subletale DNA-Schäden bezeichnet. Für die Präparation von Chromosomen in der Metaphase wurde den Fibroblastenkulturen 44 h nach Umsetzen Colcemid hinzu gegeben. Die Kulturen wurden für weitere 16 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die sich in der Metaphase befindlichen Fibroblasten durch Abklopfen angereichert, in neues Medium überführt, hypotonisch behandelt und fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen auf Objektträger getropft und mittels Giemsa-Farbstoff gefärbt. Es wurden jeweils 50 Zellen pro Dosispunkt ausgewertet und der Mittelwert bestimmt.

Bei sofortigem Plattieren zeigte sich ein steilerer linear-quadratischer Anstieg mit der Dosis im Vergleich zum verzögertem Plattieren in der Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente für die Fibroblastenlinie *HHNF1*. Dieser Unterschied war geringfügig bei einer Dosis von 2 Gy mit 0.38 bei sofortigem und 0.42 zusätzlichen azentrischen Fragmenten bei verzögertem Plattieren. Bei einer Dosis von 4 Gy zeigte sich eine um den Faktor 2 erhöhte Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente bei sofortigem Plattieren im Vergleich zu verzögertem Plattieren, mit 0.9 und 0.49. Für die Dosen 6, 8, 10 und 12 Gy konnte jeweils eine höhere Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente bei sofortigem im Vergleich zu verzögertem Plattieren mit 2.43 zu 1.36, 3.72 zu 1.97, 4.17 zu 3.07 und 7.26 zu 4.13 festgestellt werden.

Im Gegensatz zu der Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente konnte kein genereller Unterschied in der Anzahl dizentrischer Chromosomen festgestellt werden. So zeigten sich bei sofortigem Plattieren mehr dizentrische Chromosomen bei den Dosen 4, 8 und 10 Gy, mit 0.03 zu 0, 0.89 zu 0.27 und 0.41 zu 0.31. Dagegen zeigten sich bei den Dosen 2, 6 und 12 Gy geringere Werte bei sofortigem im Vergleich zu verzögertem Plattieren mit 0.03 zu 0.08, 0.1 zu 0.24 und 0.62 zu 0.92 dizentrischen Chromosomen.

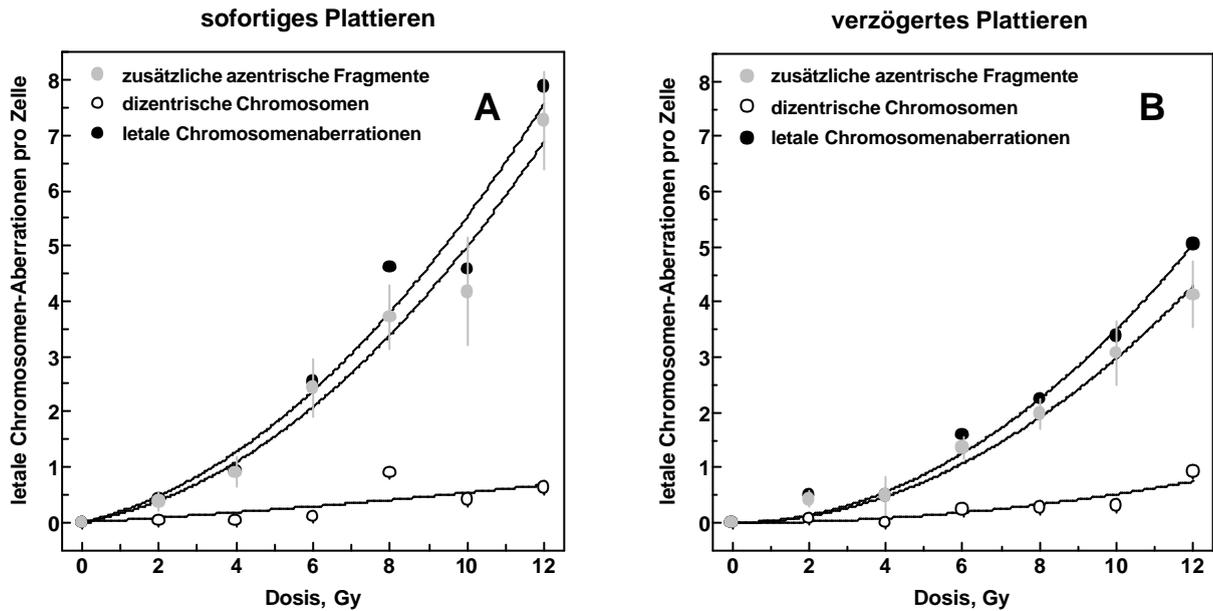


Abb. 3.5: Anzahl der zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmente, dizentrischen Chromosomen und letalen Chromosomenaberrationen nach sofortigem und verzögertem Plattieren für die Fibroblastenlinie *HhNF1* in Abhängigkeit von der Dosis. Die Zellen wurden bestrahlt und sofort oder 14 h nach Bestrahlung umgesetzt und in der ersten Metaphase nach Bestrahlung untersucht. Die Anpassung der Daten erfolgte mittels nicht-linearer Regression.

Ein steilerer linear-quadratischer Anstieg bei sofortigem Plattieren konnte ebenfalls für die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen bestimmt werden, der in erster Linie von der Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente dominiert wurde. So zeigte sich bei einer Dosis von 2 Gy noch ein sehr geringer Unterschied bei sofortigem zu verzögertem Plattieren mit 0.4 zu 0.5 letalen Chromosomenaberrationen. Dagegen konnte bei einer Dosis von 4 Gy bei sofortigem Plattieren gegenüber verzögertem Plattieren eine um etwa den Faktor 2 erhöhte Anzahl letaler Chromosomenaberrationen mit 0.9 zu 0.5 bestimmt werden. Für die Dosen 6, 8, 10 und 12 Gy konnte bei sofortigem Plattieren im Vergleich zu verzögertem Plattieren jeweils eine höhere Anzahl letaler Chromosomenaberrationen bestimmt werden, mit 2.5 zu 1.6 bei 6 Gy, 4.6 zu 2.2 bei 8 Gy, 4.6 zu 3.4 bei 10 Gy und Gy 7.9 zu 5.1 bei 12 Gy. Die Berechnung des linear-quadratischen Anstiegs mit der Formel

$Y = aD + bD^2$ zeigte, dass der Anstieg bei sofortigem Plattieren durch den Faktor $b = 0.055$ und nach verzögertem Plattieren durch den Faktor $b = 0.035$ bestimmt wurde. Ab einer Dosis von 6 Gy konnte im Vergleich zu unbestrahlten Zellen zweifelsfrei ein deutlich abweichender Wert für die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen festgestellt werden. Aus diesem Grunde wurden die folgenden Untersuchungen nur für eine Dosis von 6 Gy durchgeführt.

3.2. Interindividuelle Variation der letalen Chromosomenaberrationen

Ziel der Untersuchung war es, zu klären, ob sich die Untersuchung letaler Chromosomenaberrationen, wie sie mittels der Metaphasen-Technik bestimmt wurden, eignet, Fibroblastenlinien von Brustkrebspatientinnen mit unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit voneinander abzugrenzen. Es wurde daher für Fibroblastenlinien von 12 Brustkrebspatientinnen die Gesamtzahl letaler Chromosomenaberrationen bestimmt.

Abb. 3.6 A–C zeigt die Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente, dizentrischer Chromosomen und letaler Chromosomenaberrationen nach sofortigem (schwarze Balken) und verzögertem (graue Balken) Plattieren für Fibroblastenlinien von 12 Brustkrebspatientinnen (AF01–AF12) bei einer Dosis von 6 Gy. Als Kontrolle diente die Fibroblastenlinie *HHNF1* eines gesunden Spenders. Die Fibroblasten wurden in der Plateauphase mit 0 und 6 Gy bestrahlt und entweder direkt nach Bestrahlung (sofortiges Plattieren) oder nach einer Inkubation von 14 h bei 37°C (verzögertes Plattieren) bei geringerer Dichte ausgesät. 44 h nach dem Umsetzen wurden die Zellen nach Zugabe von Colcemid für weitere 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen hypotonisch behandelt, fixiert, auf Objektträger getropft und gefärbt. Die Anzahl der Chromosomenfragmente und dizentrischer Chromosomen wurde für 50 Zellen ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dabei ergab sich die Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente aus der Differenz unbestrahlter und mit 6 Gy bestrahlter Zellen. Die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen (Abb. 3.6 C) ergab sich aus der Summe der zusätzlichen azentrischen Fragmente (Abb. 3.6 A) und der dizentrischen Chromosomen (Abb. 3.6 B).

Abb. 3.6 A zeigt die Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente für die Fibroblastenlinien eines gesunden Spenders und 12 Brustkrebspatientinnen nach einer Dosis von 6 Gy bei sofortigem und verzögertem Plattieren. Für die Fibroblastenlinie des gesunden Spen-

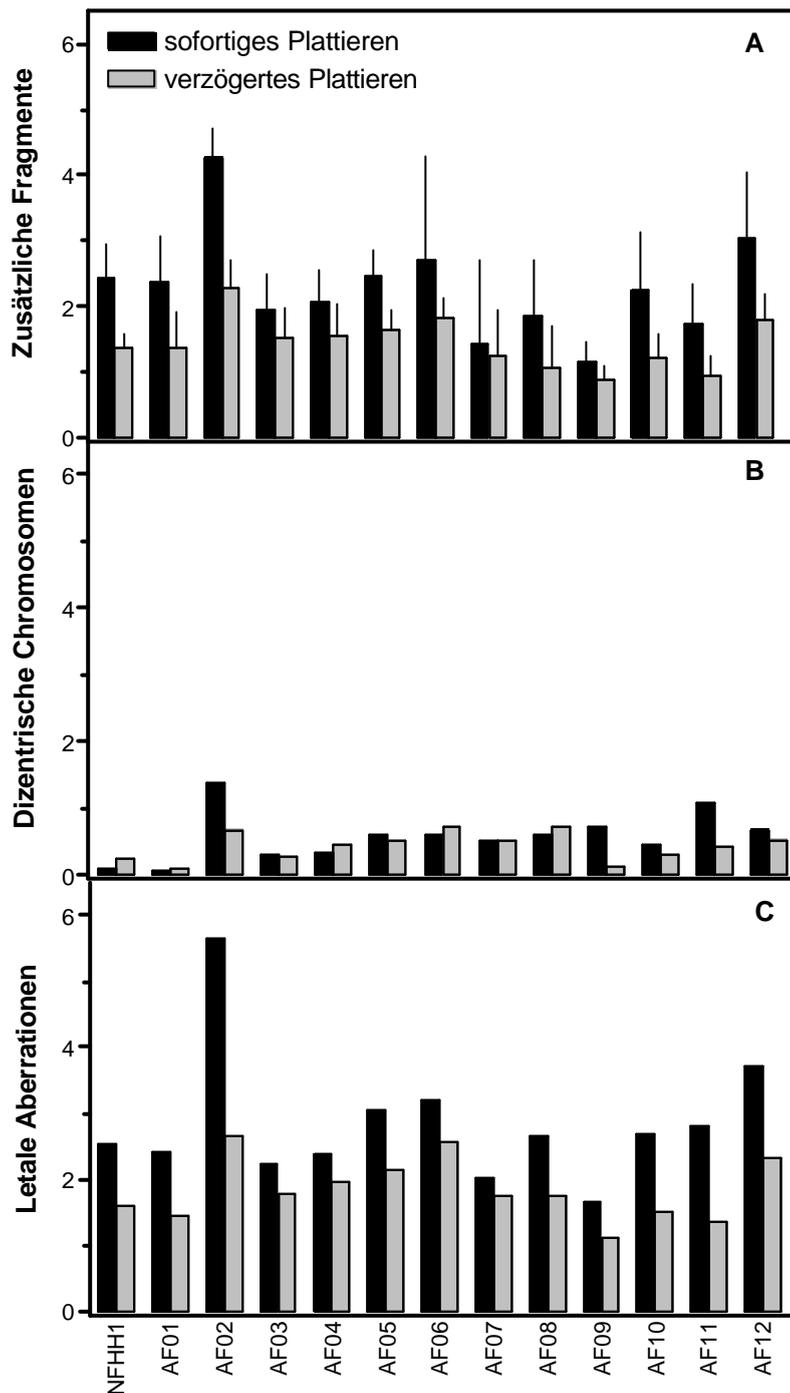


Abb. 3.6: Anzahl der zusätzlichen azentrischen Fragmente, dizentrischen Chromosomen und letalen Chromosomenaberrationen für Fibroblastenlinien von 12 Brustkrebspatientinnen und einem gesunden Spender. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt und sofort (schwarze Balken) oder nach 48 h (graue Balken) plattiert. Es wurden jeweils 50 Zellen ausgewertet, der Mittelwert gebildet und die Anzahl unbestrahlter Zellen subtrahiert.

ders wurden 2.43 ± 0.51 zusätzliche azentrische Fragmente bei sofortigem und 1.36 ± 0.2 bei verzögertem Plattieren bestimmt. Für die 12 Fibroblastenlinien der Brustkrebspatientinnen bildeten Werte mit einem Spektrum von 1.15 bis 4.27 zusätzlichen azentrischen Fragmenten mit 1.15 ± 0.3 für *AF09*, 1.42 ± 1.28 für *AF07*, 1.73 ± 0.6 für *AF11*, 1.85 ± 0.86 für *AF08*, 1.95 ± 0.55 für *AF03*, 2.06 ± 0.46 für *AF04*, 2.24 ± 0.9 für *AF10*, 2.37 ± 0.71 für *AF01*, 2.46 ± 0.4 für *AF05*, 2.7 ± 1.6 für *AF06*, 3.04 ± 1.01 für *AF12* und 4.27 ± 0.45 für *AF02* bei sofortigem Plattieren. Bei verzögertem Plattieren zeigte sich ein Spektrum der Werte von 0.88 bis 2.27 zusätzlichen azentrischen Fragmenten mit 0.88 ± 0.2 für *AF09*, 0.94 ± 0.33 für *AF11*, 1.06 ± 0.63 für *AF08*, 1.21 ± 0.36 für *AF10*, 1.24 ± 0.71 für *AF07*, 1.35 ± 0.57 für *AF01*, 1.52 ± 0.45 für *AF03*, 1.0 ± 0.48 für *AF04*, 1.63 ± 0.32 für *AF05*, 1.79 ± 0.39 für *AF12*, 1.83 ± 0.3 für *AF06* und 2.27 ± 0.43 für *AF02*.

Es zeigte sich keine deutliche Abweichung der Werte von Brustkrebspatientinnen und gesundem Spender. Auffällig war, dass die Werte sowohl nach sofortigem als auch nach verzögertem Plattieren für die Linie *AF02* gegenüber den anderen deutlich erhöht, die der Linien *AF09* und *AF11* dagegen deutlich verringert waren. Vergleicht man die Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente von sofortigem mit verzögertem Plattieren, so fällt auf, dass in allen untersuchten Fibroblastenlinien eine Reduktion der zusätzlichen azentrischen Fragmente von sofortigem zu verzögertem Plattieren mit einem sehr unterschiedlichen Ausmaß zu beobachten war. So zeigte sich für die Fibroblastenlinie des gesunden Spenders eine Reduktion um 1.07 zusätzliche azentrische Fragmente, für die Fibroblastenlinien *AF02* um 2.0, *AF12* um 1.25, *AF10* um 1.03, *AF01* um 1.02, *AF06* um 0.87, *AF05* um 0.83, *AF08* und *AF11* um 0.79, *AF04* um 0.52, *AF03* um 0.43, *AF09* um 0.27 und *AF07* nur um 0.18 zusätzliche azentrische Fragmente.

Insgesamt zeigte sich für alle Fibroblastenlinien eine Abnahme der zusätzlichen azentrischen Fragmente von sofortigem zu verzögertem Plattieren mit durchschnittlich 0.7 Fragmenten pro Zelle, wobei die größte Abnahme bei der Zelllinie *AF02* und nur eine sehr geringe bei der Zelllinie *AF07* beobachtet wurde.

Abb. 3.6 B zeigt die Anzahl dizentrischer Chromosomen für die Fibroblastenlinien eines gesunden Spenders und 12 Brustkrebspatientinnen nach einer Dosis von 6 Gy bei sofortigem und verzögertem Plattieren. Es zeigte sich eine deutlich geringere Anzahl dizentrischer Chromosomen im Vergleich zur Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente, sowohl nach sofortigem als auch nach verzögertem Plattieren. Die Fibroblastenlinie des gesunden Spenders zeigte bei verzögertem im Vergleich zu sofortigem Plattieren einen höhe-

ren Wert mit 0.24 zu 0.1 dizentrischen Chromosomen. Bei den Fibroblastenlinien der 12 Brustkrebspatientinnen zeigte die Linie *AF02* mit 1.38 die höchste Anzahl dizentrischer Chromosomen, *AF11* zeigte 1.07, *AF08* 0.82, *AF12* 0.67, *AF05* und *AF07* 0.6, *AF06* und *AF09* 0.5, *AF10* 0.44, *AF04* 0.33 und *AF03* 0.29. Die Linie *AF01* zeigte mit 0.06 die geringste Anzahl dizentrischer Chromosomen bei sofortigem Plattieren. Bei verzögertem Plattieren zeigte die Linie *AF06* und *AF08* mit 0.73 die höchste Anzahl dizentrischer Chromosomen, *AF02* 0.67, *AF12* 0.52, *AF05* und *AF07* 0.5, *AF04* 0.45, *AF11* 0.43, *AF10* 0.3, *AF03* 0.27, *AF09* 0.22 und *AF01* 0.1 dizentrische Chromosomen.

Es konnte keine generelle Veränderung in der Anzahl dizentrischer Chromosomen von sofortigem zu verzögertem Plattieren in den einzelnen Zelllinien beobachtet werden. So zeigten sechs der untersuchten Linien eine Abnahme von sofortigem zu verzögertem Plattieren, wobei die Linie *AF02* die stärkste Reduktion um 0.71 zeigte. *AF11* zeigte eine Reduktion um 0.67, *AF09* um 0.6, *AF10* um 0.14, *AF05* um 0.1 und *AF03* um 0.02. Die Linie *AF07* zeigte keinen Unterschied von sofortigem zu verzögertem Plattieren. Ein Anstieg von sofortigem zu verzögertem Plattieren konnte in den Linien *AF01* um 0.14, *AF04* um 0.12, *AF06* und *AF08* um 0.13 und *AF12* um 0.15 ermittelt werden.

Abb. 3.6 C zeigt die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen für die Fibroblastenlinien eines gesunden Spenders und 12 Brustkrebspatientinnen bei einer Dosis von 6 Gy nach sofortigem und verzögertem Plattieren. Für die Fibroblastenlinie des gesunden Spenders konnten nach sofortigem Plattieren 2.53 letale Chromosomenaberrationen pro Zelle ermittelt werden. Die Linien der 12 Brustkrebspatientinnen zeigten Werte zwischen 5.67 und 1.87 letalen Chromosomenaberrationen mit dem höchsten Wert von 5.67 für die Zelllinie *AF02*. *AF12* zeigte 3.71 letale Chromosomenaberrationen, *AF06* 3.2, *AF05* 3.06, *AF11* 2.8, *AF10* 2.68, *AF08* 2.45, *AF04* 2.39, *AF01* 2.37, *AF03* 2.24, *AF07* 2.02 und *AF09* zeigte mit 1.87 letalen Chromosomenaberrationen den niedrigsten Wert nach sofortigem Plattieren.

Nach verzögertem Plattieren zeigte die Linie des gesunden Spenders 1.6 letale Chromosomenaberrationen pro Zelle. Die Linien der 12 Brustkrebspatientinnen zeigten Werte zwischen 2.67 und 1.1. Die Linie *AF02* wies dabei mit 2.67 letalen Chromosomenaberrationen den höchsten Wert auf. *AF06* zeigte 2.56 letale Chromosomenaberrationen, *AF12* 2.31, *AF05* 2.13, *AF04* 1.97, *AF03* 1.79, *AF08* 1.76, *AF07* 1.74, *AF10* 1.51, *AF01* 1.45, *AF11* 1.37 und die Linie *AF09* wies mit 1.1 letalen Chromosomenaberrationen den niedrigsten Wert nach verzögertem Plattieren auf.

Für die Fibroblastenlinie des gesunden Spenders zeigte sich gegenüber dem sofortigen

Plattieren beim verzögerten Plattieren eine Reduktion der letalen Chromosomenaberrationen um 0.93 pro Zelle. Eine ähnliche Reduktion der letalen Chromosomenaberrationen konnte ebenfalls für die 12 Linien der Brustkrebspatientinnen gezeigt werden, wobei einige eine deutlich höhere, andere eine schwächere Reduktion aufwiesen. So konnte für die Linie *AF02* die stärkste Reduktion mit einem Wert von 2.98 bestimmt werden, während sich eine nur geringfügige Reduktion von 0.28 für die Linie *AF07* zeigte. Die Linie *AF04* zeigte eine Reduktion um 0.42 von sofortigem zu verzögertem Plattieren, *AF03* zeigte 0.45, *AF09* 0.55, *AF06* 0.64, *AF08* 0.89, *AF05* 0.93, *AF01* 0.98, *AF10* 1.17, *AF12* 1.4 und *AF11* 1.43.

Es wurde in allen Linien eine Reduktion der letalen Chromosomenaberrationen von sofortigem zu verzögertem Plattieren beobachtet, die hauptsächlich auf die Reduktion der zusätzlichen azentrischen Fragmente zurückzuführen war.

3.3. Letale Chromosomenaberrationen und residuelle DNA-Doppelstrangbrüche

Untersuchungen mit Agenzien, die ausschließlich DNA-Doppelstrangbrüche erzeugen, konnten indirekt zeigen, dass der DNA-Doppelstrangbruch die auslösende Vorläuferläsion für eine Chromosomenaberration ist. Um zu überprüfen, ob eine Beziehung zwischen nicht-reparierten DNA-Doppelstrangbrüchen 24 h nach Bestrahlung und letalen Chromosomenaberrationen besteht, wurde die Anzahl der nach 24 h verbliebenen (residuellen) DNA-Doppelstrangbrüche für die Fibroblastenlinien von 12 Brustkrebspatientinnen und einem gesunden Spender bestimmt. Die Zellen wurden mit einer Dosis von 100 Gy bestrahlt, nach 24 h bei 37°C trypsiniert, zentrifugiert, für 16 h bei 37°C lysiert und über einen Zeitraum von 40 h einer elektrophoretischen Auftrennung nach Größe unterzogen. Der Anteil an ausgewanderter, d. h. geschädigter DNA wurde densitometrisch ausgewertet und in Gy-Äquivalente umgerechnet.

Abb. 3.7 zeigt die Beziehung zwischen residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen und letalen Chromosomenaberrationen für Fibroblastenlinien von 12 Brustkrebspatientinnen und einen gesunden Spender. Für jede Zelllinie wurde die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen bei 6 Gy nach verzögertem Plattieren gegen die Anzahl residueller DNA-Doppelstrangbrüche bei 100 Gy, ausgedrückt als Gy-Äquivalenten, aufgetragen (siehe auch Tabelle 3.2).

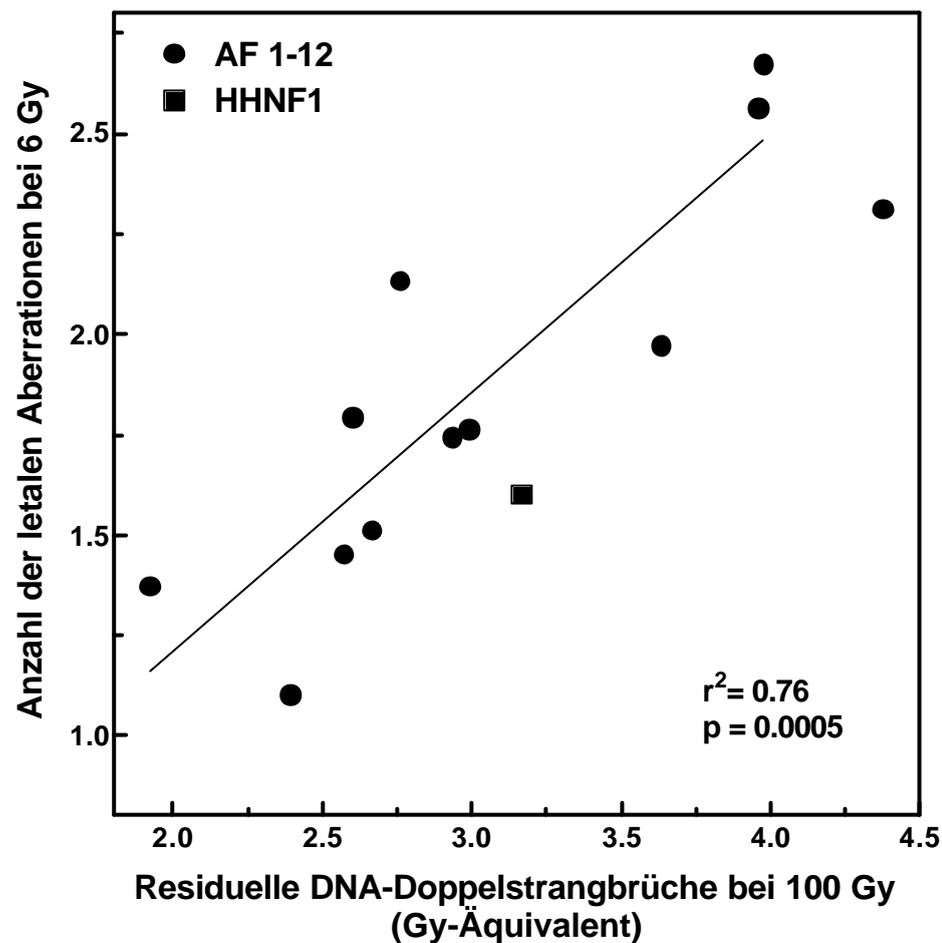


Abb. 3.7: Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen und residuellen DNA-Doppelstrangbrüche von Fibroblasten-Linien von 12 Brustkrebspatientinnen (*AF1-12*) und einem gesunden Spender (*HHNF1*). Die Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen bei 6 Gy nach verzögertem Plattieren wurde gegen die Anzahl der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche bei 100 Gy, ausgedrückt in Gy-Äquivalenten, aufgetragen. Die Daten wurden mittels linearer Regression angepasst.

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen letalen Chromosomenaberrationen bei 6 Gy und residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen bei 100 Gy mit $r^2 = 0.76$ und $p = 0.0005$. So zeigten Zelllinien mit einer niedrigen Anzahl letaler Chromosomenaberrationen ebenfalls eine niedrige Anzahl residueller Doppelstrangbrüche und umgekehrt. Die Variation der Einzelwerte zeigte für beide Parameter einen ähnlichen Streubereich von 1.1 bis 2.67 um einen Faktor 2.4 für die letalen Chromosomenaberrationen und 1.93 bis 3.98 um einen Faktor 2.1 für die residuellen DNA-Doppelstrangbrüche. Die Korrelation der beiden Parameter legt nahe, dass eine niedrige Anzahl letaler Chromosomenaberrationen genau dann auftritt, wenn nach einer extensiven Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ebenfalls nur eine niedrige Anzahl verbleibt.

3.4. Beziehung zwischen letalen Chromosomenaberrationen und Zellinaktivierung

Um zu überprüfen, ob die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen ein Maß für die Strahlenempfindlichkeit der Fibroblasten und damit auch ein Indikator für die individuelle Strahlenempfindlichkeit von Patientinnen sein kann, wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Zahl letaler Chromosomenaberrationen und der zellulären Strahlenempfindlichkeit, wie sie mittels Kolonietest bei sofortigem und verzögertem Plattieren bestimmt wurde, bestand.

Tabelle 3.2: Chromosomenaberrationen, residuelle DNA-Doppelstrangbrüche und zelluläres Überleben

Zelllinie	DSBR bei 100 Gy	sofortiges Plattieren		verzögertes Plattieren	
	Gy-Äquivalent	CA (6 Gy)	ÜR (6 Gy)	CA (6 Gy)	ÜR (6 Gy)
AF01	2.57	2.43	0.0073	1.45	0.024
AF02	3.98	3.65	0.0018	2.67	0.003
AF03	2.61	2.24	0.0038	1.79	0.029
AF04	3.64	2.39	0.0049	1.97	0.032
AF05	2.76	3.06	0.0030	2.13	0.023
AF06	3.96	3.20	0.0029	2.56	0.013
AF07	2.94	2.02	0.0014	1.74	0.019
AF08	3.00	2.65	0.0037	1.76	0.027
AF09	2.40	1.65	0.0089	1.10	0.054
AF10	2.67	2.68	0.0015	1.51	0.023
AF11	1.93	2.43	0.0059	1.37	0.047
AF12	4.38	3.71	0.0056	2.31	0.068
HHNF1	3.17	2.53	0.0049	1.60	0.031

DSBR = Doppelstrangbrüche, ÜR = Überlebensrate, AF01–12 = Linien von Brustkrebspatientinnen, HHNF1 = Linie eines gesunden Spenders.

Zu diesem Zweck wurde die Überlebensrate nach Bestrahlung mit 6 Gy bei sofortigem und verzögertem Plattieren für die Fibroblastenlinien von 12 Brustkrebspatientinnen und einem gesunden Spender bestimmt (Tabelle 3.2) und mit der Zahl letaler Chromosomenaberrationen bei gleicher Dosis verglichen (Abb. 3.8). Es zeigte sich eine sehr gute Korrelation unter den Bedingungen des verzögerten Plattierens für die beiden Parameter mit $r^2 = 0.69$ und $p = 0.0008$, wobei eine niedrige Überlebensrate mit einer hohen Zahl letaler Aberrationen korrelierte und umgekehrt. Dieses Ergebnis beinhaltet, dass für die untersuchten Fibroblastenlinien die Gesamtzahl letaler Aberrationen einen hervorragenden Indi-

kator für zelluläre Strahlenempfindlichkeit darstellt. Unter den Bedingungen des sofortigen Plattierens ergab sich ein anderes Bild. So konnte unter diesen Bedingungen keine Korrelation zwischen den beiden Parametern gefunden werden ($r^2 = 0.19$ und $p = 0.16$). Das bedeutet, dass unter den Bedingungen des sofortigen Plattierens die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen kein aussagekräftiger Indikator für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ist.

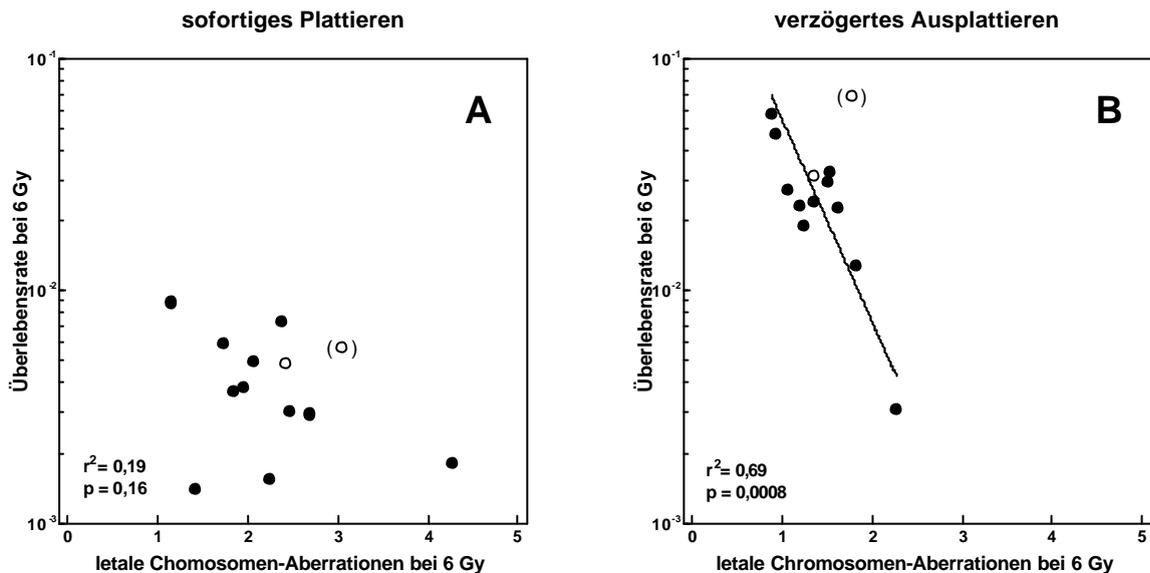


Abb. 3.8: Beziehung von zellulärer Überlebensrate und letalen Chromosomenaberrationen nach sofortigem und verzögertem Plattieren für Fibroblastenlinien von 12 Brustkrebspatientinnen und einem gesunden Spender. Nach Bestrahlung mit 6 Gy in der Plateauphase wurden die Zellen entweder sofort (A) oder 14 h nach Bestrahlung (B) plattiert und mit der konventionellen Metaphasentechnik oder dem Koloniebildungstest untersucht. Die Daten wurden mittels nicht-linearer Regression analysiert.

3.5. Bedeutung des Tumorsuppressorproteins TP53

Zellen können nach ionisierender Bestrahlung durch den mitotischen Zelltod, die Apoptose und die terminale Differenzierung inaktiviert werden. Welche Form des Zelltods herbeigeführt wird, ist vom Zelltyp abhängig. So sterben Zellen des Darmepithels und des hämatopoetischen Systems durch Apoptose oder den mitotischen Zelltod. Fibroblasten werden dagegen durch die Differenzierung oder den mitotischen Zelltod inaktiviert.

Der mitotische Zelltod wird durch letale Chromosomenaberrationen ausgelöst. Durch einen DNA-Doppelstrangbruch kommt es bei jeder letalen Chromosomenaberration zu mindestens einem azentrischen Fragment. Um dieses azentrische Fragment bildet sich in der auf die Bestrahlung folgenden Zytokinese der Mitose eine separate Membran und es entsteht ein sogenannter Mikrokern. Die auf diesem Fragment sich befindliche genetische

Information geht beiden Tochterzellen verloren und die durch diese Gene kodierten Proteine verdünnen sich im Verlauf der nächsten Zellteilungen. Die kontinuierliche Reduktion der essentiellen Proteine über mehrere Zellteilungen bewirkt schlussendlich das Absterben der Zellen.

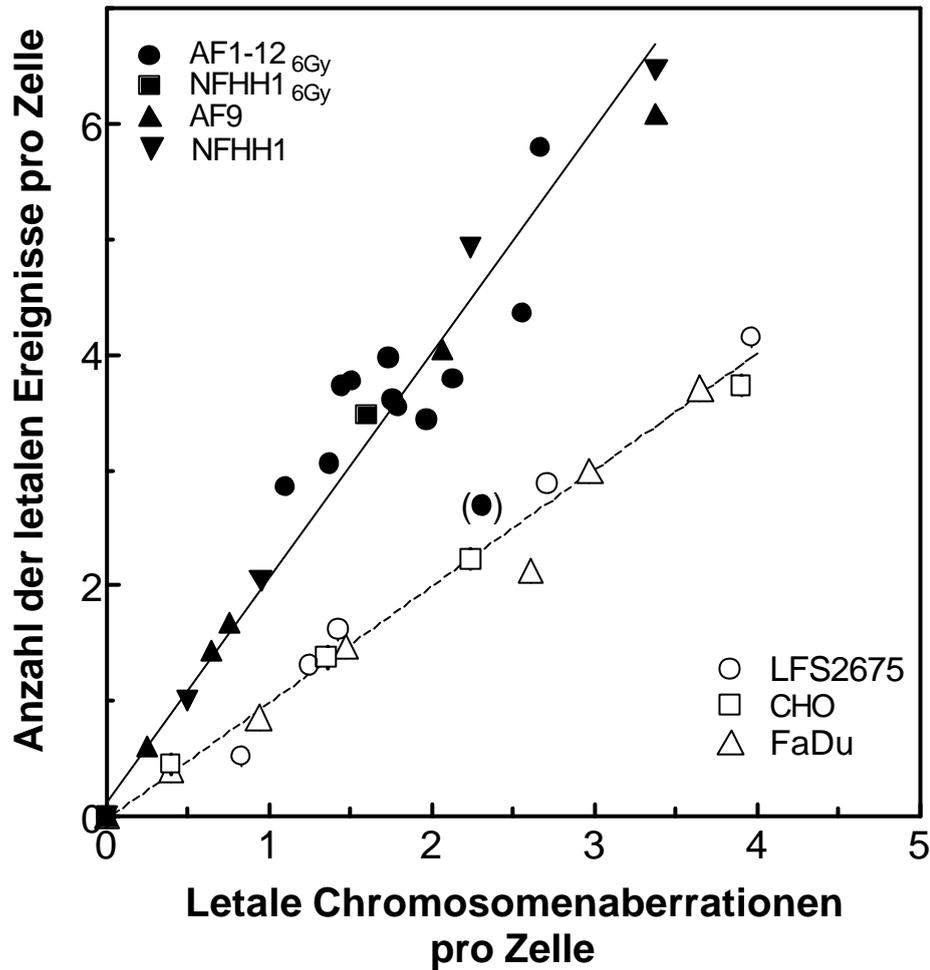


Abb. 3.9: Beziehung von letalen Ereignissen und Chromosomenaberrationen. Die Anzahl der letalen Ereignisse wurde aus dem negativen Logarithmus der Überlebensrate berechnet und gegen die Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen für humane Fibroblasten (offene Symbole) und Zelllinien mit inaktivem *TP53* (geschlossene Symbole) aufgetragen. Die Daten wurden mittels linearer Regression berechnet.

Zellen, die sich nicht in der Proliferation befinden, können folglich nicht mitotisch absterben. In humanen Fibroblasten, die zu zirka 70% nicht proliferieren, können die Zellen durch einen vollständigen, irreversiblen Zellzyklusarrest in der G1-Phase mit nachfolgender vorzeitiger Differenzierung inaktiviert werden. Diese Inaktivierung kann auch durch ionisierende Bestrahlung ausgelöst werden. Man nimmt an, dass der Prozess durch die durch Bestrahlung entstandenen DNA-Doppelstrangbrüche eingeleitet wird, indem es zu einer vom Tumorsuppressorprotein *TP53* abhängigen, vermehrten Expression des

p21-Proteins kommt, welches durch Hemmung von *CyclinD/Cdk4* und *CyclinE/Cdk2* die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins und die Freisetzung des *E2F*-Proteins verhindert. Die Transaktivierung der Signalkaskade wird verhindert, die Zellen können nicht mehr von der G1-Phase in die S-Phase übergehen und leiten die Differenzierung ein.

Um die Gewichtung von mitotischem Zelltod und Differenzierung für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit in Fibroblasten zu überprüfen, wurde für Zelllinien mit intaktem und mutiertem *TP53* die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen mit der Anzahl letaler Ereignisse verglichen. Die Anzahl letaler Ereignisse wurde aus dem negativen Logarithmus der Überlebensrate nach ionisierender Bestrahlung berechnet. Diese Kalkulation basiert auf der Annahme, dass ein letales Ereignis zufällig auftritt und im Falle von 100 bestrahlten Zellen aufgrund der randomisierten Verteilung im Mittel 37 der Zellen inaktiviert werden. Das bedeutet, dass bei einem letalen Ereignis die Überlebensrate von 100 auf 37% reduziert wird (Jung 1998).

Abb. 3.9 zeigt die Beziehung zwischen letalen Ereignissen und letalen Chromosomenaberrationen für Zelllinien mit intaktem und mutiertem *TP53* unter den Bedingungen des verzögerten Plattierens. Für die Zelllinien mit intaktem *TP53* wurden die Daten der Fibroblastenlinien

AF01–12 aus Abb. 3.8 verwendet, erweitert durch Messungen der Zelllinien *AF09* und *HHNF1* über einen Dosisbereich von 0 bis 8 Gy. Für die Zelllinien ohne intaktes *TP53*-Gen wurden die Daten von den Linien *LFS2800*, *FaDu* und *CHO K1* nach Bestrahlungsdosen von 0 bis 12 Gy gewonnen. Aufgetragen wurde die Anzahl letaler Ereignisse, berechnet aus dem negativen Logarithmus der Überlebensrate wie sie mit dem Koloniebildungstest ermittelt wurde, gegen die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen bei gleicher Dosis.

Für die Zelllinien mit intaktem *TP53* zeigte sich ein linearer Anstieg letaler Chromosomenaberrationen mit einer Steigung von 2.0 ± 0.05 letalen Ereignissen pro Chromosomenaberration. Das bedeutet eine Rate von 2 : 1 letalen Ereignissen zu Chromosomenaberrationen und indiziert, dass nur die Hälfte der Zellen durch letale Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung unter verzögertem Plattieren abstirbt. Betrachtet man dagegen die Zelllinien mit einem Defekt im *TP53*-Gen, so zeigt sich eine völlig andere Beziehung von letalen Ereignissen zu letalen Chromosomenaberrationen. Für diese Zelllinien wird die Korrelation ebenfalls durch einen linearen Anstieg charakterisiert, aber mit einer Steigung von 1.01 ± 0.02 von letalem Ereignis zu letaler Chromosomenaberration. Dieses 1 : 1 Verhält-

nis demonstriert, dass für diese Zelllinien die Inaktivierung ausschließlich aus der Anzahl letaler Chromosomenaberrationen resultiert. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass in humanen Fibroblasten die Inaktivierung durch einen weiteren, eben den *TP53*-abhängigen Prozess der permanente G1-Arrest ausgelöst werden könnte.

4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob es in humanen Fibroblasten einen Zusammenhang zwischen letalen Chromosomenaberrationen und zellulärer Strahlenempfindlichkeit gibt. Dabei war es von besonderem Interesse, ob die letalen Chromosomenaberrationen das Resultat residueller DNA-Doppelstrangbrüche sind und ob das funktionelle Tumorsuppressorprotein *TP53* eine Bedeutung für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten hat. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde dabei über den Nachweis von letalen Chromosomenaberrationen *in vitro* bestrahlter Fibroblasten ermittelt und mit der Überlebensrate im Kolonietest verglichen. Die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen wurde mit der Anzahl der durch Pulsfeld-Gelelektrophorese ermittelten residuellen DNA-Doppelstrangbrüche verglichen. Die Bedeutung des Tumorsuppressorproteins *TP53* für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit wurde anhand von Messungen an Linien mit intaktem oder defektem *TP53* durchgeführt.

Durch den Vergleich mit dem Kolonietest konnte gezeigt werden, dass letale Chromosomenaberrationen humaner Fibroblasten unter verzögertem Plattieren sehr gut als Maß für die Strahlenempfindlichkeit genutzt werden können. Dieser Zusammenhang konnte dabei erstmals auf die Anzahl residueller DNA-Doppelstrangbrüche zurückgeführt werden. Es konnte in dieser Arbeit ebenfalls erstmalig gezeigt werden, dass für die individuelle Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten mit intaktem *TP53* nicht ausschließlich letale Chromosomenaberrationen sondern auch die *TP53*-abhängige terminale Differenzierung von großer Bedeutung ist.

4.1. Methodische Vorarbeiten

Die Zahl der Chromosomenaberrationen wurde für die Fibroblasten mittels konventioneller Metaphasen-Technik bestimmt (Abb. 3.1). Dafür wurden die Fibroblasten in der Plateauphase bestrahlt, nach Stimulation zur Proliferation in der ersten Metaphase angehalten und die Zahl letaler Chromosomenaberrationen lichtmikroskopisch bestimmt. Die Auswertung beschränkte sich dabei auf die Zahl letaler Chromosomenaberrationen, das bedeutet auf zusätzliche azentrische Fragmente sowie dizentrische Chromosomen. Bevor mit dem Vergleich mehrerer Linien begonnen werden konnte waren mehrere Etablierungsexperimente an einer Zelllinie notwendig. Diese Arbeiten wurden an der Linie *HHNF1* eines gesunden Spenders durchgeführt.

4.1.1. Letale Chromosomenaberrationen

Die Zahl der Chromosomenfragmente zeigte sowohl für unbestrahlte als auch für bestrahlte Fibroblasten eine Poissonverteilung, deren Mittelwert mit der Dosis zunahm (Abb.3.2 und 3.3). In unbestrahlten Fibroblasten lag die Anzahl der Chromosomenfragmente für die Fibroblastenlinie des Normalspenders bei 46.1 (Tabelle 3.1). Dies ergibt nach Abzug der Zahl von 46 Chromosomen für diploide humane Zellen einen Wert von 0.1 zusätzlichen azentrischen Fragmenten. O'Driscoll *et al.* wiesen 1998 ebenfalls nur bei 3% unbestrahlter Fibroblasten mittels Mikrokerntest eine leicht erhöhte Anzahl an spontanen Mikrokernen nach. Die gleiche Beobachtung machten Nachtrab *et al.* 1998 für unbestrahlte Hautfibroblasten von 27 Krebspatienten. Insgesamt kann daher festgestellt werden, dass in unbestrahlten Fibroblasten die Anzahl spontan auftretender letaler Chromosomenaberrationen nur sehr gering ist.

Die Anzahl dizentrischer Chromosomen nahm linear-quadratisch mit der Dosis zu. Es wurden im Mittel 0.34 dizentrische Chromosomen pro Zelle bei einer Dosis von 6 Gy gemessen (Abb. 3.3, Tabelle 3.1). Dieser Wert ist vergleichbar mit dem anderer Autoren. So wurde mit 0.4 dizentrischen Chromosomen ein sehr ähnlicher Wert von Virsik-Peuckert *et al.* (1997) und Borgmann *et al.* (2002) ermittelt. Cornforth und Bedford (1987) zeigten dagegen mit 0.8 dizentrischen Chromosomen einen deutlich höheren Wert.

Die durch Summierung dizentrischer Chromosomen und zusätzlicher azentrischer Fragmente erhaltene Anzahl letaler Chromosomenaberrationen nahm ebenfalls linear-quadratisch mit der Dosis zu (Abb. 3.3), wobei die Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente im Vergleich zu den dizentrischen Chromosomen deutlich erhöht war, bei einer Dosis von 6 Gy um das 9-fache. Ein entsprechendes Verhältnis von Chromosomenfragmenten zu dizentrischen Chromosomen wurde auch in anderen Arbeiten nachgewiesen (Cornforth und Bedford 1987, Virsik-Peuckert *et al.* 1997, Fabry *et al.* 1988, Bedford 1991, Nachtrab *et al.* 1998, Russell *et al.* 1995, Rave-Fränk *et al.* 2001). In einer sehr detaillierten Aufschlüsselung der zusätzlichen azentrischen Fragmente konnte von Cornforth und Bedford (1987) gezeigt werden, dass interstitielle Deletionen den Hauptanteil der zusätzlichen azentrischen Fragmente nach Bestrahlung repräsentieren und terminale Deletionen von untergeordneter Bedeutung sind.

Ein linear-quadratischer Anstieg der letalen Chromosomenaberrationen mit der Dosis konnte in allen vergleichbaren Arbeiten ermittelt werden (Tabelle 4.1). Es zeigte sich lediglich ein Unterschied in der Gewichtung von linearem zu quadratischem Anteil bei den

einzelnen Autoren (Cornforth und Bedford 1987, Virsik-Peuckert *et al.* 1997, Rave-Fränk *et al.* 2001).

Die Funktionen der linear-quadratischen Ausgleichskurven der Dosis-Effekt-Kurven folgen der Gleichung $Y = aD + bD^2$, wobei D die Funktionsvariable der Dosis ist, a der Funktionsparameter für den linearen Anteil und b der Funktionsparameter für den quadratischen Anteil (ip = sofortiges Plattieren, dp = verzögertes Plattieren).

Tabelle 4.1: Funktionsvariablen a und b der linear-quadratischen Dosis-Effekt-Kurven für letale Chromosomenaberrationen in humanen Fibroblasten

<i>Autor</i>	<i>Jahr</i>	<i>Zelllinie</i>	<i>Dosis (Gy)</i>	<i>Färbung</i>	<i>Platt.</i>	a (Gy^{-1})	b (Gy^{-2})
Dede	2003	<i>HHNF1</i>	0–12	Giernsa	dp	0.0547	0.02975
Cornforth <i>et al.</i>	1987	<i>AG1522</i>	0–12	Giernsa	dp	0.0805	0.01610
Dede	2003	<i>HHNF1</i>	0–12	Giernsa	ip	0.1616	0.03916
Rave-Fränk <i>et al.</i>	2001	<i>HSF-2</i>	0–4	Giernsa	ip	0.0600	0.03500

Die separate Auswertung zusätzlicher azentrischer Fragmente und dizentrischer Chromosomen der einzelnen Fibroblastenlinien zeigte keine Korrelation der beiden Aberrationstypen (Abb. 3.6). Das bedeutet, dass eine Fibroblastenlinie, die eine hohe Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente aufwies, nicht unbedingt eine hohe Anzahl dizentrischer Chromosomen zeigt. Bei der Untersuchung von Lymphozyten wurde dieses zuvor bereits von Borgmann *et al.* 2002 gezeigt. Eine fehlende Korrelation von Translokationen und dizentrischen Chromosomen konnte von Virsik-Peuckert *et al.* 1997 ebenfalls in humanen Fibroblasten gezeigt werden. Diese Befunde deuten insgesamt darauf hin, dass die verschiedenen Aberrationstypen durch voneinander unabhängige Prozesse entstehen.

4.1.2. Inter- und Intrainvariabilität

Für die Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit ist die Zuverlässigkeit der Methode von entscheidender Bedeutung. Um die methodischen und statistischen Schwankungen zu minimieren wurden pro Linie immer zwei unabhängige Experimente durchgeführt (Abb. 3.4), die nur geringfügige Unterschiede in der Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente und dizentrischer Chromosomen zeigten. So wies die intraindividuelle Variation bei einer Dosis von 6 Gy für die zusätzlichen azentrischen Fragmente die größte Variation mit einem Koeffizienten von 3% auf. Der Vergleich der zusätzlichen azentrischen Fragmente verschiedener Fibroblastenlinien zeigte dagegen eine deutlich höhere Variation mit 25% (Abb. 3.6). Das bedeutet, dass die Variation der Fibroblastenlinien

verschiedener Spenderinnen (Intervariabilität) deutlich höher war als die Variation der Fibroblastenlinien eines Spenders (Intravariabilität). Da in Fibroblasten die zusätzlichen azentrischen Fragmente zirka 90% der letalen Chromosomenaberrationen ausmachen, können die obigen Werte auch auf die Intra- und Intervariabilität aller letalen Chromosomenaberrationen übertragen werden.

Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass bei Untersuchungen von Patientenproben die interindividuelle Variation größer war als die intraindividuelle. O'Driscoll *et al.* fanden 1998 beim Nachweis von Chromosomenaberrationen mittels Mikrokerntest eine signifikant höhere Intervariabilität mit 62% gegenüber einer Intravariabilität mit 32%. Auch von Rudat *et al.* wurde 1997 beim Nachweis der Strahlenempfindlichkeit mit Hilfe des Kolonietests eine deutlich ($p < 0.001$) höhere Intervariabilität von 32% gegenüber einer Intravariabilität von 12% gemessen. Dass die Inter- gegenüber der Intravariabilität, mittels Chromosomenaberrationen bestimmt, deutlich höher ist, konnte auch für humane Lymphozyten in einer Reihe von Studien nachgewiesen werden (Floyd und Cassoni 1994, Slonina und Gasinska 1997, Scott *et al.* 1999).

4.1.3. Bedeutung des Plattierens auf letale Chromosomenaberrationen

Die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen wurde unter den Bedingungen des sofortigen Plattierens, direkt nach Bestrahlung, mit den letalen Chromosomenaberrationen unter den Bedingungen des verzögerten Plattierens, nach einer Inkubation von 14 h, verglichen. Dabei zeigte sich unter beiden Bedingungen ein linear-quadratischer Anstieg der Chromosomenaberrationen mit der Dosis, wobei der Anstieg unter den Bedingungen des verzögerten Plattierens deutlich niedriger war im Vergleich zum sofortigen Plattieren, mit einer Reduktion von im Mittel um 35%. Diese Abnahme ist ausschließlich auf die Reduktion zusätzlicher azentrischer Fragmente zurückzuführen. Eine Abnahme letaler Aberrationen von sofortigem zu verzögertem Plattieren um zirka 44% konnte ebenfalls von Cornforth und Goodwin (1991) beobachtet werden. Unter Verwendung anderer Untersuchungsmethoden zeigte sich auch bei anderen Autoren immer eine deutliche Abnahme von sofortigem zu verzögertem Plattieren (Azzam *et al.* 2000, Volkmer und Virsik-Peuckert 1990, Virsik-Peuckert *et al.* 1997, Greinert *et al.* 1996).

Das beobachtete Phänomen wird als "Reparatur der potentiell letalen DNA-Schäden" bezeichnet. Bei diesen DNA-Schäden handelt es sich um Defekte, die für die Zelle nur dann letal sind, wenn die Zelle unmittelbar nach Bestrahlung (sofortiges Plattieren) zur Proliferation gezwungen wird. Wird die Zelle in einem nicht-proliferierenden Zustand wie

der Plateauphase gehalten (verzögertes Plattieren), erhält sie Zeit zur Reparatur, ohne in die S-Phase einzutreten und ist fähig, diese DNA-Schäden zu beseitigen und die Wahrscheinlichkeit, dass die Zelle überlebt, erhöht sich.

Bezogen auf die hier präsentierten Ergebnisse bedeutet dies, dass alle untersuchten Fibroblastenlinien fähig waren, potentiell letale Chromosomenaberrationen zu reparieren und somit nach einer Reparaturzeit von 14 h eine deutlich reduzierte Anzahl aufwiesen.

4.2. Letale Chromosomenaberrationen und residuelle DNA-Doppelstrangbrüche

Die Anzahl residueller DNA-Doppelstrangbrüche, ausgedrückt in Gy-Äquivalenten bei einer Dosis von 100 Gy, wurde gegen die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen bei 6 Gy aufgetragen. Es zeigte sich eine signifikante Beziehung beider Parameter mit $r^2 = 0.76$ und $p = 0.0005$, wobei eine geringe Anzahl residueller DNA-Doppelstrangbrüche mit einer niedrigen Anzahl letaler Chromosomenaberrationen und umgekehrt korrelierte. Der Streubereich der Einzelwerte zeigte ebenfalls ein vergleichbares Spektrum von 1.1 bis 2.67 für die letalen Chromosomenaberrationen und 1.93 bis 3.98 für residuelle DNA-Doppelstrangbrüche.

Man geht davon aus, dass sich letale Chromosomenaberrationen aus DNA-Doppelstrangbrüchen entwickeln, falls diese nicht oder falsch-repariert werden (Eastham *et al.* 1999, Giaccia *et al.* 1992). Diese nicht oder falsch reparierten DNA-Doppelstrangbrüche werden auch als residuelle DNA-Doppelstrangbrüche bezeichnet. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung die Überlebensrate mit der Zahl der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche korreliert (Dikomey *et al.* 2003, Johansen *et al.* 1996, Kiltie *et al.* 1999, Lloyd *et al.* 1975, Lloyd *et al.* 1988, Natarajan *et al.* 1980, Obe *et al.* 1987). Die Beziehung von residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen und letalen Chromosomenaberrationen konnte allerdings bis jetzt nur indirekt gezeigt werden. Cornforth und Bedford beobachteten 1993, dass die Behandlung von Fibroblasten mit Restriktionsendonukleasen zu einer Fragmentierung von Chromosomen führte. Eine Inkubation mit Agenzien wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid und Senfgas, die primär nur Einzelstrangbrüche oder Basenschäden induzieren, bewirkte dagegen keine Chromosomenfragmentierung (Iliakis *et al.* 1992, Wlodek und Hittelman 1988). Die signifikante Korrelation letaler Chromosomenaberrationen und residueller DNA-Doppelstrangbrüche bestätigt diese Annahme. Allerdings sind Chromosomenaberrationen wie dizentrische Chromosomen möglicherweise das Resultat einer Fehlreparatur, da die Bruchpunkte zweier gebrochener Chromosomen nicht korrekt sondern mit einem Bruchstück des anderen Chromosoms verknüpft werden. Die

Befunde von Löbrich *et al.* (1998) und Rothkamm *et al.* (2001) weisen darauf ebenfalls hin. Sie zeigten, dass die Anzahl residueller DNA-Doppelstrangbrüche nicht nur das Resultat nicht-reparierter sondern auch von falsch-reparierter DNA-Doppelstrangbrüche sind.

4.3. Letale Chromosomenaberrationen und Zellinaktivierung in Fibroblastenlinien

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Zahl letaler Chromosomenaberrationen signifikant mit dem Zellüberleben unter den Bedingungen verzögerten Plattierens für Fibroblastenlinien von 12 Brustkrebspatientinnen und einem gesunden Spender korrelierte ($r^2 = 0.69$ und $p = 0.008$), jedoch nicht unter den Bedingungen des sofortigen Plattierens (Abb. 3.8). Die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen wurde nach sofortigem und verzögertem Plattieren gegen die Überlebensrate bei 6 Gy für 12 Fibroblastenlinien von Brustkrebspatientinnen und einem gesunden Spender aufgetragen. Es zeigte sich eine starke Streuung der Werte von 1.87 bis 5.67 bei sofortigem und von 1.1 bis 2.67 letalen Chromosomenaberrationen pro Zelle bei verzögertem Plattieren bei einer Dosis von 6 Gy.

Ein vergleichbar deutlichen Unterschied in der Anzahl letaler Chromosomenaberrationen von 0.49 bis 1.36 bei Fibroblastenlinien von Patientinnen konnte auch von Rave-Fränk *et al.* 2001 ermittelt werden. Kuhlmann fand 2003 für 8 Fibroblastenlinien von Patienten mit unterschiedlichen Reaktionen nach Strahlentherapie ebenfalls eine Streuung der Einzelwerte von 2.0 bis 3.0 mit einer signifikanten Korrelation von letalen Chromosomenaberrationen und Überlebensrate mit $p = 0.005$ unter den Bedingungen des verzögerten Plattierens. Eine ähnliche Korrelation wurde von Lara *et al.* 1996 für neun Fibroblastenlinien mit genetischen Defekten in verschiedenen DNA-Reparaturgenen gemessen. Auch von O'Driscoll *et al.* (1998) wurde beim Nachweis der Chromosomenschäden mit dem Mikrokerntest eine Korrelation mit der Überlebensrate ermittelt ($p = 0.014$). Eine signifikante Korrelation von residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen und Zellüberleben konnte ebenfalls unter den Bedingungen des verzögerten, nicht aber unter den Bedingungen des sofortigen Plattierens von Dikomey *et al.* (2000) gezeigt werden. Diese Daten indizieren, dass unter den Bedingungen des sofortigen Plattierens das zelluläre Überleben primär durch Prozesse bestimmt wird, die nicht im direkten Zusammenhang mit der Bildung letaler Chromosomenaberrationen stehen.

Zahlreiche Arbeiten weisen darauf hin, dass nach ionisierender Bestrahlung letale Chromosomenaberrationen letztendlich zum Verlust der Teilungsfähigkeit der Zellen führen (Burnet *et al.* 1992, Coco-Martin *et al.* 1999, Dewey *et al.* 1970). Mit zunehmender Dosis steigt die Zahl der letalen Aberrationen an und dementsprechend nimmt die Überle-

bensrate der Zellen ab. Auch die Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit, wie sie in Abhängigkeit vom Zellzyklus oder der Dosisrate gemessen werden, konnten auf Unterschiede in der Zahl der gebildeten letalen Aberrationen zurückgeführt werden (Dewey *et al.* 1971, Eastham *et al.* 2001).

Fasst man die Daten zusammen, so zeigt sich sehr deutlich, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen den residuellen Doppelstrangbrüchen, den letalen Chromosomenaberrationen und der Zellinaktivierung unter den Bedingungen des verzögerten Plattierens besteht: je mehr residuelle Doppelstrangbrüche in einer Zelle verbleiben, desto größer ist die Zahl letaler Aberrationen und damit letztendlich das Ausmaß der Inaktivierung.

4.4. Bedeutung der terminalen Differenzierung

Das bedeutsamste Ergebnis dieser Arbeit ist, dass für Fibroblastenlinien mit einem funktionellen *TP53* das Verhältnis von letalem Ereignis zu letaler Chromosomenaberration im Mittel 2 : 1 und für Zelllinien mit einem Defekt im *TP53* 1 : 1 betrug. Das bedeutet, dass bei einem intakten *TP53*-Gen nach ionisierender Bestrahlung nur die Hälfte der Zellen durch letale Chromosomenaberrationen inaktiviert wird. Die andere Hälfte der Inaktivierung scheint durch einen *TP53*-abhängigen Prozess, wahrscheinlich den permanenten G1-Arrest, ausgelöst zu werden. Der Apoptose, als weiteren möglichen Weg der Inaktivierung, wird in humanen Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung keine Bedeutung zugeordnet (Dikomey *et al.* 2003, Kasten-Pisula *et al.* 2005). Zellen mit einem Defekt im *TP53*-Gen können keinen permanenten G1-Arrest durchführen und sterben ausschließlich durch letale Chromosomenaberrationen. Dies führte in diesen Zellen zu einem 1 : 1 Verhältnis von letalem Ereignis zu letaler Chromosomenaberration (Abb. 3.9).

Bei einer Dosis von 6 Gy wird die Überlebensrate der Fibroblasten im Mittel auf 0.025 unter den Bedingungen des verzögerten Plattierens reduziert (Abb. 3.9). Wenn die Hälfte dieser Inaktivierung durch letale Chromosomenaberrationen ausgelöst wird und die andere durch den permanenten G1-Arrest, bedeutet dies für den permanenten G1-Arrest $0.025^{1/2} = 0.16$. Nach dieser Kalkulation $(1 - 0.16)$ würden 84% der Fibroblasten durch den permanenten G1-Arrest blockiert werden. Dieser kalkulierte Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie er für eine Dosis von 6 Gy von Di Leonardo *et al.* (1994) und Linke *et al.* (1997) mit 70–90% gemessen wurde.

Die in dieser Arbeit beschriebene 2 : 1 Rate für Fibroblasten steht im Gegensatz zu Daten von Cornforth und Bedford (1987), die eine 1 : 1 Rate für die Fibroblastenlinie AG 1522 bestimmten. Eine 1 : 1 Rate wurde auch in anderen Arbeiten ausschließlich für

Fibroblastenlinien mit einem Defekt im *TP53*-Gen gemessen (Lenardo *et al.* 1994, Boyle *et al.* 1999). Little *et al.* (1985) zeigten bei einer Dosis von 4 Gy keinen G1-Arrest für die Fibroblastenlinie *AG 1522*, sodass diese Fibroblastenlinie scheinbar einen Defekt im *TP53*- oder einem anderen in diese Signalkaskade involvierten Gen des permanenten G1-Arrests aufweist.

Bei genauerer Analyse der Daten fällt auf, dass die Fraktion der durch letale Chromosomenaberrationen inaktivierten Zellen für die einzelnen Fibroblastenlinien zwischen 35 und 65% variiert. Eine ähnliche Variation wird ebenfalls für den G1-Arrest angenommen und anhand weiterer Untersuchungen überprüft werden.

Es zeigte sich auch, dass bei sofortigem Plattieren der Anteil an Zellen, der durch den permanenten G1-Arrest inaktiviert wurde, deutlich höher war als bei Zellen nach verzögertem Plattieren (Azzam *et al.* 2000). Diese Beobachtung legt nahe, dass der Anteil an Zellen, der durch letale Chromosomenaberrationen inaktiviert wurde, zirka 50% und somit beim sofortigen Plattieren im Vergleich zum verzögerten Plattieren deutlich geringer ist. Dies könnte auch erklären, warum die Korrelation zwischen letalen Chromosomenaberrationen unter sofortigem und verzögertem Plattieren so unterschiedlich ausfällt. Während sich unter den Bedingungen des verzögerten Plattierens eine signifikante Korrelation mit der Anzahl letaler Chromosomenaberrationen zeigt, lässt sich unter den Bedingungen des sofortigen Plattierens allenfalls ein Trend der beiden Parameter erkennen.

Fasst man die Daten zusammen, so konnte gezeigt werden, dass die eine Hälfte der Zellen durch letale Chromosomenaberrationen und die andere Hälfte durch den permanenten G1-Arrest nach Bestrahlung unter den Bedingungen des verzögerten Plattierens inaktiviert wird, wobei der letztere Prozess von dem Tumorsuppressorprotein *TP53* abhängig ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Chromosomenaberrationen für die zelluläre Inaktivierung von humanen Fibroblasten untersucht. Die Untersuchung wurde an 12 Fibroblastenlinien von Brustkrebspatientinnen sowie einer Linie von einem gesunden Spender durchgeführt. Diese Linien verfügen jeweils über normales *TP53*. Zum Vergleich wurden die Untersuchungen ebenfalls an 3 Zelllinien mit einem defekten *TP53*-Gen durchgeführt. Für die einzelnen Zelllinien wurde die zelluläre Inaktivierung sowohl nach sofortigem als auch nach verzögertem Plattieren bestimmt und mit der jeweiligen Anzahl an letalen Chromosomenaberrationen verglichen. Die Zahl der letalen Chromosomenaberrationen wurde anhand der Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente und dizentrischer Chromosomen bestimmt. Die Zahl der Chromosomenschäden wurde ebenfalls mit den residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen, wie sie mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese ermittelt, verglichen. Insgesamt wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die Summe letaler Chromosomenaberrationen, bestehend aus zusätzlichen azentrischen Fragmenten und dizentrischen Chromosomen, steigt linear-quadratisch mit der Dosis an (Abb. 3.3–3.5), wobei zirka 90% der letalen Chromosomenaberrationen auf terminale oder interstitielle Fragmente und nur 10% auf dizentrische Chromosomen zurückzuführen sind.
2. Die Intravariabilität dieser Aberrationen ist durch einen Variationskoeffizienten von im Mittel 3% gekennzeichnet (Abb. 3.4).
3. Zwischen den 12 verschiedenen Fibroblastenlinien variiert bei einer Bestrahlung mit 6 Gy die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen von 1.1 bis 2.7 (Abb. 3.8). Dies entspricht einem Variationskoeffizienten von 13% und ist damit um den Faktor vier höher als die intraindividuelle Variation mit 3%.
4. Bei verzögertem Plattieren nach Bestrahlung ist die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen deutlich niedriger als bei sofortigem Plattieren (Abb. 3.5 und 3.6).
5. Die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen korreliert mit der Anzahl residueller DNA-Doppelstrangbrüche ($r^2 = 0.76$ und $p = 0.0005$), wobei eine Fibroblastenlinie mit einer hohen Anzahl an letalen Chromosomenaberrationen ebenfalls eine erhöhte Anzahl an residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen zeigt und umgekehrt (Abb. 3.7).

6. Für die 13 Fibroblastenlinien korreliert bei einer Dosis von 6 Gy die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen signifikant mit der Überlebensrate ($r^2 = 0.69$ und $p = 0.0008$). Diese Korrelation wird aber nur für verzögertes, aber nicht für sofortiges Plattieren gefunden ($r^2 = 0.19$ und $p = 0.16$).
7. Für Fibroblastenlinien mit intaktem *TP53* zeigt sich eine lineare Beziehung zwischen der Zahl der letalen Ereignisse und den letalen Chromosomenaberrationen, wobei im Mittel auf eine letale Aberration zwei letale Ereignisse kommen.
8. Für die Zelllinien mit einem defekten *TP53*-Gen zeigt sich ebenfalls eine lineare Beziehung zwischen den letalen Ereignissen und den letalen Aberrationen, wobei aber im Mittel auf eine Aberration genau ein letales Ereignis kommt. Diese Beobachtung zeigt damit erstmalig, dass bei Fibroblasten mit intaktem *TP53*-Gen nur die Hälfte der Inaktivierung nach Bestrahlung auf letale Chromosomenaberrationen zurückzuführen ist, während für die andere Hälfte ein anderer Mechanismus – möglicherweise der permanente G1-Arrest – verantwortlich ist. Dahingegen werden Zellen mit einem inaktiven *TP53*-Gen nach Bestrahlung ausschließlich durch letale Chromosomenaberrationen inaktiviert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Azzam EI, de Toledo SM, Waker AJ, Little JB (2000) High and low fluences of alpha-particles induced in a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts. *Cancer Res.* 60:2623–2631
- Bayreuther K, Rodemann HP, Francz PI, Maier K (1988) Differentiation of fibroblast stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 10:115–130
- Bayreuther K, Francz PI, Gogol J, Hapke C, Maier M, Meinrath HG (1991) Differentiation of primary and secondary fibroblasts in cell culture systems. *Mutat. Res.* 256:233–244
- Bayreuther K, Francz PI, Gogol J, Kontermann K (1992) Terminal differentiation, aging apoptosis, and spontaneous transformation in fibroblast stem cell systems in vivo and in vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:167–179
- Bedford JS (1991) Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 21:1457–1469
- Bentzen SM, Overgaard J (1994) Patient-to-patient variability in the expression of radiation-induced normal tissue injury. *Sem. Radiat. Oncol.* 4:68–80
- Borgmann K, Röper B, El-Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dörk T, Alberti W, Dikomey E, Dahm-Daphi J (2002) Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair and chromosome aberrations. *Radiother. Oncol.* 64:141–152
- Boyle JM, Greaves MJ, Camplejohn RS, Birch JM, Roberts SA, Varley JM (1999). Radiation-induced G1 arrest is not defective in fibroblasts from Li-Fraumeni families without TP53-mutations. *Brit. J. Cancer* 79:1657–1664
- Brock WA, Tucker SL, Geara FB, Tersson I, Wike J, Nyman J, Peters LJ Peters (1995). Fibroblast Radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients tested for breast cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32:1371–1379
- Budach, W (1997) Genetische Prädisposition und Strahlenempfindlichkeit von Tumoren. *Strahlenther. Onkol.* 173:469–479
- Bumann J, Santo-Höltje L, Löffler H, Bamberg M, Rodemann HP (1995). Radiation-induced alterations of the proliferation dynamics of human skin fibroblasts after repeated irradiation in the subtherapeutic dose range. *Strahlenther. Onkol.* 171:35–41
- Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH (1998) Describing patients normal tissue reactions concerning the possibility of individualised radiotherapy dose prescription based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. *Int. J. Cancer* 79:606–613
- Burnet NG, Nyman J, Teresson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH (1994) The relationship between cellular Radiat. sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules. *Radiother. Oncol.* 33:228–238

- Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH (1992) Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in vitro cellular radiation sensitivity. *The Lancet* 339:1570–1571
- Coco-Martin JM, Mooren E, Ottenheim C, Burrill W, Nunez MI, Sprong D, Bartelink H, Begg AC (1999) Potential of radiation-induced chromosome aberrations to predict radiosensitivity in human tumour cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 75:1161–1168
- Coco-Martin JM, Smeets MF, M. Poggensee, E. Mooren E, Hofland I, van den Brug M, Ottenheim C, Bartelink H, Begg AC (1994) Use of fluorescence in situ hybridization to measure chromosome aberrations as a predictor of radiosensitivity in human tumour cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 66:297–307
- Cornforth MN, Bedford JS (1987) A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat. Res.* 111:385–405
- Cornforth MN, Goodwin EH (1991) Transmission of radiation-induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts. *Radiat. Res.* 126:210–217
- Cornforth MN, Bedford JS (1993) Ionizing radiation damage in its early development in chromosomes. *Adv. Radiat. Biol.* 17:423–496
- Cornforth MN (2001) Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements combinatorial painting. *Radiat. Res.* 155:643–659
- Dahm-Daphi J, Dikomey E (1996) Rejoining of DNA double-strand breaks in X-irradiated CHO cells studied by constant and graded-field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* 69:615–621
- Dewey WC, Furman SC, Miller HH (1970) Comparison of lethality and chromosomal damage induced by X-rays in synchronized chinese hamster cells in vitro. *Radiat. Res.* 43:561–581
- Dewey WC, Miller HH, Leeper DB (1971) Chromosomal aberrations and mortality of X-irradiated mammalian cells: emphasis on repair. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68:667–671
- Dikomey E, Brammer I, Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J (2000) Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 46:481–490
- Dikomey E, Borgmann K, Jung H, Peacock JH (2003) Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 56:1194–1200
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8:2540–2551
- Dörr W (1997) Three a's of repopulation during fractionated irradiation of squamous epithelia: asymmetry loss, acceleration of stem-cell divisions and abortive divisions. *Int. J. Radiat. Biol.* 72:635–643

- Dörr W, Hendry JH (2001) Consequential late effects in normal tissues. *Radiother. Oncol.* 61:223–231
- Eastham AM, Marples B, Kiltie AE, Orton CJ, West CML (1999) Fibroblast radiosensitivity measured using the comet DNA-damage assay correlates with clonogenic survival parameters. *Brit. J. Cancer* 79:1366–1371
- Eastham AM, Atkinson J, West CML (2001). Relationships between clonogenic cell survival, DNA damage and chromosomal radiosensitivity in nine human cervix carcinoma cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 77:295–302
- Fabry LA, Leonard A, Decat G, Deknudt G, Jacquet P, Leonhard ED (1988) Chromosome aberrations in mixed cultures of in vitro irradiated and unirradiated human lymphocytes. *Strahlenther. Onkol.* 164:108–110
- Floyd DN, Cassoni AM (1994) Intrinsic radiosensitivity of adult and core blood lymphocytes as determined by the micronucleus assay. *Eur. J. Cancer* 30:615–620
- Fomina J, Darroudi F, Boei JJ, Natarajan AT (2000) Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.* 76:807–813
- Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA (1993) Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 27:1173–1179
- Giaccia AJ, Schwartz J, Brown JM (1992) The use of asymmetric-field inversion gel electrophoresis to predict tumor cell radiosensitivity. *Radiother. Oncol.* 24:231–238
- Greiner R, Volkmer B, Virsik-Peuckert RP, Harder D (1996) Comparative study of the repair kinetics of chromosomal aberrations and DNA strand breaks in proliferating quiescent CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 70:33–43
- Hart RM, Kimler BF, Evans RG, Park CH (1987) Radiotherapeutic management of medulloblastoma in a pediatric patient with ataxia teleangiectasia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13:1237–1240
- Holthusen H (1936) Erfahrungen über die Verträglichkeitsgrenze für Röntgenstrahlen und deren Nutzanwendung zur Verhütung von Schäden. *Strahlentherapie* 57:254–268
- Iliakis GE, Pantelias GE, Okayasu R, Blakely WF (1992) Induction by H₂O₂ of DNA and interphase chromosome damage in plateau-phase chinese hamster ovary cells. *Radiat. Res.* 131:192–203
- Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M (1994) Evidence for a positive correlation between in vitro radiosensitivity of normal human skin fibroblasts and the occurrence of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 66:407–412
- Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M (1996) Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, teleangiectasia, and skin erythema after radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 40:101–109

- Jones LA, Scott D, Cowan R, Roberts SA (1995) Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after radiotherapy: chromosome aberrations after low dose rate irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 67:519–528
- Jung H (1998) Mammography and radiation risk. *Rofo. Fortschr. Geb. Rontgenstr. Neuen. Bildge. Verfahr.* 1998 169:336–343
- Kasten-Pisula U, Tastan H, Dikomey E (2005) Huge differences in cellular radiosensitivity are due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *Int. J. Radiat. Biol.* 81:409–419
- Kiltie AE, Ryan AJ, Swindell R, Barber JBP, West CML, Magee B, Hendry JH (1999) A correlation between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. *Radiother. Oncol.* 51:55–65
- Kuhlmann C (2003) Chromosomenaberrationen als Indikator der individuellen Strahlenempfindlichkeit zur Prädiktion von Normalgewebsreaktionen nach Strahlentherapie. *Med. Dissertation. Universität Hamburg*
- Kreienberg RV, Möbius V, Alt D (2002) Management des Mammakarzinoms. Ein Leitfaden für die Praxis. 2. Auflage Springer. Berlin Heidelberg New York
- Lara PC, Russell NS, Smolders IJH, Bartelink H, Begg AC, Coco-Martin JM (1996) Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: Relationship with cell survival and collagen production. *Int. J. Radiat. Biol.* 70:683–692
- Linke SP, Clarkin KC, Wahl GM (1997) p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to γ -irradiation. *Cancer Res.* 57:1171–1179
- Lloyd DC, Purrott RJ, Dolphin GW, Bolton D, Edwards AA, Corp MJ (1975) The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 28:75–90
- Lloyd DC, Edwards AA, Leonard A, Deknudt G, Natarajan A, Obe G, Palitti F, Tanzarella C, Tawn EJ (1988) Frequencies of chromosomal aberrations induced in human blood lymphocytes by low doses of X-rays. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 53:49–55
- Löbrich M, Cooper PK, Rydberg B (1998) Joining of correct and incorrect DNA ends at double-strand breaks produced by high-linear energy transfer radiation in human fibroblasts. *Radiat. Res.* 150:619–626
- Nachtrab U, Oppitz U, Flentje M, Stopper H (1998) Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998 73:279–287
- Natarajan AT, Obe G, van Zeeland AA, Palitti F, Meijers M, Verdegaal-Immerzeel EA (1980) Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. II. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle. *Mutat. Res.* 69:293–305

- Neubauer S, Dunst J, Gebhart E. (1997) The impact of complex chromosomal rearrangements on the detection of radiosensitivity in cancer patients. *Radiother. Oncol.* 43:189–915
- Neubauer S, Gebhart E, Schmitt G, Birkenhake S, Dunst J (1996) Is chromosome in situ suppression (CISS) hybridization suited as a predictive test for intrinsic radiosensitivity in cancer patients? *Int. J. Oncol.* 8:707–712
- Obe G, Johannes C, Vasudev V, Kasper P, Lamprecht I (1987) Induction of chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary cells by the restriction endonuclease Dra I: dose-effect relationships and effect of substitution of chromosomal DNA with bromodeoxyuridine. *Mutat. Res.* 192:263–269
- O'Driscoll MC, Scott D, Orton CJ, Kiltie AE, Davidson SE, Hunter RD, West CM. (1998) Radiation-induced micronuclei in human fibroblasts in relation to clonogenic radiosensitivity. *Br. J. Cancer.* 78:1559–1563
- Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M, Stopper H (1999) Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions. *Strahlenther. Onkol.* 175:341–346
- Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J (2000) Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 55:173–178
- Peters LJ (1990) Inherent radiosensitivity of tumour and normal tissue cells as a predictor of human tumour response. *Radiother. Oncol.* 17:177–190
- Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF, Hinney A, Kingston JE (1990) An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *Br. J. Radiol.* 63:624–628
- Ramsay J, Birrell G (1995) Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31:339–344
- Rave-Fränk M, Virsik-Köpp P, Pradier O, Nitsche M, Grünfeld S, Schmidberger H (2001) In vitro response of dermal fibroblasts to X-irradiation: Relationship between radiation-induced clonogenic cell death, chromosome aberrations and markers of proliferative senescence or differentiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 77:1163–1174
- Rodemann HP, Bayreuther K, Pflleiderer G (1989) The differentiation of normal and transformed human fibroblasts in vitro is influenced by electromagnetic fields. *Exp. Cell. Res.* 182:610–621
- Rodemann HP, Peterson HP, Schwenke K, von Wangenheim KH (1991) Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scanning Microsc.* 5:1135–1142
- Rodemann HP, Bamberg M (1995) Cellular basis of Radiat.-induced fibrosis. *Radiother. Oncol.* 35:83–90

- Rodemann HP, Binder A, Burger A, Guven N, Loffler H, Bamberg M (1996) The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Int. Suppl.* 54:S32–36
- Ross GM, (1999) Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr. Rel. Cancer* 6:41–44
- Rothkamm K, Kuhne M, Jeggo PA, Lobrich M (2001) Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 61:3886–3893
- Rudat, V. A. Dietz, C. Conradt, K. J. Weber. M. Flentje (1997). In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with acute Radiat. toxicity in patients with head and neck cancer. *Radiother. Oncol.* 43:181–188.
- Rudat V, Dietz A, Nollert J, Conradt C, Weber KJ, Flentje M, Wannemacher M (1999) Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiother. Oncol.* 53:233–245
- Russell, N. S. C. F. Arlett, H. Bartelink. A. C. Begg (1995). Use of fluorescence in situ hybridization to determine the relationship between chromosome aberrations and cell survival in eight human fibroblast strains. *Int. J. Radiat. Biol.* 68:185–196.
- Russell NS, Grummels A, Hart AAM, Smolders IJH, Borger J. Begg AC (1998) Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* 73:661–670
- Savage JRK, (1975) Classification and relationship of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 13:103–122
- Schmidt-Matthiesen H, Hepp H (1998) Gynäkologie und Geburtshilfe. Lehrbuch für Studium und Praxis. Schattauer. Stuttgart
- Schwartz JL (1992) The radiosensitivity of the chromosomes of the cells of human squamous cell carcinoma cell lines. *Radiat. Res.* 96–101.
- Scott D., Barber JBP, Aspreadborough AR, Burrill W, Roberts SA (1999) Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int. J. Radiat. Biol.* 75:1–10
- Slonina D, Gasinska A (1997) Intrinsic radiosensitivity of healthy donor and cancer patients as determined by the lymphocyte micronucleus assay. *Int. J. Radiat. Biol.* 72:693–701
- Smith KC, Hahn GM, Hoppe RT, Earle JD (1980) Radiosensitivity in vitro of human fibroblasts derived from patients with a severe skin reaction to radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 6:1573–1575.
- Streffer C (1997) Genetische Prädisposition und Strahlenempfindlichkeit bei normalen Geweben. *Strahlenther. Onkol.* 173:462–438
- Tucker SL, Turesson I, Thames HD (1992) Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur. J. Cancer.* 28:1783–1791
- Turesson I, (1990) Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19:1569–1574

- Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Odén A (1996) Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 36:1065–1075
- Virsik-Peuckert P, Rave-Fränk M, Langebrake U, Schmidberger H (1997) Differences in the yield of dicentric and reciprocal translocations observed in the chromosomes of irradiated human skin fibroblasts and blood lymphocytes from the same healthy individuals. *Radiat. Res.* 148:209–215
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing in the p53 network. *Nature* 408:307–310
- Volkmer B, Virsik-Peuckert RP (1990) Kinetics of chromosome lesion repair in synchronized quiescent and proliferating CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 58:1009–1023
- Weichselbaum RR, Epstein J, Little JB (1976). In vitro radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from patients with unusual clinical responses to Radiation. *Radiol.* 121:479–482
- West CML, Elyan SAG, Berry P, Cowan R, Scott D (1995) A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-teleangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes. *Int. J. Radiat. Biol.* 68:197–203
- West CML, Hendry JH (1991) Paterson Symposium - Is there a future for radiosensitivity testing? *Brit. J. Cancer* 64:197–199
- Wlodek D, Hittelman WN (1988) The relationship of DNA and chromosome damage to survival of synchronized X-irradiated L5178Y cells. II. Repair. *Radiat. Res.* 115:550–565
- Woods WG, Byrne TD, Kim TH (1988) Sensitivity of cultured cells to gamma irradiation in a patient exhibiting marked in vivo radiation sensitivity. *Cancer* 62:2341–2345

7. LEBENS LAUF

Anschrift: Zum Rugenbarg 27
21714 Hammah

Geburt: 5. Mai 1975 in Salzkotten

Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG

bis 1994 Besuch des Gymnasiums Athenaeum in Stade
Abschluss: Abitur

ZIVILDienst

1994 – 1995 Krankenpflege im Bereich der Unfallchirurgie
im Krankenhaus der Stadt Stade

HOCHSCHULBILDUNG

seit April 1996 Studium der Humanmedizin am UKE
der Universität Hamburg
März 1998 Ärztliche Vorprüfung
März 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002 Praktisches Jahr am UKE der Universität Hamburg
Januar 2003 PJ-Tertial in Plastischer Chirurgie am Sunnybrook and
Women's Health Science Centre, Toronto, Canada
Mai 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

BERUFLICHER WERDEGANG

seit Februar 2004 Assistenzarzt der HNO-Klinik,
Klinikum Dortmund gGmbH

8. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit hat ihren Ursprung im Projekt „DNA-Repair“ am Institut für Biophysik und Strahlenbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf der Universität Hamburg. Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die auf die eine oder andere Art und Weise zum Gelingen und Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Dr. Kerstin Borgmann für die Betreuung und Unterstützung während der Doktorarbeit bedanken. Danke für die Einführung in die Grundlagen und Daten meiner Arbeit. Ich hatte die Möglichkeit, selbständig zu arbeiten und dadurch auch viel zu lernen, was sicherlich nicht selbstverständlich ist. Auch möchte ich mich dafür bedanken, dass sie in schwierigen Situationen mit ihrer Diskussionsbereitschaft und wertvollen Ratschlägen mich abermals zum Weitermachen motiviert hat.

Besondere Danksage gilt Herrn Prof. Horst Jung und Herrn Prof. Ekkehard Dikomey für das Lehren, mit der Überlassung des Themas meiner Arbeit, in ihren Räumlichkeiten dieses Projekt zu realisieren. Darüber hinaus waren sie jederzeit für besondere Fragen und weiterführende Diskussionen offen.

Großen Dank schulde ich vor allem meinen Kollegen der Arbeitsgruppe. Frau Jutta Schäfer und Frau Britta Riepen danke ich für die Einführung sowie Tipps und Tricks in der Durchführung der Laborarbeiten und Auswertungen.

Auch danke ich Herrn Dr. Martin Purschke und Frau Dr. Kerstin Koch sowie Herrn Dr. Ingo Brammer und Frau Dr. Ulla Kasten-Pisula. Die Zusammenarbeit mit ihnen war eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen und das Gelingen der Arbeit. In zahlreichen Gesprächen haben sie mir wertvolle Anregungen und fundierte Empfehlungen für meine wissenschaftliche Arbeit gegeben.

Danke auch an Heidi und Karl-Heinz, Kersten, Jan und Jessy, Puppe, Marco, Claas, Edda, Tanja und Nicole.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

