

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie

Leitung Prof. Dr. E. Dikomey

Charakterisierung chromosomaler Aberrationen nach Bestrahlung in der S-Phase in CV-1 Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:
Kristin Göller
aus Hamburg

Hamburg 2015

Angenommen von der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.10.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der/die Vorsitzende: PD Dr. Kerstin Borgmann

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Kerstin Kutsche

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG.....	8
2. EINLEITUNG.....	9
2.1. Der Zellzyklus und Zellzykluskontrolle.....	10
2.1.1. <i>G0/G1-Phase.....</i>	12
2.1.2. <i>G1/S Kontrollpunkt.....</i>	13
2.1.3. <i>S-Phase.....</i>	14
2.1.4. <i>Intra-S-Kontrollpunkte.....</i>	15
2.1.5. <i>G2-Phase.....</i>	17
2.1.6. <i>G2/M-Kontrollpunkt.....</i>	17
2.1.7. <i>Mitose.....</i>	18
2.2. Entstehung von Chromosomenaberrationen.....	18
2.3. Reparaturmechanismen von DNA-Schäden.....	19
2.3.1. <i>Homologe Rekombination.....</i>	21
2.3.2. <i>Nicht-homologes End-Joining.....</i>	23
2.4. Reparatur in der S-Phase.....	23
3. MATERIAL UND METHODEN.....	26
3.1. CV-1 Zellen.....	26
3.2. Zellkultur.....	26
3.3. Bestrahlung.....	26
3.4. Zellsynchronisierung mit unterschiedlichen Agenzien.....	26
3.4.1. <i>Synchronisierung durch einen Thymidin-Block.....</i>	27
3.4.2. <i>Synchronisierung durch Aphidicolin.....</i>	27
3.4.3. <i>Synchronisierung durch Isoleucinenzug.....</i>	27
3.5. Durchflusszytometrie: Bestimmung der Zellzyklusverteilung synchronisierter Zellkulturen, insbesondere des Anteils der S-Phase.....	28
3.5.1. <i>Prinzip der Durchflusszytometrie.....</i>	28
3.5.2. <i>Messung von Zellzyklusverteilung und DNA-Gehalt.....</i>	29
3.5.3. <i>Zellfixierung und Messung am FACScan.....</i>	29
3.5.4. <i>Bestimmen des S-Phase Anteils synchronisierter Zellkulturen.....</i>	30
3.6. Bestimmung von Chromosomenaberrationen mittels Präparation von Metaphasen.....	30
3.6.1. <i>Einleitung zur Methode der Bestimmung von Chromosomentyp- und Chromatidtyp-aberrationen nach Schädigung.....</i>	30
3.6.2. <i>Metaphasepräparation und Metaphasen-Präparate.....</i>	31
3.6.3. <i>Bestimmung des Anteils der mitotischen Zellen.....</i>	32
3.6.4. <i>Instabile Chromosomentypaberrationen: Präparation, Messung und Auswertung.....</i>	32
3.7. Materialien.....	35

3.7.1.	<i>Chemikalien und Fertiglösungen</i>	35
3.7.2.	<i>Geräte, Computersoftware</i>	35
3.7.3.	<i>Puffer- und Waschlösungen</i>	36
4.	ERGEBNISSE	38
4.1.	Wachstumskinetik	38
4.2.	Synchronisierung von Zellen in der S-Phase mit Aphidicolin, Thymidin und Isoleucin-entzug	39
4.2.1.	<i>Synchronisierung in der S-Phase mit Aphidicolin</i>	40
4.2.2.	<i>Synchronisierung in der S-Phase mit Thymidin</i>	41
4.2.3.	<i>Synchronisierung in der S-Phase durch Isoleucinenzug</i>	41
4.2.4.	<i>Vergleich der verschiedenen Synchronisierungsmethoden</i>	42
4.3.	Bestimmung des Anteils mitotischer Zellen nach Synchronisierung mit Aphidicolin, Thymidin und Isoleucinenzug	43
4.4.	Bestimmung von Chromosomenaberrationen exponentiell wachsender Zellen im Vergleich zu in der S-Phase synchronisierter Zellen	45
4.4.1.	<i>Chromosomenaberrationen in exponentiell wachsenden CV-1 Zellen nach Bestrahlung</i>	45
4.4.2.	<i>Chromosomenaberrationen in Zellen nach Synchronisierung in der S-Phase</i>	46
4.5.	Effekt von Bestrahlung und Behandlung mit Wasserstoffperoxid auf die Zellzyklusverteilung	48
4.5.1.	<i>Auswirkungen von Bestrahlung und Behandlung mit Wasserstoffperoxid auf die Zellzyklusverteilung</i>	48
4.5.2.	<i>Auswirkungen von Bestrahlung und Behandlung mit Wasserstoffperoxid auf den Anteil mitotischer Zellen</i>	50
4.6.	Verteilung von Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung nach Synchronisierung	51
4.7.	Verteilung von Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit 50, 100 und 200 µM Wasserstoffperoxid nach Synchronisierung	53
5.	DISKUSSION	56
5.1.	Methodische Vorarbeiten	56
5.1.1.	<i>Vergleich verschiedener Synchronisierungsmethoden</i>	56
5.1.1.1.	<i>Aphidicolin</i>	56
5.1.1.2.	<i>Thymidin</i>	57
5.1.1.3.	<i>Isoleucinenzug</i>	58
5.2.	DNA-Schäden durch Synchronisierung von Zellen durch Aphidicolin, Thymidin und Isoleucinenzug	58
5.2.1.	<i>DNA-Schäden durch Synchronisierung mit Aphidicolin</i>	58
5.2.2.	<i>DNA-Schäden durch Synchronisierung mit Thymidin</i>	59
5.2.3.	<i>DNA-Schäden durch Synchronisierung mit Isoleucinenzug</i>	60
5.3.	Auswirkung von Wasserstoffperoxid und Bestrahlung auf den mitotischen Index	60
5.4.	Auswirkung von Wasserstoffperoxid und Bestrahlung auf das chromosomale	

Schadensspektrum	60
5.4.1. <i>Vergleich der Chromosomenaberrationen exponentiell wachsender und S-Phase synchronisierter CV-1 Zellen nach Bestrahlung.....</i>	<i>61</i>
5.4.2. <i>Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in synchronisierten Zellen</i>	<i>61</i>
5.4.3. <i>Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G1-Phase.....</i>	<i>62</i>
5.4.4. <i>Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der S-Phase.....</i>	<i>63</i>
5.4.5. <i>Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G2-Phase.....</i>	<i>65</i>
5.4.6. <i>Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid in der G1-, S- und G2-Phase</i>	<i>67</i>
6. ZUSAMMENFASSUNG	69
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	70
8. LEBENSLAUF.....	76
9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(Eigennamen von Proteinen, Proteinkomplexen o.ä. in Kursivschrift)

3DCRT	3-dimensional conformal radiation therapy
APC/C	Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia-telangiectasia und RAD3 related
BER	Basenexzisionsreparatur
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CDK	Cyclin-abhängigen Kinasen
CHO	Chinese Hamster Ovary
CKI	cyclin-dependent kinase Inhibitoren
DDR	DNA Schadensantwort
DMEM	Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HR	Homologe Rekombination
ICL	Interstrang Crosslink
IMRT	Intensity-modulated radiation therapy
Ku	Ku antigene protein
MCM	Minichromosome-Maintenance
MMR	Mismatch repair
MMS	Methylmethanesulfonat

MPF	Maturation promoting factor
MRN-Komplex	MRE11–RAD50–NBS1 Komplex
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Nichthomologes-End-Joining
ORC	ORI recognition complex/ Erkennungskomplex
ORI	Origin of Replication/Replikationsursprünge
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCC	premature chromosome condensation
PI	Propidiumjodid
Rb	Retinoblastoma protein
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A
rpm	Rotationen pro Minute
R-Punkt	restriction Punkt
SCE	Schwesterchromatidaustausche
SV40	Simian Virus 40
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Für die kurative Behandlung maligner Tumore spielt die Strahlentherapie neben der Chemotherapie und Chirurgie eine wichtige Rolle. Insbesondere die Entwicklung neuer Verfahren für die selektive Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung ist ein aktueller Forschungsschwerpunkt. In diesem Zusammenhang scheint die gezielte Inhibition der DNA-Schadensantwort in der S-Phase des Zellzykluses ein neues und vielversprechendes Ziel für die weitere Intensivierung der Tumorthherapie darzustellen.

Die DNA-Schadensantwort setzt sich aus einem umfangreichen Netzwerk von Proteinen zusammen: 1. Proteinen, welche den Schaden erkennen und entsprechende Zellzyklusarreste einleiten, 2. Proteinen, welche die geschädigte DNA Struktur für die Reparatur prozessieren und 3. entsprechenden DNA-Reparaturproteinen welche die eigentlichen Reparaturprozesse durchführen. Insbesondere in der replikativen S-Phase sind Zellen extrem strahlenresistent aufgrund der breit gefächerten Schadensantwort in dieser Zellzyklusphase. Um die der Strahlenresistenz in der S-Phase unterliegenden Mechanismen zu erfassen wurden in dieser Arbeit insbesondere die Entstehung und Reparatur von Chromosomenaberrationen vor dem Eintritt, während der gesamten S-Phase, sowie nach deren Beendigung nach ionisierender Bestrahlung im Vergleich zur Behandlung mit Wasserstoffperoxid untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen vor Eintritt in die S-Phase synchronisiert um im Zellzyklusverlauf die Veränderung in der Zusammensetzung der Chromosomenaberrationen zu analysieren Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Unter welchen Bedingungen wird die höchste Synchronisation von CV-1 Zellen erzielt unter Vermeidung von Schädigung durch das Synchronisierungsgenz?
2. Welche Chromosomenaberrationen treten in synchronisierten Zellen nach Schädigung durch ionisierende Bestrahlung im Vergleich zur Schädigung mit Wasserstoffperoxid im Verlauf des Zellzykluses auf?
 - a. Am Ende der G1-Phase?
 - b. Zu verschiedenen Zeitpunkten während der S-Phase?
 - c. Im Verlauf der G2-Phase?

2. EINLEITUNG

Krebserkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Jemal et al. 2011). In der Bundesrepublik erkranken jedes Jahr ca. 490.000 Menschen an Krebs, 218.000 Menschen sterben an dieser Erkrankung (Deutsche Krebshilfe). Somit waren 25,6 % aller Todesfälle im Jahr 2007 auf eine bösartige Neubildung zurückzuführen (Statistisches Bundesamt).

Die Anzahl der Neuerkrankungen (Inzidenz) für Krebserkrankung ist in den letzten Jahren beständig angestiegen. Im Jahr 2006 lag die Inzidenz für eine Krebserkrankung in Europa für Frauen bei 318 pro 100.000 Einwohner und für Männer bei 432 pro 100.000 Einwohner. Im gleichen Zeitraum konnte aber auch die Mortalität von Krebs gesenkt werden (Robert-Koch-Institut 2010). Ein Grund hierfür sind die besseren diagnostischen Mittel zum Erkennen eines Krebsleidens sowie die verbesserten Behandlungsmöglichkeiten durch verbesserte Operationstechniken, effektivere Bestrahlung und zielgerichteter Chemotherapie. Tatsächlich hat sich der Prozentsatz der Heilungen nur geringfügig verändert.

Die moderne Krebstherapie wird meistens multimodal durchgeführt. Durch eine Kombination aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie können viele Tumore erfolgreich behandelt werden. Welche Therapieoptionen eingesetzt werden, hängt von der Tumorentität und dem Tumorstadium ab. Über 50 % der an Krebs erkrankten Personen erhalten im Laufe der Therapie eine Bestrahlung sei es unter kurativen oder palliativen Gesichtspunkten. Die Strahlentherapie spielt eine wichtige Rolle, um lokale Rezidive zu verhindern, sowohl am Ort des Primärtumors als auch an den Orten der Metastasen. Ebenfalls wird bei Tumoren im fortgeschrittenen palliativen Stadium die Bestrahlung angewandt um lokal zum Beispiel eine Schmerzlinderung bei Knochenmetastasen zu erreichen. Ein weiteres Ziel der Strahlentherapie ist die Organ- und Funktionserhaltung bei kleineren Tumoren.

Vor allem bei Brust-, Kehlkopf- oder Blasenkrebs wird dieses Verfahren erfolgreich angewendet. Die Strahlentherapie entwickelt sich ständig weiter. Mittels verbesserter Gerätetechnik kann der Tumor unter Schonung der umliegenden Strukturen mit verschiedenen Techniken wie z.B. 3DCRT (3-dimensional conformal radiation therapy) oder IMRT (Intensity-modulated radiation therapy) gezielt erfasst und bestrahlt werden.

Ein großer Teil der in den letzten Jahren erreichten Verbesserungen bei den Langzeitheilungen von Krebserkrankungen resultiert aus der Strahlentherapie. 90-95% aller Krebsheilungen werden allein durch lokoregionale Behandlungsverfahren, also durch chirurgische oder strahlen-

therapeutische Interventionen erreicht.

Bei der Strahlentherapie wird ionisierende Strahlung gezielt in das Tumorgewebe abgegeben. Es findet eine Energieübertragung in das umliegende Gewebe statt und eine Schädigung der DNA (Desoxyribonukleinsäure) wird hervorgerufen. Das Ziel ist es, durch die energiereiche Strahlung die DNA zu schädigen und so die Zellen in den Zelltod zu treiben. Tumore haben häufig Mutationen (Veränderungen) in der DNA und eine vermehrte oder reduzierte Fähigkeit, entstandene DNA-Schäden rechtzeitig zu erkennen und zu reparieren. Die Schäden durch Bestrahlung, die pro Zelle pro 1 Gy entstehen, setzen sich aus 3.000 bis 4.000 Basenschäden, 1.000 Einzelstrangbrüchen und 40 Doppelstrangbrüchen (DSB) zusammen. In Bestrahlungsexperimenten, die an Zellkulturen durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass etwa 99 % der durch Bestrahlung entstandenen Schäden durch verschiedene zur Verfügung stehende Reparaturmechanismen fehlerfrei repariert werden (Dikomey et al. 2001). Bei den verbleibenden Schäden kann es zu einem Verlust der Zellteilungsfähigkeit und einem Absterben der Zelle kommen oder durch Fehlreparatur zu Mutationen mit einer malignen Transformation der Zelle (Dikomey et al. 2001). Bei der Strahlentherapie wird genau dieser Effekt der DNA Schädigung genutzt, um die Tumorzellen abzutöten. Theoretisch ist durch Bestrahlung eine vollständige Vernichtung eines Tumors möglich und lediglich eine Frage der eingesetzten Strahlendosis. In einem lebenden Organismus muss allerdings bei der Bestrahlung immer beachtet werden, dass es sich nicht vermeiden lässt, auch gesundes Gewebe mit zu bestrahlen. Daher ist die bei der Strahlentherapie eingesetzte Dosis ausschließlich durch das umliegende Normalgewebe limitiert.

Ziel der Forschung in der Radioonkologie ist es Behandlungen zu entwickeln die eine Strahlensensitivierung des Tumorgewebes zu bewirken ohne dabei das umliegende nicht betroffene Gewebe zu beeinflussen. In diesem Zusammenhang sind die Proteine der Zellzykluskontrolle sowie der DNA Schadensantwort (DDR) von extrem hoher Bedeutung.

2.1. Der Zellzyklus und Zellzykluskontrolle

Während eines Zellzyklus durchlaufen proliferierende Zellen die G1-Phase (Gap-1), S-Phase (Synthese-Phase), G2-Phase (Gap-2) und Mitose (M-Phase). Die G1-, S- und G2-Phase werden zur Interphase zusammengefasst. Die Mitose und Cytokinese werden als M-Phase zusammengefasst (Karp 2005). Die G1- und G2-Phase dienen als Übergangsphasen bzw. Ruhephasen, in denen ausschließlich das Zytoplasma vermehrt wird. Die zellulär aktiven Phasen sind die S-Phase, in der die Replikation stattfindet und die Mitose, in der die Verteilung der Schwester-

chromatiden auf die Tochterzellen stattfindet. Die M-Phase (Mitose und Cytokinese) dauert in Säugerzellen häufig nur eine Stunde. Die Interphase dauert typischerweise 23 h, kann je nach Zelltyp allerdings auch bis zu mehreren Wochen dauern (Karp 2005).

Sobald eine Zelle das Signal zur Zellteilung bekommt, beginnt die Zelle sich auf die bevorstehende Teilung vorzubereiten. In proliferierenden Geweben kann die Zelle direkt aus der Cytokinese in die G1-Phase eintreten. In nicht proliferierendem Gewebe wird die Zelle aus der ruhenden G0-Phase aktiviert und tritt in die G1-Phase ein. In der G1-Phase des Zellzyklus werden Proteine und Zellplasma produziert. In der S-Phase wird die DNA verdoppelt, damit nach der Zellteilung beide Tochterzellen die identische Menge an DNA im Zellkern haben. In der folgenden G2-Phase wird die Zellteilung vorbereitet. Mitose und Cytokinese stehen am Ende des Zellzyklus und enden mit Teilung der Zelle in zwei gleich ausgestattete Tochterzellen.

Die fehlerfreie Übermittlung von genetischen Informationen von Zelle zu Tochterzelle ist für das Überleben der einzelnen Zelle sowie für das Überleben des gesamten Organismus essentiell. Es gibt daher zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen verschiedene Kontrollpunkte, die ein temporäres Anhalten im Zellzyklus ermöglichen. In diesem Fall werden Signalkaskaden aktiviert, die den Kontrollpunkt einleiten und die Reparaturmechanismen aktivieren. Nach erfolgreicher Reparatur tritt die Zelle wieder in den Zellzyklus ein. Ist die Zelle nicht in der Lage die entstandenen Schäden zu reparieren, stirbt die Zelle durch Apoptose oder Nekrose ab. An Kontrollpunkten im Zellzyklus sind viele Proteine beteiligt. Sie treten nur in Aktion, wenn während des Zellzyklus eine Anomalie auftritt. Falls die Kontrollpunkte innerhalb des Zellzyklus nicht in der Lage sind, die DNA der Zelle effizient zu reparieren und anzuhalten, kommt es trotz eines Schadens zur Zellteilung und es kann in der Folge zur Transformation der Zelle kommen.

Kontrollpunkte besitzen viele Funktionen. Sie können den Zellzyklus anhalten oder stark verlangsamen, sind in der Lage DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren, können die Anordnung des telomeren Chromatins beeinflussen und sind in der Lage DNA-Reparaturproteine zu rekrutieren. Die Kontrollpunkte können ebenso den Signalweg der Apoptose induzieren (Hirao et al. 2000).

Im menschlichen Körper gibt es Zellen, die verschiedene Aktivitätsgrade aufweisen. So gibt es ausdifferenzierte Zellen, die sich nicht mehr teilen, wie zum Beispiel Nervenzellen, Muskelzellen oder Blutzellen. Andere Zellen können dagegen wieder zur Proliferation angeregt werden. Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel Leberzellen. Diese Zellen befinden sich ebenfalls in der G0-Phase, bis sie wieder zur Proliferation animiert (Karp 2005). Daneben gibt es Gewebe, in

denen eine ständige Erneuerung stattfindet, mit Zellen, die eine deutliche Proliferationsaktivität zeigen. Zu diesen Geweben gehören vor allem die Haut und die Epithelien, die die inneren Hohlorgane auskleiden, ebenso Stammzellen, aus denen differenzierte Zellen hervorgehen (Karp 2005).

Das Verständnis des Zellzyklus und dessen Steuerung sind wichtige Bestandteile für das Verständnis und die Bekämpfung von Krebserkrankungen, da diese entstehen, wenn die Zellen nicht mehr in der Lage sind, einen ordnungsgemäßen Ablauf des Zellzyklus zu gewährleisten.

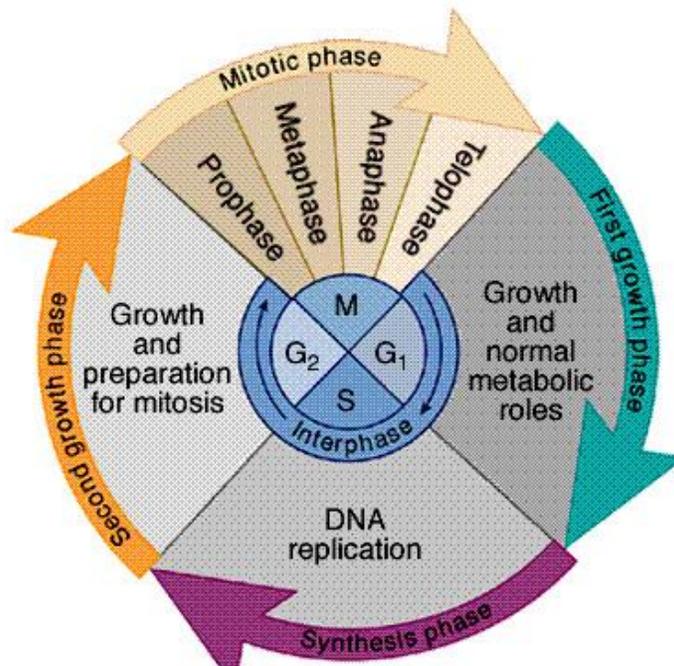


Abb. 1: Einteilung des Zellzyklus in die Phasen G₁, S, G₂- und M-Phase. Der Fortschritt des Zellzyklus wird durch Kontrollpunkte reguliert, die an den Übergängen der Zellzyklusphasen aktiviert werden können. Durch Reparaturvorgänge werden die Schäden wieder behoben und die Zelle kann nach abgeschlossener Reparatur im Zellzyklus fortschreiten.

(entnommen Furler, 2012)

2.1.1. G₀/G₁-Phase

Zellen, die aus einer Zellteilung hervorgegangen sind, stehen unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren. Das Vorhandensein dieser Faktoren bewirkt, dass die Zelle weiter im Zellzyklus fortschreitet - mit dem Ziel, sich in der nächsten Mitose erneut zu teilen. Fehlen Wachstumsfaktoren, wird die Zelle in die G₀-Phase eintreten, in der die Zelle sich nicht weiter teilt und im Zellzyklus ruht. Die Zellen können für eine unbestimmte Zeit in der G₀-Phase verweilen. Dies kommt häufig bei differenzierten (spezialisierten) Zellen vor. Durch erneute Aktivierung von Wachstumsfaktoren kann die Zelle aus der G₀-Phase wieder in die G₁-Phase eintreten und sich nach Durchlaufen des Zellzyklus erneut teilen.

Die G1-Phase wird auch als Wachstumsphase bezeichnet, da Aminosäuren produziert werden, das Zytoplasma zunimmt und Proteine und Enzyme hergestellt werden, die in der folgenden S-Phase benötigt werden. In dieser Phase wird auch die folgende S-Phase durch Markierung der Replikationsursprünge (ORI, Origin of Replication) mit dem Erkennungskomplex (ORCs, ORI recognition complex), und den inaktiven MCM2-7-Komplexen (Minichromosome-Maintenance) vorbereitet. Gemeinsam bilden sie den prä-Replikationskomplex.

Um von der G1-Phase in die S-Phase einzutreten, muss die Zelle den R-Punkt (restriction Punkt) überschreiten. Nach dem Überschreiten des R-Punktes reagiert die Zelle nicht mehr auf Einflüsse von Wachstumsfaktoren und schreitet bis zur Mitose fort.

Für die Regulierung des Fortschritts im Zellzyklus spielen die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) eine wichtige Rolle. Durch Phosphorylierung werden diese CDKs aktiviert und können verschiedene Aufgaben erfüllen. Die CDKs und Cycline sind in ihrer Konzentration abhängig von der Zellzyklusphase und verändern sich während des Zellzyklus.

Während der G1-Phase spielen CDK4 und CDK6 die Hauptrolle. Diese CDKs werden durch die Cycline D1, D2 und D3 aktiviert. Zum Ende der G1-Phase, nach dem R-Point, übernehmen die Cycline E1 und E2 und CDK2 die Funktion und ermöglichen das Phosphorylieren von Substraten, die für die S-Phase benötigt werden.

2.1.2. G1/S Kontrollpunkt

Der Kontrollpunkt am Ende der G1-Phase kann den Eintritt in die S-Phase verzögern, um der Zelle die Möglichkeit zu geben, Schäden vor Eintritt in die Replikation zu reparieren. Nach Beenden der Reparatur tritt die Zelle wieder in den Zellzyklus ein. Auslöser für diesen Kontrollpunkt kann ein einzelner Doppelstrangbruch sein, der das Protein ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) aktiviert. ATM ist in der Lage nachfolgende Proteine, wie Chk2 und p53 zu aktivieren. Chk2 und p53 sind das Startsignal für zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege. Der Signalweg des Chk2 hält die Zelle zwischen G1- und S-Phase an. Der durch p53 aktivierte Signalweg erhält den Arrest in der G1-Phase aufrecht (Bartek et al. 2001). Hierfür wird p53 phosphoryliert und dessen Abbau verhindert, sodass es zu einem Anstieg der p53 Konzentration kommt. P53 aktiviert die Expression des Zellzyklusinhibitors p21, welches CDK/cyclin-Komplexe inhibieren kann und so den Zellzyklusarrest aufrechterhalten kann. P53 ist während des gesamten Zellzyklus in geringen Mengen vorhanden und kann durch Stressfaktoren wie DNA-Schäden, pH-Veränderungen, Hitze oder Oncogen-Aktivierung aktiv werden (Blomen & Boonstra 2007). Außerdem ist das Retinoblastoma Protein (Rb) ebenfalls in der Lage am G1/S-Übergang einen

Zellzyklusarrest zu induzieren. Durch cyclin-dependent kinase Inhibitoren (CKIs) wird Rb hypophosphoryliert und somit aktiviert (Blomen & Boonstra 2007). Die beiden Signalwege über ATM und Rb sind unabhängig voneinander und können parallel ablaufen.

2.1.3. S-Phase

In der S-Phase findet die Replikation statt, bei der die DNA der Zelle verdoppelt wird. Da für die S-Phase nur einige Stunden zur Verfügung stehen, werden Beginn und Ablauf der Replikation durch einen komplexen Signalweg reguliert. Sind Regulations- oder Initiationsmechanismen in der S-Phase fehlerhaft, kann es zu Chromosomenaberrationen, Entartung und Absterben der betroffenen Zelle kommen (Laskey et al. 1989)

Mit Beginn der S-Phase nimmt die Aktivität der CDKs zu. Die CDK1 phosphoryliert den prä-Replikationskomplex, sodass mit der Replikation begonnen werden kann. Sie verhindern ein weiteres Anlagern von prä-Replikationskomplexen und sorgen dafür, dass jedes ORI nur ein einziges Mal repliziert wird. Dies wird über den Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome (APC/C) reguliert. Während der S-Phase und auch der G2-Phase kommt es zu einer weiteren Zunahme der CDK Aktivität bis zum Eintritt in die Mitose.

Wegen der vielen in der S-Phase zu replizierenden ORIs gibt es eine Reihenfolge, nach der die einzelnen ORIs mit der Replikation beginnen. Jeder prä-Replikationskomplex ist in der Lage, den dahinter liegenden DNA-Abschnitt zu replizieren, allerdings wird nur ein geringer Teil der prä-Replikationskomplexe aktiviert. Somit gibt es mehr Replikationskomplexe als benötigt, um sicher zu stellen, dass das gesamte Genom verdoppelt wird. Im Falle einer Nichtaktivierung wird der benachbarte Replikationsursprung aktiviert (Takeda & Dutta 2005). Die Auswahl der ORIs und der Beginn der Replikation werden durch die DNA-Sequenz, die Chromatinstruktur, Transkription, Position im Zellkern und in Abhängigkeit von anderen ORIs festgelegt. Cdc45 interagiert mit Polymerasen und dem prä-Replikationskomplex. Es stellt die Verbindung zwischen der Initiation und den Elongationsfaktoren her. Wenn die Polymerasen an die DNA angelagert sind, beginnt die Zelle mit der Replikation.

In Eukaryoten gibt es 19 DNA-Polymerasen. Die DNA-Polymerasen α , β , γ , δ und ϵ sind die Schlüsselpolymerasen, um die Integrität des Genoms aufrecht zu erhalten (Hübscher et al. 2002). Polymerase α initiiert die Replikation und wird an dem kontinuierlichen Strang von der Polymerase ϵ , sowie am diskontinuierlichen Strang von der Polymerase δ abgelöst. Diese beiden Polymerasen haben eine Fehlerkorrektur und Exonuklease-Aktivität. Die Polymerase β ist in der Basenexzisionsreparatur (BER) und dem Auffüllen von Lücken aktiv. Polymerase γ repliziert und

repariert mitochondriale DNA (Hübscher et al. 2002).

Die DNA wird bidirektional repliziert. Die Polymerasen replizieren die DNA von den ORIs in beide Richtungen, bis zwei aktive Replikationsgabeln aufeinander treffen. Neben der DNA werden auch Histone verdoppelt, die für die Architektur der Chromosomen benötigt werden (Laskey et al. 1989).

Da aufgrund der Replikation DNA-Einzelstränge physiologisch in der S-Phase vorliegen, besteht besonders in der frühen S-Phase die Gefahr, dass es zu DNA-Schäden kommt, die im weiteren Verlauf zu Chromosomenaberrationen führen können. Ebenfalls können durch Replikationsfehler Basenschäden entstehen. Durch fortlaufende Replikationsgabeln können primäre Einzelstrangschäden, durch die Kollision mit einer Replikationsgabel zu Doppelstrangbrüchen umgewandelt werden. Um dies zu verhindern, gibt es in der S-Phase einen Kontrollpunkt, der während der Replikation oder durch äußere Einflüsse entstandene Schäden erkennt und für deren Reparatur sorgt. Die Zelle ist in der S-Phase trotz der Kontrollpunkte in der frühen S-Phase sehr empfindlich für äußere Einflüsse.

2.1.4. Intra-S-Kontrollpunkte

Der aktivierte S-Phase Kontrollpunkt kann den Fortschritt im Zellzyklus nur verzögern, aber nicht anhalten. Über zwei unterschiedliche Kontrollpunkte kann der Fortschritt verlangsamt werden (Bartek et al. 2004; Labib & DePiccoli 2011). DNA-Schäden, insbesondere Doppelstrangbrüche, werden über einen ATM gesteuerten Kontrollpunkt vermittelt, der unabhängig von Replikationsgabeln den Zellzyklusfortschritt verzögert. Daneben kann mittels Ataxia-telangiectasia und RAD3 related (ATR) das Fortschreiten im Zellzyklus abhängig von angehaltenen Replikationsgabeln verzögert werden. Die Replikationsgabeln können auch durch einen Mangel an Nucleotiden oder durch DNA-Schäden, welche die Replikationsgabel sterisch hindern, anhalten.

Sind während der Replikation durch äußere Einflüsse Doppelstrangbrüche entstanden, wird ATM aktiviert und triggert untergeordnete Kaskaden. Hierbei wird Chk2 phosphoryliert und vermittelt den Abbau von Cdc25A. Dies führt zu einer Inhibition der in der S-Phase aktiven CDK-Komplexe Cdk2/CyclinE. Hierdurch wird das Beladen von Cdc45 blockiert und somit kommt der Fortschritt in der S-Phase zum Erliegen (Bartek et al. 2004). Chk2 führt zudem zu einer Phosphorylierung von p53 und MDM2. Das stabilisierte und aktivierte p53 induziert die Transkription von p21. Dies führt zu einem länger anhaltenden Zellzyklusarrest (Bartek & Lukas 2001).

Durch freiliegende einzelsträngige DNA wird der ATR-abhängige Kontrollpunkt aktiviert.

An einzelsträngiger DNA lagert sich das Replikationsprotein A (RPA) an. Durch die Rekrutierung von ATR zur mit RPA belegten DNA wird dieses aktiviert und Chk1 wird phosphoryliert. Dies führt ebenfalls zu einem Abbau von Cdc25A wie auch schon beim ATM-induzierten Zellzyklusarrest (Takeda & Dutta 2005, Bartek et al. 2004).

Während in der S-Phase ein Kontrollpunkt aktiviert wurde, bleiben die Replikationsgabeln auf der DNA. Bei Beenden des S-Phase Kontrollpunktes findet eine schnelle Wiederaufnahme der Replikation statt (Takeda & Dutta 2005, Labib & DePiccoli 2011).

Die beiden beschriebenen Kontrollpunkte können parallel ablaufen und sich gegenseitig beeinflussen. Die aktivierten Signalkaskaden überlappen sich zum Teil und beeinflussen gemeinsame Proteine (Takeda & Dutta 2005, Branzei & Foiani 2008).

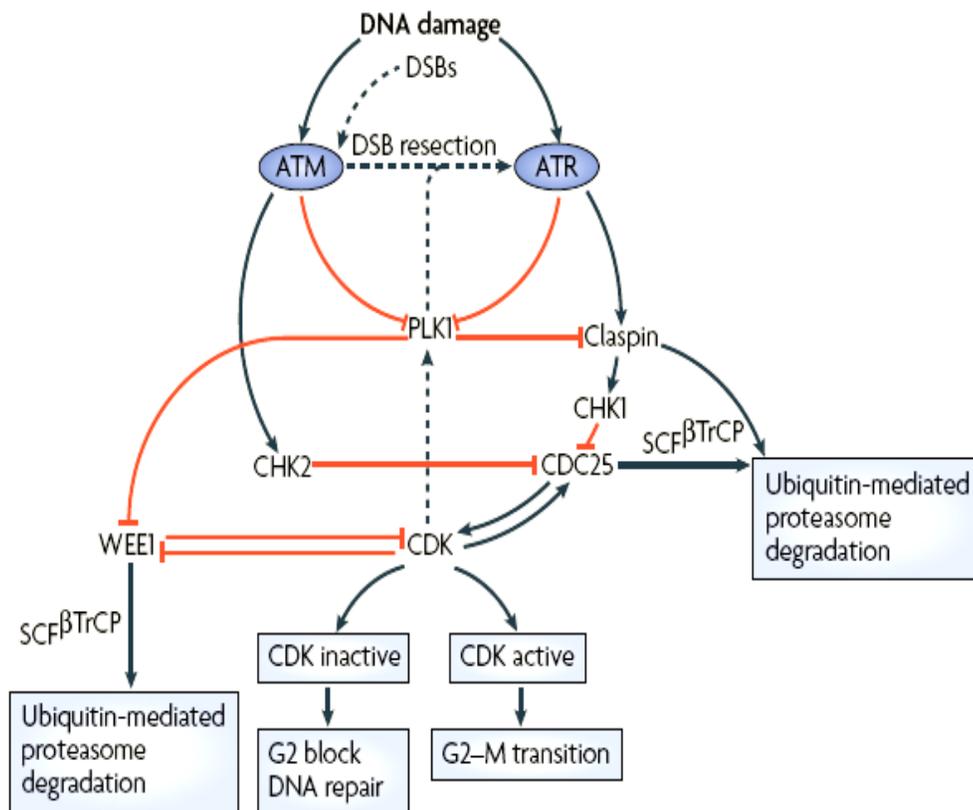


Abb. 2: Durch Kontrollpunkte gesteuerter Zellzyklusarrest. Kontrollpunkte werden nach Schadenserkennung initiiert und nach Beseitigung der Schädigung wieder aufgelöst. Die Kinasen ATM reagiert auf DSB und ATR auf einzelsträngige DNA und angehaltene Replikationsgabeln. ATM und ATR phosphorylieren unterschiedliche Zielproteine, wie die Kontrollpunkt-Kinase CHK1 und CHK2 wodurch es zum Abbau von CDC25 kommt und Inhibition der CDK-Aktivierung und resultiert in einem G2-Arrest. (entnommen Branzei & Foiani 2008).

2.1.5. G2-Phase

In der G2-Phase ist die DNA der Zelle bereits verdoppelt und die Zelle bereitet sich auf die Zellteilung vor. Die Zelle wächst weiter und produziert für die Zellteilung spezifische Proteine. Zum Ende der G2-Phase werden die Zellkontakte zu den Nachbarzellen aufgelöst, die Zelle rundet sich ab, vergrößert sich und nimmt Flüssigkeit auf.

Für die Regulation spielen Cycline wie in den anderen Zellzyklusphasen ebenfalls eine wichtige Rolle. In der G2-Phase wird vermehrt Cyclin B1 synthetisiert, welches an CDK1 bindet und es so aktiviert. Dieser Komplex, auch Maturation promoting factor (MPF), hat zwei Funktionen, er unterdrückt die erneute Replikation bereits replizierter Abschnitte und vermittelt bei ausreichender Konzentrationsanreicherung den Übertritt der Zelle in die Mitose. Die beiden Untereinheiten des MPF werden durch die regulatorische Untereinheit Cyclin1 gesteuert. Wird MPF aktiviert, kann die Zelle in die M-Phase eintreten. MPFs phosphorylieren Substrate, auf die die Zelle beim Eintritt in die Mitose angewiesen ist. Durch Aktivierung von Cdc25 und Inaktivierung von Wee1 kann die Zelle in die nächste Phase fortschreiten (Ohi & Gould 1999, Karp 2005).

2.1.6. G2/M-Kontrollpunkt

Die Aufgabe des Kontrollpunktes am Ende der G2-Phase ist es zu verhindern, dass beschädigte DNA in die Mitose gelangt. Dieser Kontrollpunkt kann, je nach DNA-Schäden, wie bei den Kontrollpunkten in der S-Phase, über den ATM-Chk2-Cdc25 oder den ATR-Chk1-Cdc25 Signaltransduktionsweg aktiviert werden. Beide Wege führen zu einem Arrest der Zelle in der G2-Phase (Bartek et al. 2004). Zellen, die einen fehlerhaften G2/M-Kontrollpunkt aufweisen, treten vor dem Beenden der DNA-Reparatur in die Mitose ein. Dies kann zum Tod oder Chromosomenaberrationen der Zellen nach der Zellteilung führen.

Schäden durch ionisierende Strahlung werden durch den ATM vermittelten Signaltransduktionsweg erkannt. Der ATR vermittelte Signaltransduktionsweg wird durch Replikationsschäden aktiviert (Uto et al. 2004). Die Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests wird in beiden Fällen durch den ATM Signalweg durchgeführt.

Durch Inaktivierung von Cdc25 und Hochregulation von Wee1 wird die Zelle in der G2-Phase angehalten (Ohi & Gould 1999). Durch die Inaktivierung von Cdc25 akkumuliert Cdc2. Wee1 phosphoryliert das akkumulierte Cdc2. Somit wird es gehemmt. Hierdurch kommt es zu einem G2-Arrest.

2.1.7. *Mitose*

Zwei gleich ausgestattete Tochterzellen stehen am Ende der Zellteilung. Vorher findet die Kondensation der Chromosomen, die Ausrichtung der Chromosomen in der Äquatorialebene und die Ausbildung des Spindelapparates statt. Mit Hilfe des Spindelapparates werden die Chromosomen an den Zentromeren getrennt und auf die beiden Zellpole verteilt, sodass die Tochterzellen beide einen diploiden Chromosomensatz bekommen. Die Mitose ist unterteilt in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase.

Durch MPF wird die Zelle in der Mitose gehalten. Am Ende der Mitose, in der späten Anaphase, nimmt die Aktivität von MPF ab und die Zelle beendet die Zellteilung. Die Abläufe in der Mitose sind hochkomplex und genauestens von der Zelle gesteuert und kontrolliert.

In der Prophase der Mitose werden die verdoppelten Chromosomen kondensiert und der Mitoseapparat findet sich zusammen. Während der Prometaphase beginnt die Auflösung der Kernhülle und die Mitosespindel wird aufgebaut. Die Chromosomen wandern anschließend in die Mitte der Zelle und die Mikrotubuli der Spindel bilden sich aus. In der Metaphase lagern sich Mikrotubuli an die Chromatiden der Chromosomen an. Anschließend werden in der folgenden Anaphase die Chromatiden voneinander getrennt und zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen. Die Chromatiden nähern sich den Zellpolen. Hier beginnt die Telophase. Es bildet sich eine Kernhülle und die Chromatiden dekondensieren wieder. Zum Abschluss folgt die Cytokinese, bei der die Teilung der Zelle in die beiden Tochterzellen beendet wird (Karp 2005).

2.2. **Entstehung von Chromosomenaberrationen**

DNA-Doppelstrangbrüche führen, wenn sie fehlerhaft oder nicht repariert werden, zu Chromosomentyp- oder Chromatidtypaberrationen (Bryant 2004). Welche Aberration entsteht, hängt von der Zellzyklusphase ab, in der sich die Zelle während der Schädigung befindet (Sax 1940). Chromosomenaberrationen werden in der Mitose untersucht, da hier die Chromosomen maximal kondensiert sind und die Abschnitte der Chromosomen am besten beurteilt werden können. Die entstandenen Chromosomenaberrationen können innerhalb einzelner Chromosomen (intrachromosomal) oder zwischen mehreren Chromosomen (interchromosomal) auftreten (Savage 1975). Für intra- oder interchromosomale Schäden wird die DNA mittels FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) angefärbt. Unterbrechungen in der Färbung weisen auf eine solche Schädigung hin. In dieser Arbeit wurden nur die mikroskopisch sichtbaren Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen untersucht.

Aberrationen, die nicht an beide Tochterzellen weitergegeben werden, sondern in der ersten Mitose verloren gehen, werden als instabil bezeichnet. Zu den instabilen intrachromosomalen Aberrationen zählen die terminale und die interstitielle Deletion, die beide mit der Bildung azentrischer Fragmente einhergehen. Dizentrische Chromosomen, die ebenfalls mit (mindestens) einem azentrischen Fragment assoziiert sind, gehören zu den instabilen interchromosomalen Aberrationen. Stabile Aberrationen werden an beide Tochterzellen weitergegeben (Savage 1975).

Chromosomentypaberrationen oder auch G1-Schäden betreffen beide Chromatiden und entstehen in der G1- oder frühen S-Phase. Der Schaden wird während der S-Phase mitrepliziert. Die entstandenen Fragmente haben kein Zentromer. Chromatidtypaberrationen oder auch G2-Schäden entstehen in der späten S- oder G2-Phase, wenn die DNA bereits repliziert ist. Schäden, die in diesen Phasen entstehen, betreffen einzelne Chromatiden der bereits fertig replizierten Chromosomen. Am Chromosom erkennt man verkürzte Arme und Lücken („gaps“). In der S-Phase entstehen beide Schadensarten, da es bereits replizierte und nicht replizierte DNA-Anteile gibt. Somit ergibt sich für jede Phase des Zellzyklus ein spezifisches Schadensmuster, das Rückschlüsse auf die Zellzyklusphase gibt. Deutlich seltener können komplexe Aberrationen wie zum Beispiel triradiale Chromosomen entstehen.

2.3. Reparaturmechanismen von DNA-Schäden

Das Genom der Zelle ist durch äußere oder innere Einflüsse ständig der Gefahr von DNA Schäden ausgesetzt. Endogene Prozesse, die DNA-Schäden zur Folge haben, sind zum Beispiel spontane Depurination von DNA, durch Basenoxidation entstandene DNA-Brüche, Replikations-Fehlpaarungen und der Kollaps von Replikationsgabeln. Exogene Einflüsse wie ionisierende Strahlung oder UV-Strahlung, Toxine, mutagene Chemikalien und Viren können ebenfalls DNA-Schäden und somit eine Aktivierung des Reparaturapparates der Zelle auslösen.

Der Zelle stehen je nach Zellzyklusphase und Schadensart verschiedene Reparaturmechanismen zur Verfügung. Über verschiedene Signalwege werden, durch die Kontrollpunkte, die Reparaturmechanismen der Zelle aktiviert und die an der Reparatur beteiligten Proteine an die Schadensstelle gelotst.

Die Schadensantwort ist in einem komplexen Netzwerk von Überwachungssystemen und Signalwegen reguliert. Das Ziel der Schadensantwort ist der Zellzyklusarrest mit folgender korrekter Reparatur der Schäden oder dem Absterben der Zelle, wenn die Reparaturmechanismen die Schäden nicht korrekt beheben. Die Regulation der Schadensantwort ist von der Art des DNA-

Schadens und der Zellzyklusphase abhängig (Branzei & Foiani 2008).

Basenschäden und Einzelstrangbrüche werden durch verschiedene Mechanismen erkannt und repariert. Bei der Basenexzisionsreparatur (BER) werden bis zu drei schadhafte Nukleotide abgespalten, die durch die DNA-Polymerase β wieder angefügt werden. Als Vorlage dient der komplementäre Schwesterstrang und die DNA-Ligase verschließt die Lücken in der Phosphodiesterkette. Die BER kommt vor allem bei durch Oxidation entstandenen Schäden zum Einsatz.

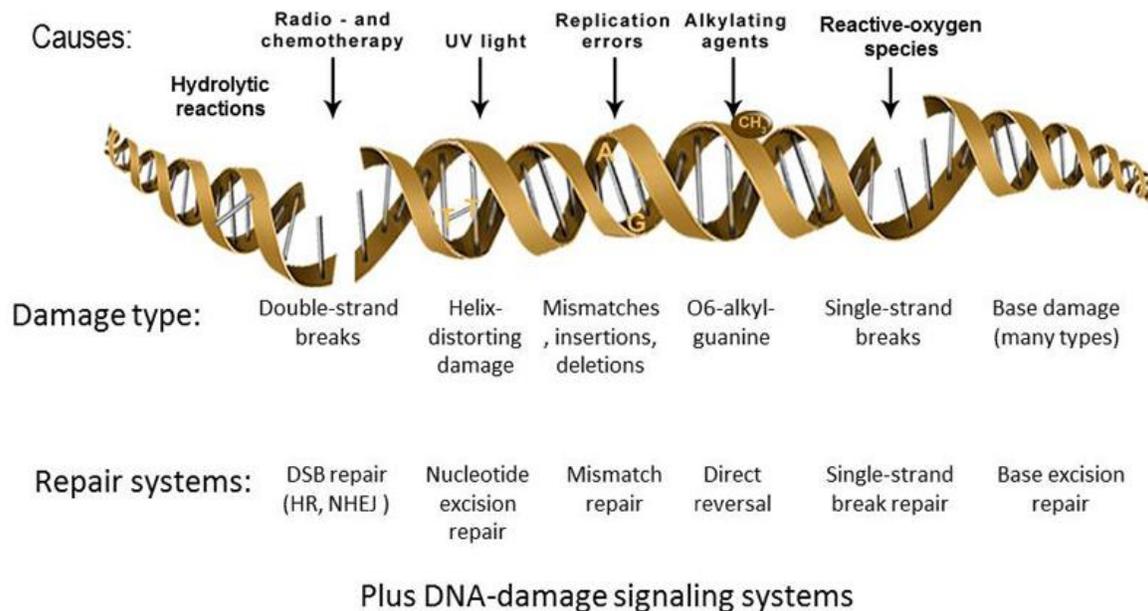


Abb. 3: DNA-Schäden und ihre Reparaturwege. Verschiedene Agenzien induzieren unterschiedliche Arten von DNA-Schäden. Der für die Reparatur verwendete Mechanismus ist abhängig von der Zellzyklusphase, in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Schädigung befinden. (entnommen: http://www.missiontherapeutics.com/research_and_development [Stand: 11.05.2013])

Bei der Nucleotidexzisionsreparatur (NER) können bis zu 30 Nukleotide eines Stranges ersetzt und neu synthetisiert werden. Hierbei werden hauptsächlich Pyrimidindimere repariert. Diese Schäden entstehen hauptsächlich durch UV-Strahlung und können die Funktion von DNA-Polymerasen blockieren (Branzei & Foiani 2008). Während der Replikation fehlerhaft gepaarte Basen werden durch die Mismatch repair (MMR) korrigiert. Hierbei werden die fehlerhaften Abschnitte erkannt und entfernt. Durch erneute DNA-Synthese werden die Lücken gefüllt.

DSBs stellen für das Überleben der Zelle eine große Herausforderung dar. Die Effizienz der Doppelstrangbruchreparatur ist eine der wichtigsten Determinanten für das Überleben der Zelle. Im Gegensatz zur Reparatur von Einzelstrangbrüchen steht bei der Reparatur von DSBs nicht immer ein komplementärer DNA-Strang als Vorlage für die fehlerfreie Reparatur zur Verfügung.

Es stehen zwei Reparaturmechanismen für die DSB Reparatur zur Verfügung. DSBs können durch Homologe Rekombination (HR) oder Nichthomologes-End-Joining (NHEJ) repariert werden. Welcher Reparaturweg bei DSBs eingeschlagen wird, liegt an der Struktur des DSB. Ein einfacher DSB mit „stumpfen“ Enden kann durch NHEJ repariert werden. Kompliziertere Brüche allerdings werden eher durch HR repariert (Helleday et al. 2007).

2.3.1. *Homologe Rekombination*

Homologe Rekombination (HR) ist ein Reparaturmechanismus, der eine fehlerfreie DSB Reparatur ermöglicht. Hierfür wird eine homologe Vorlage benötigt in Form eines Schwesterchromatids. CDKs, die auch bei der Zellzyklusregulation eine wichtige Rolle spielen, sind wichtige Faktoren während der S- und G2-Phase für die Regulation der HR. CDKs regulieren die Entstehung von 3'-Überhängen, die für die HR notwendig sind. Außerhalb der S- und G2-Phase wird durch CDKs eine Resektion von DNA Enden und somit die Homologe Rekombination verhindert.

HR findet in der S- und G2-Phase statt. Wahrscheinlich wird die Nähe durch eine physikalische Verbindung zwischen den beiden Schwesterchromatiden sicher gestellt (Helleday et al. 2007). Die Verbindung zwischen dem zu reparierenden Strang und der Vorlage ist für HR in der G2-Phase notwendig. Homologe Rekombination erfordert den Abbau der DSBs vom 5' zum 3' Ende, dies wird durch die Aktivität des MRN-Komplexes initiiert. Chk1 beeinflusst durch Aktivierung von Proteinen und das Anlagern von RPA auf einzelsträngiger-DNA, sodass HR initiiert werden kann (Branzei & Foiani 2008). Rad51 kontrolliert die Anlagerung des zu reparierenden DNA-Stranges an den homologen Partner. Es wird eine sogenannte Holliday junction gebildet. In der Abbildung 4 (a) ist zu sehen, wie sich die homologe DNA des DSBs an die Vorlage anlagert und repliziert wird. Wenn beide DNA-Stränge des DSBs an die homologe Vorlage binden und repliziert werden, wird dies als doppelte Holliday Junction bezeichnet. Hierbei kann es leicht zu einer Überkreuzung (crossover) der homologen Chromatiden kommen (Helleday et al. 2007). Die Replikation muss hierbei die Länge der Lücke überbrücken und etwas länger sein, sodass sich am Ende die beiden zu reparierenden Stränge homolog aneinanderlagern können. Die einzelsträngige DNA wird wieder von RPA gebunden und die zu reparierenden Stränge werden durch Rad52 oder p53 wieder vereint.

Eine fehlerhafte HR kann sich genomdestabilisierend auswirken (Branzei & Foiani 2008). So können Mutationen in an der HR beteiligten Proteinen sich in frühzeitig auftretenden Tumorerkrankungen manifestieren, wie beispielsweise das Mammakarzinom durch Mutationen der Gene BRCA1 und BRCA2.

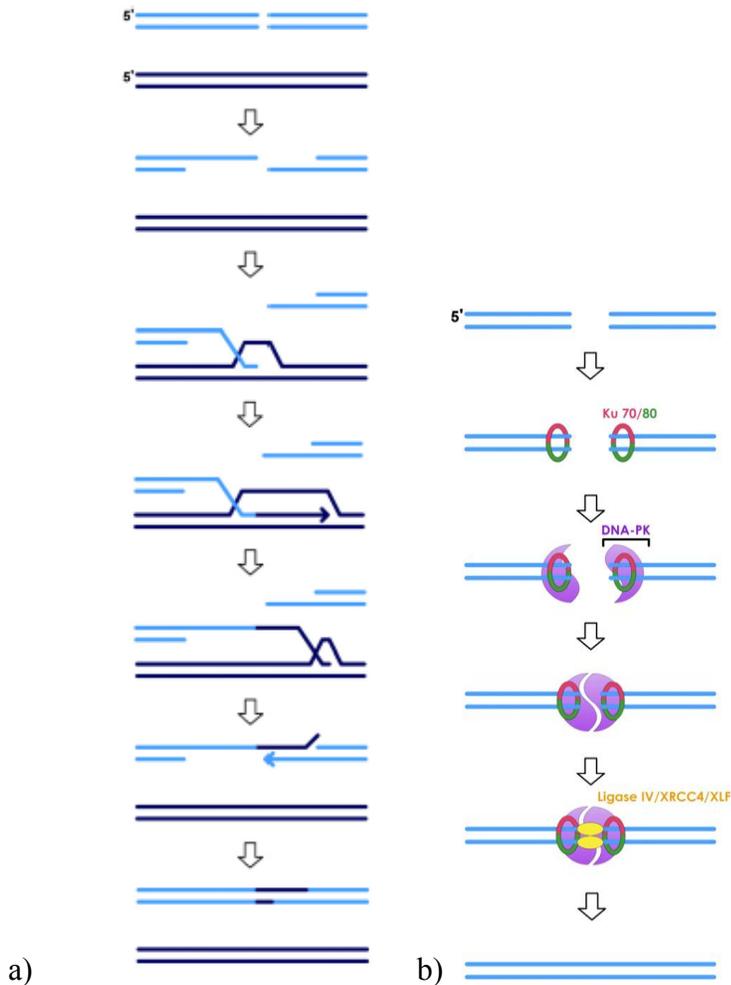


Abb. 4: DSB Reparatur durch HR und NHEJ. a) Die HR erfolgt durch Resektion der beiden Bruchenden des DSB. Rad51 vermittelt die Anlagerung eines Einzelstranges in die Vorlage. Somit entsteht ein D-Loop. Es findet eine Replikation des Einzelstranges statt. Ist das Ende des Einzelstranges erreicht, löst sich die Verbindung und die beiden Stränge des DSBs lagern sich aneinander an. Nach Resektion überstehender 3'-Enden wird die Bruchlücke durch eine Ligase verschlossen. b) Bei NHEJ werden die beiden Bruchenden durch Ku70/80 geschützt. Hierdurch wird die DNAPKs aktiviert, welche die Reparatur katalysiert an deren Ende die Ligase die Bruchenden wieder miteinander verbindet.
(entnommen Helleday et al. 2007).

2.3.2. *Nicht-homologes End-Joining*

Das nicht homologe End-Joining (NHEJ) ist der einfachste Mechanismus für die Doppelstrangreparatur und kann sequenzunabhängig oder anhand von Mikrohomologien Bruchenden eines DSBs ligieren. NHEJ kann auch bei starker Chromatinkondensation oder Fehlen eines Schwesterchromatids DSBs reparieren. Während der G1-Phase und in der Mitose werden DSBs daher durch NHEJ repariert. Wird in der G2-Phase oder Mitose kein Kontrollpunkt aktiviert, so kann erst in der nächsten G1-Phase mit der Reparatur durch NHEJ begonnen werden.

Für einfache DSBs ohne einzelsträngigen Überhang (blunt ends) ist das NHEJ gut geeignet. Allerdings kann es zu Veränderungen an der Bruchstelle kommen, wenn die beiden Enden nicht kompatibel sind. Hierfür werden Ku70 und Ku80 rekrutiert, die sich an die Enden des DSB lagern und zu einer Reparatur dieses Bruches führen. Der DNA-Ku Komplex aktiviert die DNA-PKcs, hierbei wird ein Ring geformt, der sich spezifisch an die DNA-Enden lagert (Helleday et al. 2007). Als Vorlage dient ein nichthomologer Abschnitt DNA, der nicht zwangsläufig von demselben Chromosom kommen muss. So können genetische Informationen verloren gehen, oder es kann zu Translokationen kommen (Branzei & Foiani 2008). NHEJ stellt die Kontinuität des Phosphodiester-Rückgrats wieder her und gewährleistet die strukturelle Integrität der DNA.

2.4. **Reparatur in der S-Phase**

Während der S-Phase ist die Zelle sehr anfällig für DNA-Schäden. Durch falsch eingebaute Nukleotide oder Basen, Ansammlung von Lücken, Fehlern an repetitiven Sequenzen und durch kollabierte Replikationsgabeln kann es zu Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüchen in der DNA kommen. Durch die zum Teil freiliegende DNA in der S-Phase ist die Zelle ebenfalls besonders anfällig für Schäden zum Beispiel durch UV-, ionisierende Strahlung und chemische Agenzien. Dies kann sich auf die Chromosomen und somit die Fähigkeit der Zelle zum Überleben auswirken. Werden diese Schäden nicht korrekt repariert, können die Zellen transformieren oder absterben. Für die Stabilität des Genoms ist die korrekte Reparatur von DNA-Schäden somit von größter Wichtigkeit. In der S-Phase sind deshalb sehr viele Reparaturmechanismen im Einsatz, die im Verlauf eine fehlerfreie Zellteilung ermöglichen. Bei Doppelstrangbrüchen in der S-Phase können HR und NHEJ um die Reparatur konkurrieren. Da HR eine fehlerfreie Reparatur ermöglicht, wird dieser Reparaturmechanismus bevorzugt eingesetzt. Allerdings wird das NHEJ schneller aktiviert und kann Schäden schneller beheben (Branzei & Foiani 2008).

In der frühen S-Phase sind die Zellen sehr strahlensensibel und fast so empfindlich wie in der

späten G2-Phase/Mitose. Im Verlauf der S-Phase werden die Zellen dann immer strahlenresistenter. In der späten S-/frühen G2-Phase sind die Zellen am strahlenresistentesten. In Tumoren befindet sich ein prozentual höherer Anteil an Zellen in der S-Phase, da diese Zellen eine höhere Proliferationsrate haben als die umliegenden Gewebe. Dies liegt zum Teil daran, dass in Tumorzellen die Zellzykluskontrolle beispielsweise durch die Mutation des TP53-Genes nicht mehr korrekt funktioniert und die Zellen sich somit vermehrt teilen können als normales Gewebe (Jackson & Bartek 2009).

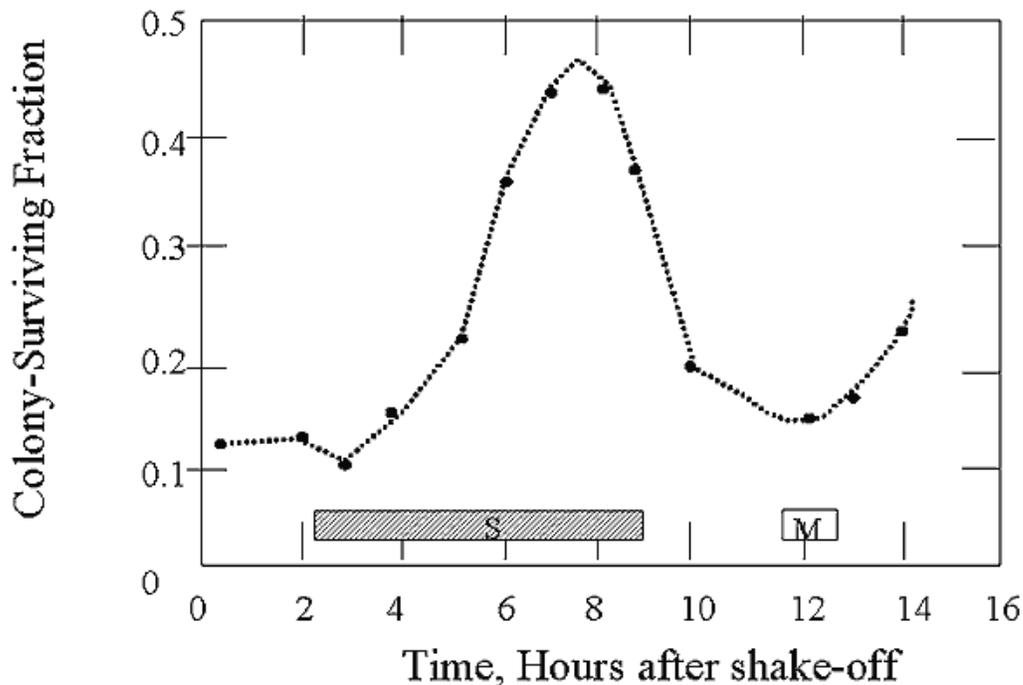


Abb. 5: Zellzyklusabhängige Variation der Strahlenempfindlichkeit. Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit zeigt eine deutliche Variation in Abhängigkeit des Zellzyklus, mit der höchsten Resistenz in der späten S-/Beginn der G2-Phase, gefolgt von der mittleren S-Phase, der späten G1/Anfang S-Phase. Am strahlenempfindlichsten sind die Zellen in der späten G2-Phase zu Beginn der Mitose. (entnommen Hall& Giaccia 2012)

Für Zellen, die sich in der S-Phase befinden, ist der Mechanismus, der zur Entstehung von Chromosomenaberrationen führt, noch nicht vollständig aufgeklärt. Zudem sind S-Phasezellen besonders strahlenresistent und Tumore weisen einen höheren Anteil an S-Phase Zellen auf. Somit stellt die S-Phase ein besonders interessantes Ziel für eine gerichtete Krebstherapie dar. Daher ist es wichtig zu untersuchen, unter welchen Umständen Zellen in der S-Phase für zum Beispiel Bestrahlung sensitiver gemacht werden können und wie reparaturkompetente Zellen sowie reparaturinkompetente oder Tumorzellen auf Bestrahlung oder Behandlung mit anderen DNA-schädigenden Agenzien reagieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die Manifestation von Chromosomenaberration nach ionisierender Bestrahlung mit der durch alleinigen Erzeugung von Basenschäden/Einzelstrangbrüchen zu vergleichen, um zu überprüfen ob durch ionisierende Bestrahlung erzeugte Basen/Einzelstrangbrüche unter Replikation die zelluläre Resistenz in der S-Phase beeinflussen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. CV-1 Zellen

Alle in dieser Dissertationsschrift beschriebenen Untersuchungen wurden an der Zelllinie CV-1 durchgeführt. Die Zelllinie CV-1 wurde 1964 aus der Niere eines erwachsenen männlichen afrikanischen grünen Affen (*Cercopithecus aethiops*) isoliert. Durch Transfektion mit dem Simian Virus 40 (SV40) wurde so eine permanente Zelllinie hergestellt. CV-1 Zellen zeigen eine fibroblastenähnliche Struktur und wachsen adhärent. CV-1 Zellen haben keine Reverse Transkriptase. (<http://www.microscopyu.com/moviegallery/livecellimaging/cv1/index.html>)

3.2. Zellkultur

Die Zelllinie CV-1 wurde in DMEM-Medium mit 4 mM L-Glutamin (2% 200mM) und Zusatz von 5% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin in Suspensionszellkulturflaschen bei 37°C in mit 10% CO₂ angereicherter Luft in einem Wärmeschrank kultiviert.

Die Zellen wurden alle 7-10 Tage umgesetzt. Dafür wurde das alte Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurde auf die Zellen Trypsin gegeben und die Flaschen wurden für einige Minuten in einem Wärmeschrank bei 37°C gelagert. Nachdem die Zellen sich gelöst hatten, wurde das Trypsin mit DMEM-Medium inaktiviert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Coulter Zellzählers bestimmt. Anschließend wurden die Zellen nach Bedarf wieder ausgesäht.

3.3. Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mit einer Röntgenröhre bei einem Röhrenstrom von 20 mA und einer Spannung von 200 kV sowie einem 0.5 mm starken Kupfer-Filter im Strahlengang. Die Zellkulturen wurden im exponentiellen Wachstum der Zellen bei Raumtemperatur mit einer Dosisleistung zwischen 1- 3 Gy/min bestrahlt. (Die Dosisleistung war von der Tischhöhe und der Flaschengröße abhängig.)

3.4. Zellsynchronisierung mit unterschiedlichen Agenzien

Um herauszufinden, welches Agens die Zellen am stärksten synchronisiert bei gleichzeitiger geringer Schädigung, wurden die Zellen durch Thymidin-Überschuss, Aphidicolin-Gabe und Isoleucinentzug synchronisiert.

3.4.1. Synchronisierung durch einen Thymidin-Block

Die Zellen wurden mit einem Überschuss von Thymidin synchronisiert. Durch den Überschuss an Thymidin wird die Thymidinkinase blockiert (Ganten & Ruckpaul 2003). Die Zellen werden in der frühen S-Phase synchronisiert (Bootsma et al. 1964).

Exponentiell wachsende Zellen wurden für 16 h einem Medium mit 10mM Thymidin ausgesetzt. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde thymidin-freies Medium auf die Zellen gegeben, um den Zellen ein synchrones Wachstum zu ermöglichen.

Zur Analyse des Eintritts in die S-Phase wurden parallel mehrere Zellkulturflaschen durch den Thymidin-Block synchronisiert. Nach Entlassen der Zellen wurde stündlich der Anteil an Zellen in der S-Phase und die Zellzyklusverteilung mittels FACS gemessen. Dies wurde für 6 Stunden durchgeführt, um eine Progression durch den Zellzyklus zu erkennen.

3.4.2. Synchronisierung durch Aphidicolin

Die Zellen wurden durch Zugabe von Aphidicolin in das Medium synchronisiert. Aphidicolin ist ein Antibiotikum, das reversibel die DNA-Replikation hemmt, indem es die DNA-Polymerase α und δ außer Funktion setzt. Durch diese Hemmung der DNA-Polymerase kommt es zu einem Anhalten der Zellen an der Grenze zwischen G1-Phase und S-Phase (Pedrali-Noy et al. 1980).

Exponentiell wachsende Zellen wurden für 16 h einem Medium mit 2,5 μ M Aphidicolin ausgesetzt. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde aphidicolin-freies Medium auf die Zellen gegeben, um den Zellen ein synchrones Wachstum zu ermöglichen.

Zur Analyse des Eintritts in die S-Phase wurden parallel mehrere Zellkulturflaschen durch Aphidicolin synchronisiert. Nach Entlassen der Zellen wurde stündlich der Anteil an Zellen in der S-Phase und die Zellzyklusverteilung mittels FACS gemessen. Dies wurde für 6 Stunden durchgeführt, um eine Progression durch den Zellzyklus zu erkennen.

3.4.3. Synchronisierung durch Isoleucinentzug

Isoleucinentzug synchronisiert die Zellen in der G1-Phase. Durch den Entzug der essentiellen Aminosäure können die Zellen nicht im Zellzyklus fortschreiten und arretieren in der G1-Phase. Isoleucinentzug wirkt in Zellen regulatorisch auf die Replikation des Genoms (Tobey & Ley 1971).

Um Zellen durch Isoleucinentzug zu synchronisieren, wurden exponentiell wachsende Zellen

zweimal mit PBS gewaschen und dann 36 Stunden mit isoleucinfreiem Medium inkubiert (DMEM-Isoleucinfrei, 5% isoleucinfreies FCS, 2% L-Glutamin, 1% Pen/Strep). Nach 36 Stunden wurden die Zellen wieder zweimal mit PBS gewaschen und es wurde normales Medium auf die Zellen gegeben.

Zur Analyse des Erreichens der S-Phase wurden parallel mehrere Zellkulturflaschen durch Isoleucinentzug synchronisiert. Beginnend 5 h nach Entlassen der Zellen aus der Synchronisation wurden die Zellen stündlich 12 Stunden lang bis 16 h nach Entlassen aus der Synchronisation für die FACS-Messung fixiert.

3.5. Durchflusszytometrie: Bestimmung der Zellzyklusverteilung synchronisierter Zellkulturen, insbesondere des Anteils der S-Phase

Für die geplanten Experimente mit den CV-1 Zellen war es notwendig, die Zellen in ihrem Zellzyklus zu synchronisieren. Um den Zeitpunkt herauszufinden, in dem am meisten Zellen in der S-Phase waren, wurden synchronisierte Zellkulturen mit der Durchflusszytometrie analysiert.

Für jedes synchronisierende Agens wurden mehrere Proben im Abstand von einer Stunde fixiert.

3.5.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Zellen aus der zu untersuchenden Probe werden im Durchflusszytometer zunächst durch die sogenannte „hydrodynamische Fokussierung“ der Gestalt nach einzeln in einem sehr feinen Flüssigkeitsstrahl angeordnet, sodass sie einzeln die Messvorrichtung des Gerätes passieren. Beim Passieren der Messvorrichtung wird ein Laserstrahl unterbrochen und dessen Licht gestreut. Diese Streuung wird von Detektoren registriert und quantifiziert. Die Streuung in Flussrichtung bezeichnet man als FSC („*forward scatter*“). Sie wird durch die Zellgröße beeinflusst. Die rechtwinkelig zur Flussrichtung entstehende Streuung dagegen bezeichnet man als SSC („*side-ward scatter*“). Sie gibt Auskunft über die Granularität der Zellen. Die Zellen können vor der Messung zusätzlich mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelt werden. Somit kann die durch das Laserlicht angeregte Fluoreszenz gemessen werden. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt dabei üblicherweise in drei typischen Emissionsspektren (FL-1, FL-2 und FL-3).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen an einem FACScan Durchflusszytometer durchgeführt. Propidiumjodid wurde als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Nach Anregung des Propidiumjodid durch den geräteinternen Argonlaser kann das emittierte Licht hauptsächlich im Bereich FL-2 gemessen werden. Die Auswertung der Messdaten erfolgte computergestützt mit

Hilfe der Software ModFit 3.0.

3.5.2. *Messung von Zellzyklusverteilung und DNA-Gehalt*

Bei der Bestimmung der anteilmäßigen Verteilung der Zellen einer Zelllinie in einer gegebenen Probe auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus macht man sich die physiologischen Veränderungen im DNA-Gehalt der Zellkerne während des Durchlaufens des Zellzyklus zunutze. Eine einzelne Zelle in der G1-Phase (bzw. G0-Phase) hat einen einfachen DNA-Gehalt, der als $2n$ bezeichnet wird. So kann man für die G2/M-Phase einen genau verdoppelten DNA-Gehalt von $4n$ erwarten. In der zeitlich dazwischen liegenden S-Phase sollte der DNA-Gehalt von $2n$ auf $4n$ stetig zunehmen. In der Tat kommen diese theoretisch zu erwartenden Werte des DNA-Gehalts proliferierender Zellen denen in der Realität messbaren sehr nahe (Gray 1974).

Die Zellen der zu untersuchenden Probe wurden in Ethanol fixiert und RNA-Moleküle durch Zugabe von RNase degradiert. Vor der Messung im Durchflusszytometer wurden dann die DNA-Moleküle mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid markiert. Die im Fluoreszenzbereich FL-2 gemessene Emission pro Zelle korreliert dann direkt mit deren DNA-Gehalt (Crissman et al. 1976).

Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden in dieser Arbeit synchronisierte Zellen im Abstand von einer Stunde fixiert, um eine Progression der Zellen durch die S-Phase zu bestimmen. Der Zeitpunkt, zu dem sich die meisten Zellen in der S-Phase befanden, galt als Ausgangspunkt für die weiteren Experimente.

3.5.3. *Zellfixierung und Messung am FACScan*

Zur Messung wurden wenn möglich je 1×10^6 Zellen der synchronisierten Zelllinie CV-1 im exponentiellen Wachstum verwendet. Die Zellen wurden im Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (5 min. mit 1.200 rpm) und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation der Zell-PBS-Lösung wurde das resultierende Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde in 6ml eiskaltes (-20°C) Ethanol getropft. Die nach dieser Prozedur fixierten Zellen konnten über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

Unmittelbar vor der Messung am FACScan wurden die fixierten Zellen abzentrifugiert, einmal in 3 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 500 μl einer RNase-Propidiumjodid-PBS-Lösung (siehe Puffer- und Waschlösungen) aufgenommen und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Probe direkt im FACScan analysiert. In die Analyse gingen stets mindestens 30.000 Zellen ein. Die Auswertung,

Interpretation und graphische Darstellung der Messwerte erfolgte softwaregestützt (ModFit LT 3.0).

3.5.4. Bestimmen des S-Phase Anteils synchronisierter Zellkulturen

Um zu bestimmen wann die Zellen nach den unterschiedlichen Synchronisierungsmethoden in die S-Phase eintraten, wurden die Zellen synchronisiert und entlassen. Da Aphidicolin und Thymidin die Zellen kurz vor der S-Phase anhalten, wurden die Zellen direkt nach dem Entlassen aus der Synchronisierung fixiert, sowie danach jede Stunde für weitere 5 Stunden. Bei der Synchronisierung durch Isoleucinentzug wurden die Zellen entlassen und zwischen 5 und 16 Stunden nach Entlassen fixiert. In der Zellzyklusanalyse wurde der Anteil der Zellen in der S-Phase bestimmt.

3.6. Bestimmung von Chromosomenaberrationen mittels Präparation von Metaphasen

3.6.1. Einleitung zur Methode der Bestimmung von Chromosomentyp- und Chromatidtyp-aberrationen nach Schädigung

Induzierte DNA-Doppelstrangbrüche führen über fehlerhafte oder nicht erfolgte Reparatur zu Chromosomentyp- oder Chromatidtypaberrationen (Bryant 2004). Je nachdem in welcher Phase des Zellzyklus sich eine Zelle zum Zeitpunkt der Schadensinduktion befindet, entscheidet darüber, welcher Typ von Aberration entsteht (Sax 1940). In der vorliegenden Arbeit wurden durch Bestrahlung und Wasserstoffperoxid induzierte Schäden untersucht. Untersucht wurde im Speziellen, wie sich das Schadensmuster während des Zellzyklus verändert und die Menge der Aberrationen mit zunehmender Schädigung.

Um Chromosomenaberrationen zu untersuchen, wurden sogenannte Metaphasepräparate hergestellt.

Nur in der Mitose des Zellzyklus sind die einzelnen Chromosomen so stark kondensiert, dass sie nach speziellen Färbungen einer lichtmikroskopischen Untersuchung zugänglich werden. Um sicherzustellen, dass sich in einer zu untersuchenden Probe eine ausreichend große Anzahl an Zellen in der Mitose befindet, wird der Zellkultur über einen bestimmten Zeitraum (4-6 Stunden) Colcemid, ein synthetisches Analogon des Spindelfasergiftes Colchicin, zugesetzt. Die Ausbildung des Spindelapparats wird gehemmt. Ohne den Spindelapparat ist es der Zelle nicht möglich, die Schwesterchromatiden voneinander zu trennen und zu den Zellpolen zu transportieren. Dadurch werden die Chromosomen praktisch in der Äquatorialebene des Metaphasezellkerns blockiert.

3.6.2. *Metaphasepräparation und Metaphasen-Präparate*

Unterschiede in den Untersuchungen der Aberrationstypen ergeben sich nur in der Vorbehandlung der Zellkulturproben. Die Vorbehandlung der unterschiedlichen Proben wird in den jeweiligen Unterkapiteln im Ergebniskapitel beschrieben. Die Metaphasepräparation selbst jedoch ist stets die gleiche und wird im Folgenden beschrieben:

1. Überführung des Mediums (vor der Trypsinierung) und der Zellsuspension aus der Zellkulturflasche in ein Falcon-Röhrchen.
2. Zentrifugieren für 5 min mit 1.200 rpm.
3. Zellen 1x in PBS waschen und erneut zentrifugieren.
4. Tropfenweise und unter vorsichtigem Vortexen werden dann 10ml einer 0,56%igen KCl-Lösung hinzugefügt. Diese hypotone Lösung lässt die Zellen anschwellen und letztendlich aufplatzen, sodass die Zellkerne übrig bleiben.
5. Zentrifugieren für 5 min mit 1.200 rpm.
6. Tropfenweise und unter vorsichtigem Vortexen werden dann 10 ml Carnoy's Fixativ hinzugefügt. Diese Lösung dient der Dehydratation und Fixierung der Zellkerne.
7. Zentrifugieren für 5 min mit 1.200 rpm. Das Zellkernsediment wird danach erneut in 10 ml Carnoy's Fixativ resuspendiert.
8. Titrierung der Zellkernkonzentration in der Lösung auf 1×10^6 Kerne / ml Fixativlösung.

Die so fixierten Zellkerne können über Monate hinweg bei -20°C gelagert werden. Zum Untersuchungszeitpunkt werden dann auf Objektträgern sogenannte Metaphasen-Präparate (oder auch Metaphase-Spreads, nach „*spread*“ = engl. für „ausbreiten“) in folgender Weise hergestellt:

9. Mit Hilfe eines Schwämmchens o.ä. wird ein dünner Film aus Wasser auf dem Objektträger produziert.
10. Jetzt werden in einer zügigen Bewegung ca. 30 μl der Zellkernsuspension auf den Objektträger aufgetropft. Durch die Sogkraft des an der Grenze zwischen Wasser und Fixativlösung reißenden Wasserfilmes werden die Zellkerne über den Objektträger ausgebreitet, wobei die empfindlicheren Kernmembranen der Metaphasekerne rupturieren und dadurch idealerweise die einzelnen, zu einer Metaphase gehörenden Chromosomen in einem jeweils engen Bereich gut ausgebreitet werden.
11. Die Objektträger werden luftgetrocknet.
12. Die luftgetrockneten Objektträger werden für 12-15 min in einem Giemsa-Färbebad

(150ml kaltes PBS + 5ml Giemsa) gefärbt und in 6 Wasserbädern entfärbt.

13. Erneutes Lufttrocknen der Objektträger.

14. Eindeckeln der Objektträger mit 2 Tröpfchen Entellan.

3.6.3. *Bestimmung des Anteils der mitotischen Zellen*

Zur Überprüfung, welche der oben genannten Synchronisierungsmethoden die geeignetste ist, wurden synchronisierte Zellen fixiert und auf den Anteil der mitotischen Zellen sowie auf durch die Synchronisierung entstandene Schäden untersucht. Den synchronisierten Zellen wurde nach Durchlaufen der S-Phase alle vier Stunden Colcemid gegeben, sodass alle vier Stunden die Zellen fixiert wurden und untersucht werden konnten. Dies wurde für jede Synchronisierungsmethode mit mindestens 4 Proben untersucht. Um einen genaueren Zeitpunkt des maximalen Anteils der Mitose zu ermitteln, wurden alle zwei Stunden um den Punkt der maximalen Mitosen erneut Proben analysiert.

3.6.4. *Instabile Chromosomentypaberrationen: Präparation, Messung und Auswertung*

Durch Wasserstoffperoxid oder durch Strahlung induzierte, nicht reparierte DNA-Doppelstrangbrüche führen zu strukturellen Veränderungen (= Aberrationen) in den Chromosomen. Bei einer Schädigung in der G1-Phase betreffen die Schäden beide Chromatiden der in der Metaphasepräparation sichtbaren Chromosomen. Da Schäden aus der G1-Phase in der S-Phase mitrepliziert werden, betreffen diese Veränderungen immer beide Chromatiden im Metaphasepräparat. Diese Aberrationen werden Chromosomentypaberrationen oder G1-Schäden genannt. Aberrationen, die in der (ersten) Mitose verloren gehen, sich also nicht in beiden Tochterzellen wiederfinden, bezeichnet man als instabil. Zu den instabilen intrachromosomalen Aberrationen zählen die terminale und die interstitielle Deletion, die beide mit der Bildung azentrischer Fragmente einhergehen. Dizentrische Chromosomen, die ebenfalls mit (mindestens) einem azentrischen Fragment assoziiert sind, gehören ebenfalls zu den instabilen interchromosomalen Aberrationen.

Bei Schädigung in der G2-Phase sind die Chromosomen schon repliziert und bestehen aus 2 Chromatiden. Werden die Zellen in dieser Phase des Zellzyklus geschädigt und nicht repariert, so entstehen an einzelnen Chromatiden der Chromosomen Schäden, die man als Lücken („gaps“) im Chromosom oder als verkürzte Arme erkennen kann. Diese Aberrationen werden Chromatidtypaberrationen oder G2-Schäden genannt. Deutlich seltener können komplexe Aberrationen wie zum Beispiel triradiale Chromosomen entstehen.

Werden die Zellen in der S-Phase des Zellzyklus geschädigt, so zeigen sich Kombinationen aus Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen.

Des Weiteren können strukturelle Veränderungen innerhalb einzelner Chromosomen (in-trachromosomal) oder mehrere Chromosomen (interchromosomal) auftreten (Savage 1975); diese Veränderungen kann man in dem Metaphasepräparat nicht erkennen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frequenz des Auftretens zusätzlicher azentrischer Fragmente, dizentrischer Chromosomen sowie nicht reparierter Doppelstrangbrüchen nach Schädigung zu unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus bestimmt. Diese Aberrationen bilden zusammen die sogenannten letalen Chromosomenaberrationen.

Dafür wurden die Zellen im exponentiellen Wachstum synchronisiert und nach dem Entlassen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit jeweils 0 bis 6 Gy bestrahlt oder mit 50 - 200 μ M Wasserstoffperoxid für jeweils 4 h geschädigt. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C inkubiert und 4 h vor Erreichen der Mitose wurde 1 μ l/ml Colcemid gegeben, um die Zellen in der ersten Mitose nach der Schädigung zu fixieren. Die Metaphasepräparation erfolgte dann in der unter 3.6.2. beschriebenen Weise.

Die Auswertung der mit Giemsa gefärbten Präparate erfolgte lichtmikroskopisch unter Öl-immersion bei einer 100-fachen Vergrößerung. Zur Verbesserung der Auswertung wurde eine computergestützte Bildauswertung (AxioVision 4.7.2.) hinzugezogen. Pro Bestrahlungswert wurden zwei Objektträger angefertigt und pro Objektträger wenn möglich 25 Metaphasen gezählt. Die Auszählung erfolgte verblindet. Bei der Zählung wurde die Anzahl aller Chromosomen einschließlich aller Fragmente mit zwei Chromatiden pro Metaphase bestimmt (= Chromosomenfragmente oder auch Chromosomentypaberrationen). Zusätzlich wurden auch die azentrischen Fragmente gezählt (Chromatidtypaberrationen). Dizentrische sowie triradiale Chromosomen wurden extra gezählt.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte softwaregestützt (GraphPad Prism® 4.03).

Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Schäden, die in synchronisierten CV-1 Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Zellzyklus gefunden wurden und unterschiedliche Schadensmuster aufweisen.

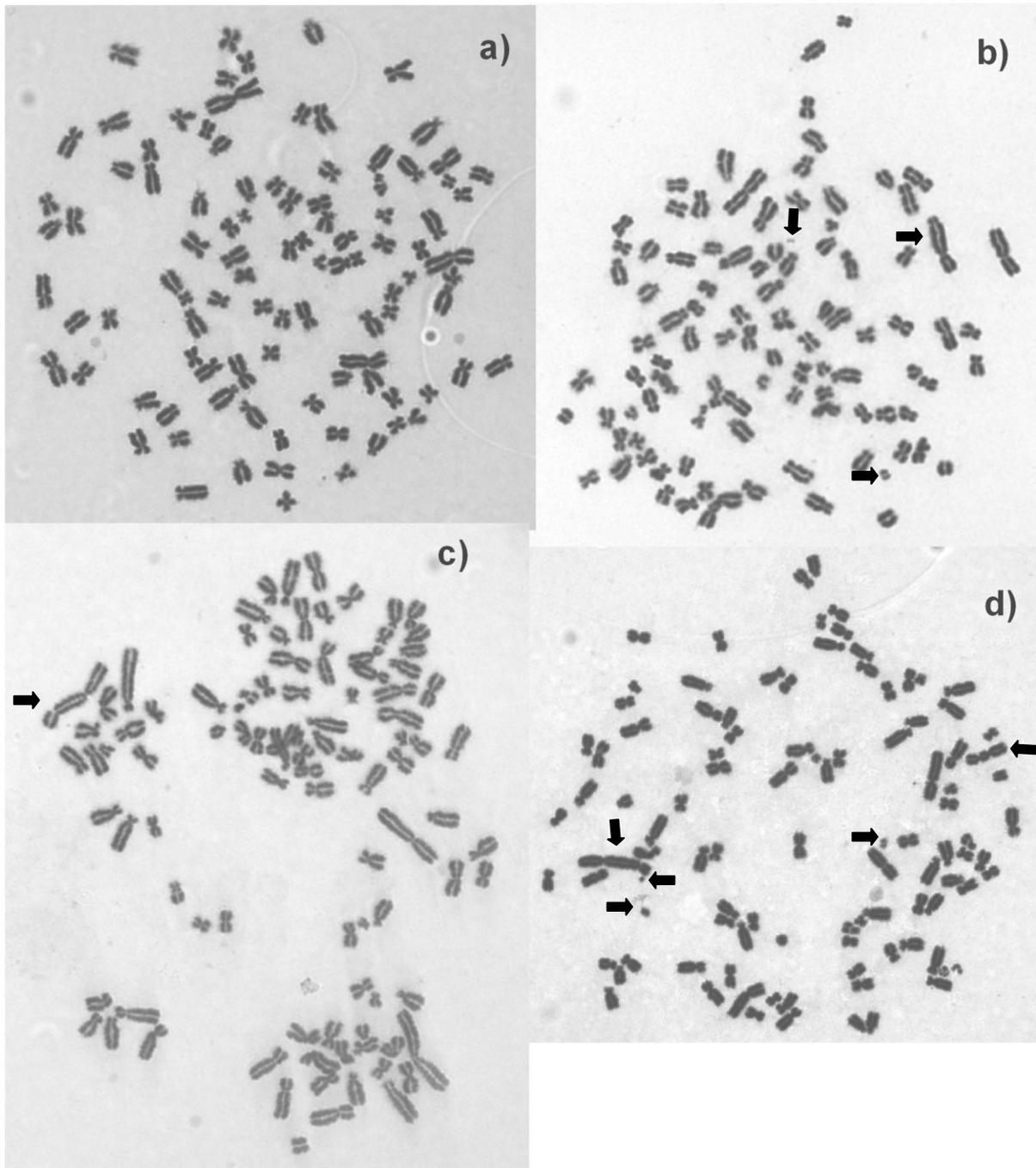


Abb. 6: a) zeigt eine CV-1 Zelle ohne Schäden. b) zeigt eine CV-1 Zelle mit 3 Chromosomentypaberrationen. c) zeigt eine CV-1 Zelle mit einer Chromatidtypaberration. d) zeigt eine Zelle mit 2 dizentrischen Chromosomen, 2 Chromatidtypaberrationen und einer Chromosomentypaberration

3.7. Materialien

3.7.1. Chemikalien und Fertiglösungen

Chemikalie / Lösung	Herstellerfirma, Hauptsitz
Aphidicolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Colcemid (Demecolcine)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Destilliertes RNase freies Wasser	Invitrogen, Carlsbad (USA)
DMEM-Medium + 4,5 g/l Glucose	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Entellan	Merck, Darmstadt
Essigsäure	J.T.Baker, Deventer (NL)
Ethanol	Merck, Darmstadt
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂ 8,8 M	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Methanol	J.T.Baker, Deventer (NL)
FBS-Superior	Biochrom, Berlin
FBS-PAN sterile filtered	Biotech GmbH, Aidenach
PAN DMEM-Medium – L-Isoleucine	Biotech GmbH, Aidenach
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Propidiumjodid (PI)	MP Biomedicals, Illkirch (F)
RNase (Ribonuclease A from Bovine Pancreas)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Thymidine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin .05% EDTA	Invitrogen, Carlsbad (USA)

3.7.2. Geräte, Computersoftware

Gerät / Software	Herstellerfirma, Hauptsitz
------------------	----------------------------

Röntgenanlage

RS225 Gulmay Medical, West Midlands (GB)

Zentrifugen

Megafuge 1.0 R Heraeus/Thermo, Waltham (USA)
 MiniSpin Plus Eppendorf

PH-Meter

Checker Hanna Instruments, Woonsocket (USA)

Durchflusszytometer

FACScan Becton Dickinson, Heidelberg

Mikroskop

Axioplan 2 imaging mit CF 15/4 MCC Carl Zeiss, Göttingen
 Observer Z1 Carl Zeiss, Göttingen

Software

GraphPad Prism 4.03 GraphPad Software, San Diego (USA)
 AxioVision 7.4.2. Carl Zeiss, Göttingen
 ModFit LT 3.0 Verity Software House, Topsham (USA)

3.7.3. Puffer- und Waschlösungen

Puffer- / Waschlösung	Zusammensetzung und Anwendungshinweise
Carnoy's Fixativ	Die Lösung besteht zu einem Volumenanteil aus Essigsäure und drei Volumenanteilen aus Methanol.
Colcemidlösung	1 mg Demecolcine wird in 5 ml PBS gelöst. Diese Arbeitslösung der Konzentration 0,2 mg Colcemid / ml PBS kann bei 4°C über mehrere Monate gelagert werden.

- PBS - Phosphate Buffered Saline In 1.000 ml Aqua dest. werden gelöst:
8,0 g Natriumchlorid,
0,2 g Kaliumchlorid,
0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat,
1,78 g Di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat.
- RNase-Propidiumjodid-PBS Lösung Propidiumjodid-Stammlösung (Lagerung bei 4°C):
10 mg Propidiumjodid / 1 PBS Lösung.
Unmittelbar vor Gebrauch werden 10 ml der PI-
Stammlösung mit 0,01g RNase gemischt.

4. ERGEBNISSE

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit zeigt eine deutliche Variation im Verlauf des Zellzyklus, mit einer Resistenz in der S-Phase und einer hohen Sensitivität in der Mitose. Bei detaillierter Betrachtung der S-Phase zeigt sich allerdings, dass Zellen beim Eintritt in die S-Phase ebenfalls extrem empfindlich sind und erst zu späteren Zeitpunkten sehr resistent gegenüber ionisierender Bestrahlung werden. Dies wird im Allgemeinen auf Unterschiede in der Verfügbarkeit von DNA Reparaturfaktoren und Zellzykluskontrollpunkten zurückgeführt. So wird unter anderem auch angenommen, dass im Verlauf der S-Phase in der die zunächst einzeln vorliegenden Chromatiden durch Replikation ein Schwesterchromatid erstellen, eine Matrize entsteht, die aktiv zur fehlerfreien DNA-Reparatur genutzt und somit Ursache für die zunehmende Strahlenresistenz während der S-Phase sein könnte. Diese Hypothese soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Ein detailliertes Verständnis dieser Prozesse könnte langfristig zu einer effektiveren Strahlentherapie insbesondere in proliferierenden Zellen führen.

Zu diesem Zweck wurde die Ausbildung von Chromosomenaberrationen im Verlauf der S-Phase nach ionisierender Bestrahlung hinsichtlich der induzierten Schadenstypen und ihre Prozessierung untersucht. Für die Beantwortung dieser Frage wurden zunächst verschiedene Methoden zur Synchronisierung von Zellen etabliert und hinsichtlich ihrer eigenen Schadensinduktion überprüft. Im Weiteren wurden Zellkulturen synchronisiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus mit ionisierender Bestrahlung und Wasserstoffperoxid geschädigt. Dabei wurden die geschädigten Zellen hinsichtlich der Bildung von Chromosomentypaberrationen und Chromatidtypaberrationen analysiert.

4.1. Wachstumskinetik

Um den idealen Zeitpunkt für Untersuchungen an ausschließlich exponentiell wachsenden Zellen zu bestimmen, wurde zunächst eine Wachstumskurve erstellt. Dazu wurden in zwölf Zellkulturflaschen jeweils 1×10^5 Zellen ausgesät und im Brutschrank belassen. Alle 24 h wurde die Zellzahl bestimmt.

Abbildung 7 zeigt den Verlauf der Wachstumskurve. In den ersten 24 h nach Aussaat erhöhte sich die Zellzahl nur geringfügig von 1×10^5 auf $1,8 \times 10^5$. 24 h nach der Aussaat zeigte sich ein exponentielles Wachstum, so dass nach 48 h eine Zellzahl von $5,3 \times 10^5$ Zellen bestimmt wurde.

Das exponentielle Wachstum setzte sich in den folgenden Tagen fort, sodass nach 216 h (9 Tagen) ein Maximum von 4×10^6 Zellen pro Flasche erreicht wurde. Nach Erreichen der maximalen Zellzahl von 4×10^6 nahm die Zellzahl in den folgenden Tagen stark ab und sank auf 1×10^6 nach 312 h (13 Tage), um dann in den folgenden Tagen weniger stark zu sinken. Nach 384 h (16 Tagen) wurde das Experiment beendet. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich $7,5 \times 10^5$ Zellen in der Zellkulturflasche. Da vom dritten bis zum neunten Tag ein exponentielles Wachstum in den Flaschen festgestellt wurde, wurden alle folgenden Experimente 4-6 Tage nach Aussaat durchgeführt.

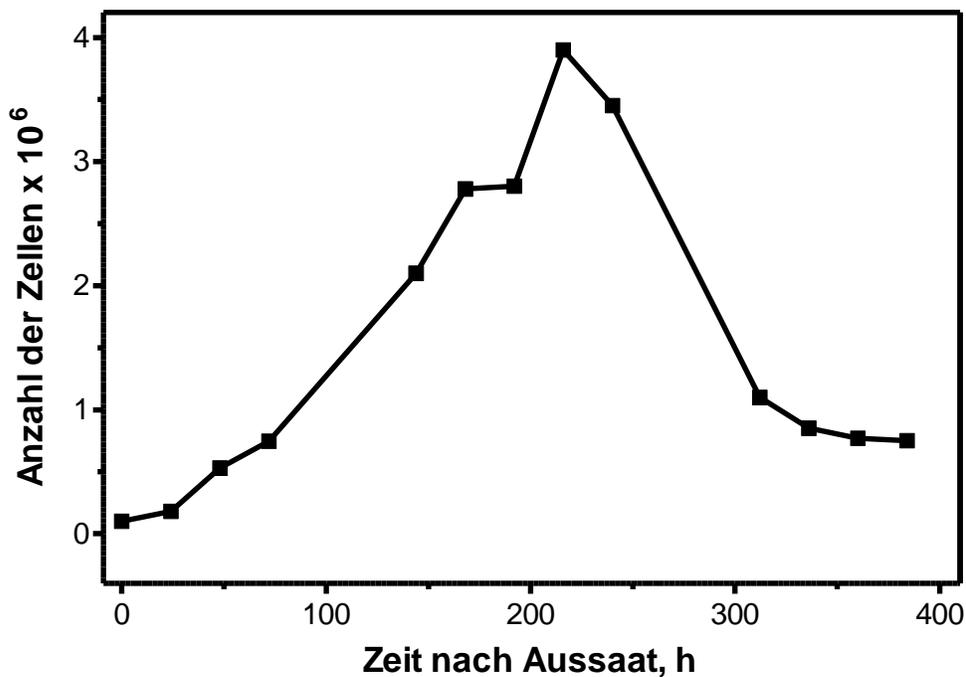


Abb. 7: Wachstumskurve der Zelllinie CV1. CV1 Zellen wurden ausgesät und die Zellzahl wurde über einen Zeitraum von 2 Wochen täglich bestimmt. Aufgetragen ist die Zellzahl gegen die Zeit nach Aussaat.

4.2. Synchronisierung von Zellen in der S-Phase mit Aphidicolin, Thymidin und Isoleucinentzug

Zunächst wurde überprüft, welches Agens die stärkste Synchronisierung bei gleichzeitig geringster Schädigung in CV-1 Zellen erreicht. Für die Synchronisierung wurden Aphidicolin, Thymidin und Isoleucinentzug verwendet. Für die weiteren Experimente wurde diejenige Synchronisierungsmethode verwendet, die am deutlichsten synchronisiert und zudem am wenigsten

schädigt. Da die Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nach Entlassen aus dem jeweiligen Block im Zellzyklus geschädigt werden sollten, wurde die Zellzyklusverteilung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Entlassen mittels FACS-Analyse analysiert und bestimmt.

4.2.1. Synchronisierung in der S-Phase mit Aphidicolin

Die Zellkulturen wurden 16h lang mit Aphidicolin behandelt und im Anschluss über einen Zeitraum von 6 h stündlich fixiert. Es wurde mit der Fixierung direkt nach Entlassen aus der Synchronisierung begonnen. Abbildung 8 zeigt den Anteil der S-Phase Zellen nach Synchronisierung mit Aphidicolin. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Direkt nach Entlassen war keine Erhöhung des S-Phase Anteils zu erkennen. Nach 2 h war ein deutlicher Anstieg des S-Phaseanteils auf über 60 % zu erkennen. Das Maximum der S-Phase Zellen wurde nach 3 bis 4 h mit 80% erreicht. 5 h nach Entlassen aus dem Aphidicolin-Block sank der S-Phase Anteil der Zellen wieder auf ca. 20 %.

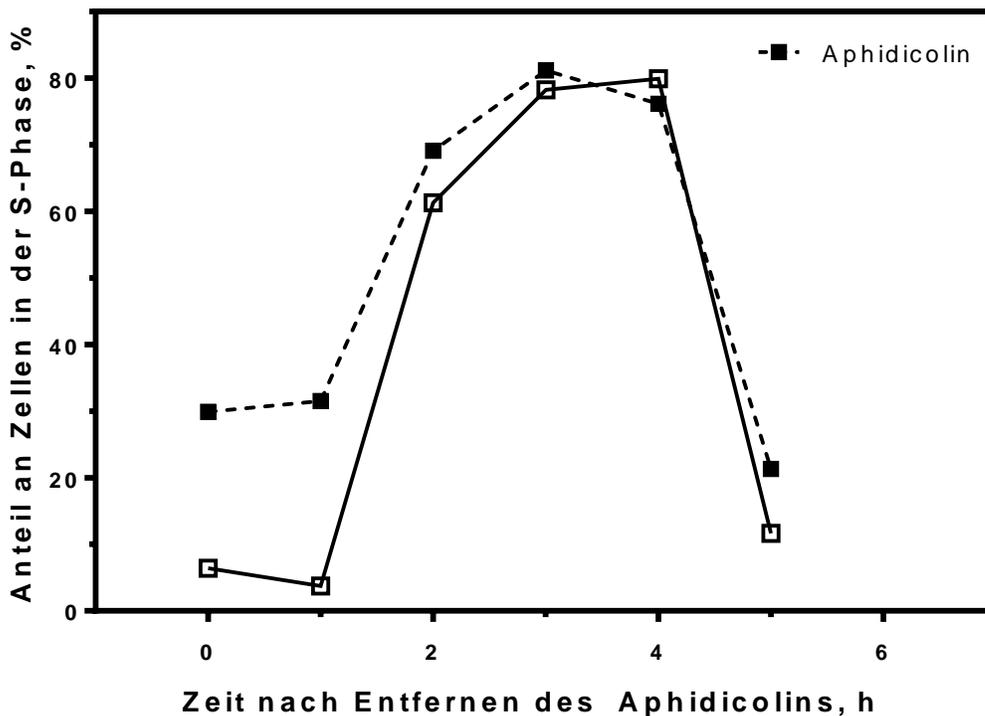


Abb. 8: Anteil von Zellen in der S-Phase nach Synchronisierung mit Aphidicolin.

CV-1 Zellen wurden 16 h mit 2,5 μ M Aphidicolin behandelt und anschließend stündlich fixiert. Aufgetragen ist der Anteil von Zellen in der S-Phase gegen die Zeit nach Entlassen aus dem Aphidicolin-Block zweier unabhängiger Experimente.

4.2.2. Synchronisierung in der S-Phase mit Thymidin

Die Zellkulturen wurden 16 h lang mit Thymidin synchronisiert und über einen Zeitraum von 6 h stündlich fixiert. Begonnen wurde mit der Fixierung, direkt nach dem Entlassen aus dem Thymidin-Block. Abbildung 9 zeigt den Anteil der S-Phase Zellen nach Synchronisierung mit Thymidin. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Direkt nach dem Entlassen war eine deutliche Erhöhung des S-Phase Anteils zu erkennen. Das Maximum an S-Phase Zellen wurde nach 1 bis 4 h mit fast 80% erreicht. 5 h nach Entlassen war der S-Phase-Anteil der Zellen wieder auf unter 20 % gesunken.

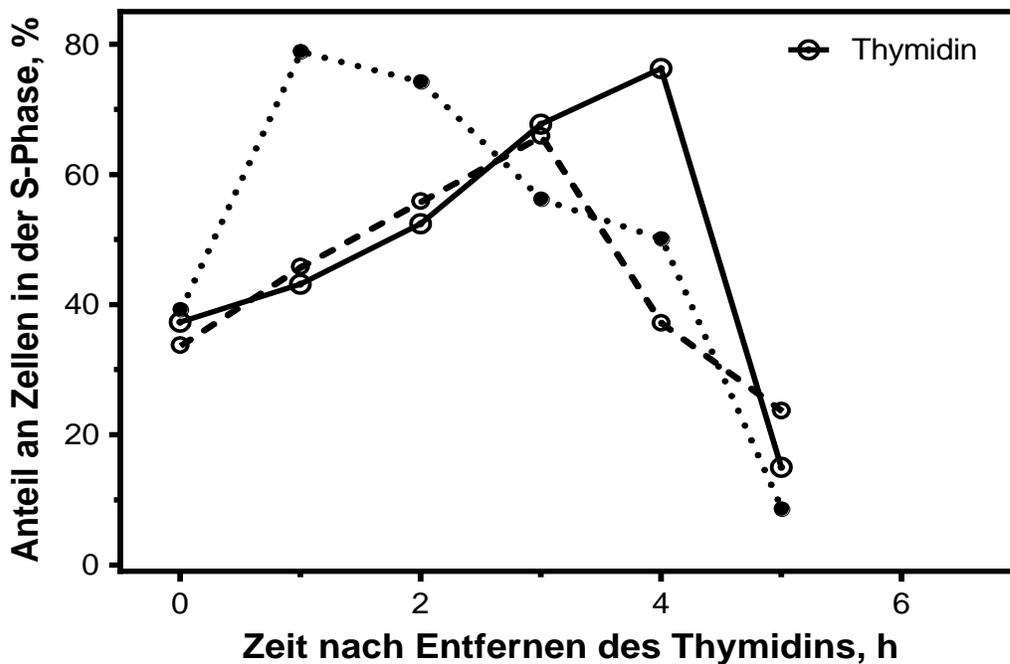


Abb. 9: Anteil von Zellen in der S-Phase nach Behandlung mit Thymidin. CV-1 Zellen wurden 16 h mit 10 mM Thymidin behandelt und anschließend stündlich fixiert. Aufgetragen ist der Anteil von Zellen in der S-Phase gegen die Zeit nach Entlassen aus dem Thymidin-Block von drei unabhängigen Experimenten

4.2.3. Synchronisierung in der S-Phase durch Isoleucinenzug

Die Zellen wurden 36 h lang durch den Entzug von Isoleucin synchronisiert und über einen Zeitraum von 12 h nach Entlassen aus dem Isoleucin-Block stündlich fixiert. Es wurde mit der Fixierung 5 h nach Entlassen der Zellen aus der Synchronisation begonnen. Abbildung 10 zeigt den Anteil der S-Phase Zellen nach Synchronisierung durch den Entzug von Isoleucin. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Nach Entlassen aus dem Block wurde ein langsam

ansteigender Anteil an S-Phase Zellen beobachtet, mit einem Anteil von 6 % nach 6 h und einem Anteil von 15% nach 8 h. Ab 9 h nach Entlassen nahm der Anteil der S-Phase Zellen sehr stark zu und erreicht nach 13 h das Maximum mit fast 60%. Danach nahm der S-Phase Anteil der Zellen wieder ab und sank nach 16 h auf 15-30%.

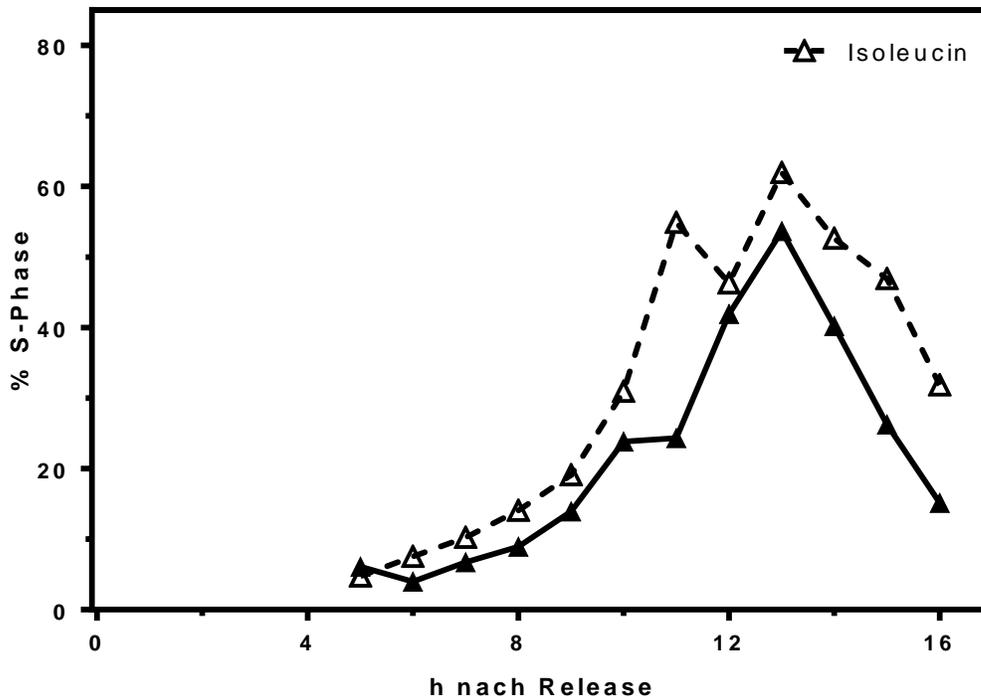


Abb. 10: Anteil von Zellen in der S-Phase nach Behandlung mit Isoleucinentzug. CV-1 Zellen wurde 36 h lang Isoleucin entzogen und nach 5 h für 12 h stündlich fixiert. Aufgetragen ist der Anteil von Zellen in der S-Phase gegen die Zeit nach Release zweier unabhängiger Experimente

4.2.4. Vergleich der verschiedenen Synchronisierungsmethoden

Alle drei Synchronisierungsmethoden erreichten hohe Anteile der S-Phase und je nach Synchronisierungsmethode wurde ein Maximum an S-Phasezellen zu unterschiedlichen Zeiten beobachtet. Die unterschiedlichen Zeitpunkte, zu denen die Zellen maximale Anteile in der S-Phase haben, kamen durch die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Agenzien zustande. Thymidin und Aphidicolin synchronisieren die Zellen an der G1-/S-Phase Grenze, während bei Entzug von Isoleucin die Zellen bereits in der G1-Phase synchronisiert werden. Abbildung 11 zeigt die verschiedenen Synchronisierungsmethoden im Vergleich. Durch Synchronisierung mit Aphidicolin wurde eine sehr deutliche und stärkste Synchronisierung der Zellen in der S-Phase mit 80% nach 3-4 h erzielt. Dagegen konnte durch Synchronisierung mit Thymidin und Isoleuci-

nenztzug ein Maximum um 60% an S-Phase Zellen erreicht werden. Dies wurde nach Synchronisierung mit Thymidin 3h nach Entlassen aus dem Block beobachtet. Nach Synchronisierung mit Isoleucinentzug wurde der maximale Anteil an S-Phase Zellen nach 13h beobachtet.

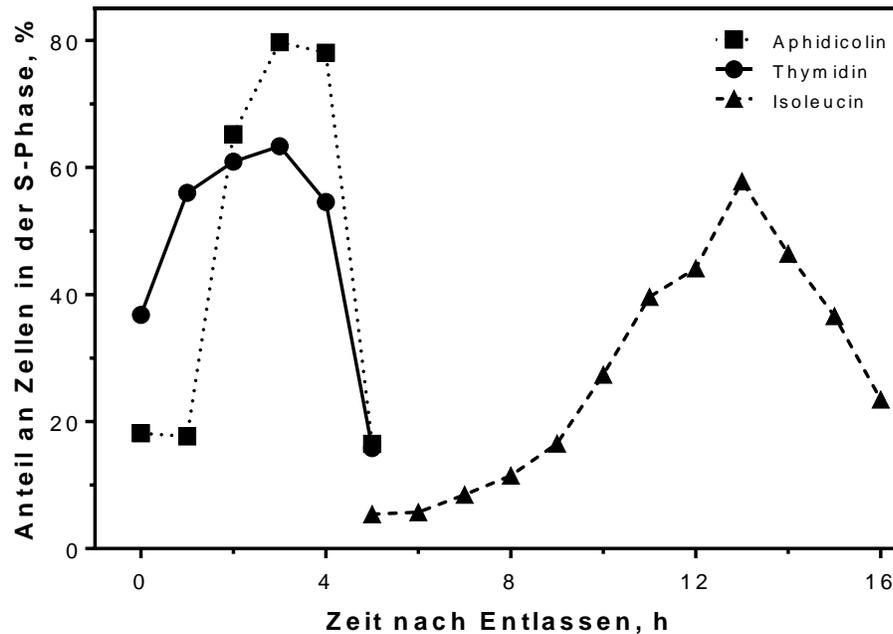


Abb. 11: Anteil der S-Phase Zellen nach Synchronisierung mit unterschiedlichen Agenzien. Die Zellen wurden 16h mit 2,5 μ M Aphidicolin, 10 mM Thymidin oder 36h Isoleucinentzug behandelt. Aufgetragen ist der Anteil an S-Phasezellen gegen die Zeit nach Entlassen aus den unterschiedlichen Synchronisierungsagenzien.

4.3. Bestimmung des Anteils mitotischer Zellen nach Synchronisierung mit Aphidicolin, Thymidin und Isoleucinentzug

Für die Untersuchung von Chromosomenaberrationen ist es essentiell, dass der optimale Zeitpunkt, zu dem die Zellen die erste Metaphase nach Behandlung erreichen, bestimmt wird. Die Zellen wurden synchronisiert und nach Entlassen aus dem Synchronisierungsmedium über einen Zeitraum von 24 h fixiert und der Anteil der Zellen in der Metaphase bestimmt.

Bei Synchronisierung mit Thymidin und Aphidicolin wurde die Fixierung 2 bis 26 h nach Entlassen aus dem Block durchgeführt, zunächst im Abstand von 2 h und zu späteren Zeitpunkten im Abstand von 4 Stunden. Bei Synchronisierung der Zellen durch Entzug von Isoleucin wurde mit der Fixierung nach 10 h begonnen und ebenfalls für 24 h durchgeführt. Die Fixierung wurde zwischen 14 und 26 h alle zwei Stunden durchgeführt, danach alle vier Stunden. Abbildung 12 zeigt den Anteil der Metaphasen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entlassen aus der

Synchronisierung. Mit Thymidin synchronisierte Zellen zeigten ab 4 h nach Entlassen bis 10 h einen stetigen Anstieg mit einem Maximum von 17,6 %, gefolgt von einer Abnahme auf 1,3% nach 12 h. 18 h nach der Synchronisierung steigt der Anteil der Metaphasen erneut an, da die Zellen auch den nächsten Zellzyklus synchron durchlaufen haben und auch in der zweiten Metaphase synchron ankommen. Nach 26 h erreicht der Anteil der Metaphasezellen 8,3%.

Mit Aphidicolin synchronisierte Zellen zeigten einen parallelen Verlauf zur Thymidinsynchronisation. Nach 4 h zeigte sich ein stetiger Anstieg der Zellen mit einem Maximum von 9,5 % nach 10 h. Direkt danach fiel der Anteil der Metaphasezellen auf 1% bei 12 h wieder ab. 18 h nach der Synchronisierung stieg der Anteil der Metaphasen ebenfalls wieder an, da die Zellen auch den nächsten Zellzyklus synchron durchlaufen hatten und auch in der zweiten Metaphase synchron ankommen. Nach 26 h erreicht der Anteil der Metaphasezellen 11,3%.

Durch Isoleucinentzug synchronisierte Zellen zeigten erst ab 10 h einen Anstieg von Metaphasen mit einem Maximum von 12,4% nach 18 h. Danach fiel der Anteil der Metaphasen wieder ab.

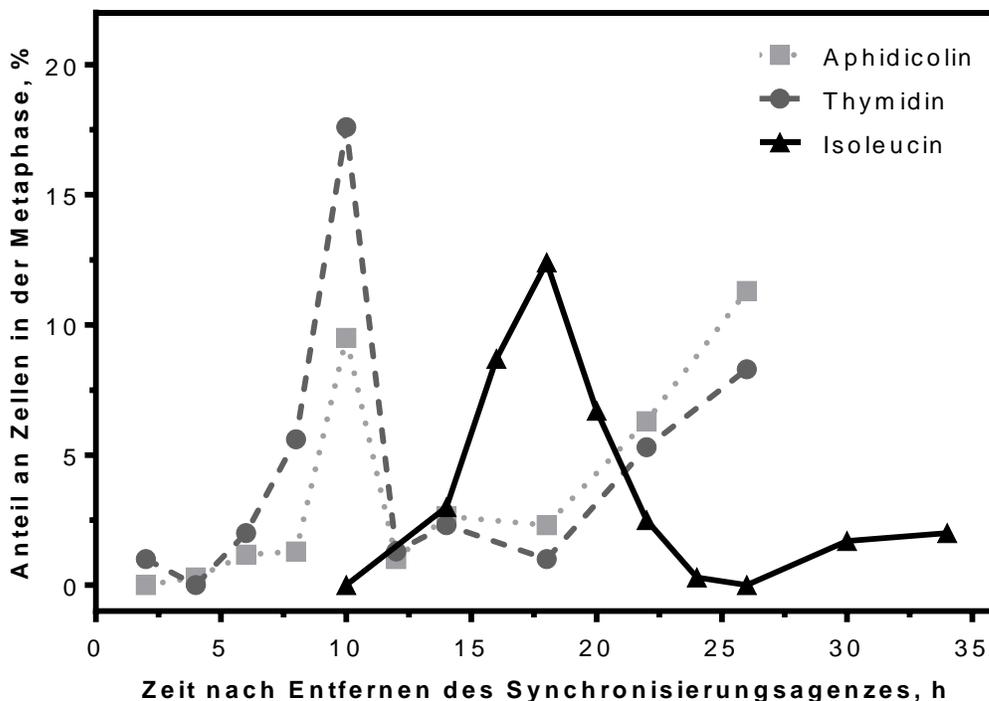


Abb. 12: Anteil der Metaphasezellen nach Synchronisierung mit Thymidin, Aphidicolin und Isoleucinentzug in CV-1 Zellen. Die Zellen wurden synchronisiert entlassen, mit Colcemid behandelt und zu unterschiedlichen Zeiten fixiert. Aufgetragen ist der Anteil der Metaphasen gegen die Zeit in h nach Entlassen für die jeweiligen Agenzien.

Alle drei Agenzien zeigten ein deutliches Maximum von Zellen in der Metaphase zu einem jeweils spezifischen Zeitpunkt. Allerdings konnte durch Synchronisierung mit Aphidicolin nur 10 % der Zellen in der ersten Metaphase beobachtet werden, während durch Synchronisierung mit Thymidin etwa 18 % der Zellen in der Metaphase angereichert werden konnten. Isoleucinenzug zeigte eine maximale Ausbeute von 13 % an Zellen in der Metaphase.

4.4. Bestimmung von Chromosomenaberrationen exponentiell wachsender Zellen im Vergleich zu in der S-Phase synchronisierter Zellen

Die Synchronisierung von Zellen ist ein Eingriff in den natürlichen Zellzyklus und stellt damit selbst eine mögliche Quelle von Chromosomenaberrationen dar. Um zu evaluieren, welche der hier verwendeten Synchronisationsmethoden die Zellen am wenigsten schädigt, wurden synchronisierte und exponentiell wachsende Zellen hinsichtlich der Anzahl von Chromosomenaberrationen untersucht. Dabei wurde zwischen Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen unterschieden (siehe 3.6.4).

4.4.1. Chromosomenaberrationen in exponentiell wachsenden CV-1 Zellen nach Bestrahlung

Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 2, 4 und 6 Gy bestrahlt (Abbildung 13), mit Colcemid behandelt und nach 24 h fixiert. Anschließend wurden die Chromosomentyp- sowie die Chromatidtypaberrationen ausgewertet.

Abbildung 13a und b zeigt die Anzahl der Chromosomenschäden mit steigender Dosis. Ungeschädigte CV-1 Zellen zeigen im Mittel $97,3 \pm 0,1$ Chromosomenfragmente. Dies entspricht dem diploiden Chromosomensatz von CV-1 Zellen mit 98 Chromosomen. Nach Bestrahlung nahm die Anzahl der Chromosomentypaberrationen zu, mit einem Maximum von $2,13 \pm 0,4$ bei 6 Gy. (Abbildung 13a). Für die Dosis von 2 Gy wurden $0,35 \pm 0,2$ und für eine Dosis von 4 Gy $1,3 \pm 0,2$ Chromosomentypaberrationen bestimmt.

Die Anzahl der Chromatidtypaberrationen zeigte ebenfalls einen Anstieg mit der Dosis. Im unbestrahlten Zustand wurden $0,36 \pm 0,08$ Chromatidtypaberrationen beobachtet, bei einer Dosis von 2 Gy $0,54 \pm 0,1$, bei einer Dosis von 4 Gy $0,92 \pm 0,12$ und bei einer Dosis von 6 Gy $1,51 \pm 0,18$ Chromatidtypaberrationen. Es konnte sowohl für Chromosomentyp- als auch Chromatidtypaberrationen eine exponentielle Zunahme mit der Dosis beobachtet werden, wobei dies deutlicher für die Bildung von Chromatidtypaberrationen zu erkennen war.

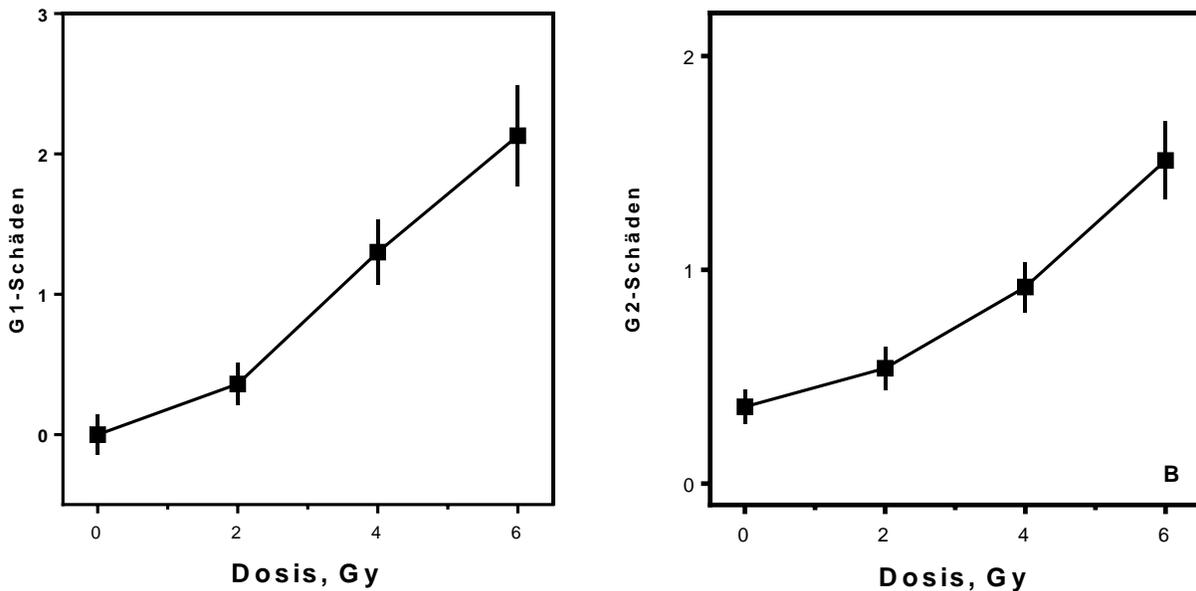


Abb. 13: Chromosomentyp- (G1-Schäden) und Chromatidtypaberrationen (G2-Schäden) nach Bestrahlung in exponentiell wachsenden Zellen. Exponentielle CV-1 Zellen wurden mit 2, 4 und 6 Gy bestrahlt, mit Colcemid behandelt und anschließend fixiert. Aufgetragen ist die Anzahl der Chromosomentyp- (a) bzw. Chromatidtypaberrationen (b) in Abhängigkeit von der Dosis. Fehlerbalken entspricht dem Fehler des Mittelwertes.

4.4.2. Chromosomenaberrationen in Zellen nach Synchronisierung in der S-Phase

Es wurde überprüft, ob die einzelnen Agenzien zur Synchronisierung in der S-Phase ihrerseits zu einer Schädigung der DNA führen. Die Zellen wurden entsprechend der Synchronisierungsmethode behandelt, im Anschluss entlassen und zu verschiedenen Zeiten nach Entlassen aus dem Synchronisierungsblock mit Colcemid behandelt, fixiert und Metaphasen präpariert. Abbildung 14 zeigt die Anzahl der Chromosomentyp- bzw. der Chromatidtypaberrationen nach Synchronisierung mit Aphidicolin, Thymidin oder Entzug von Isoleucin. Zwischen den einzelnen Synchronisierungsmethoden zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Entstehung von Chromosomenaberrationen. So zeigte sich für die Behandlung mit Aphidicolin initial keine vermehrte Anzahl an Chromosomentypaberrationen, nach 24h zeigte sich ein leichter Anstieg der Chromosomentypaberrationen auf $0,37 \pm 0,47$ pro Zelle. Ein vergleichbarer Anstieg der Anzahl der Chromosomentypaberrationen mit der Zeit konnte ebenfalls für die Behandlung der Zellen mit Isoleucin nach 14h und 24h beobachtet werden, 14h $0,10 \pm 0,29$ und $0,25 \pm 0,43$ nach 20h. Die Behandlung mit Thymidin zur Synchronisierung der Zellen in der S-Phase wirkte sich dagegen nicht auf die Anzahl der Chromosomentypaberrationen aus.

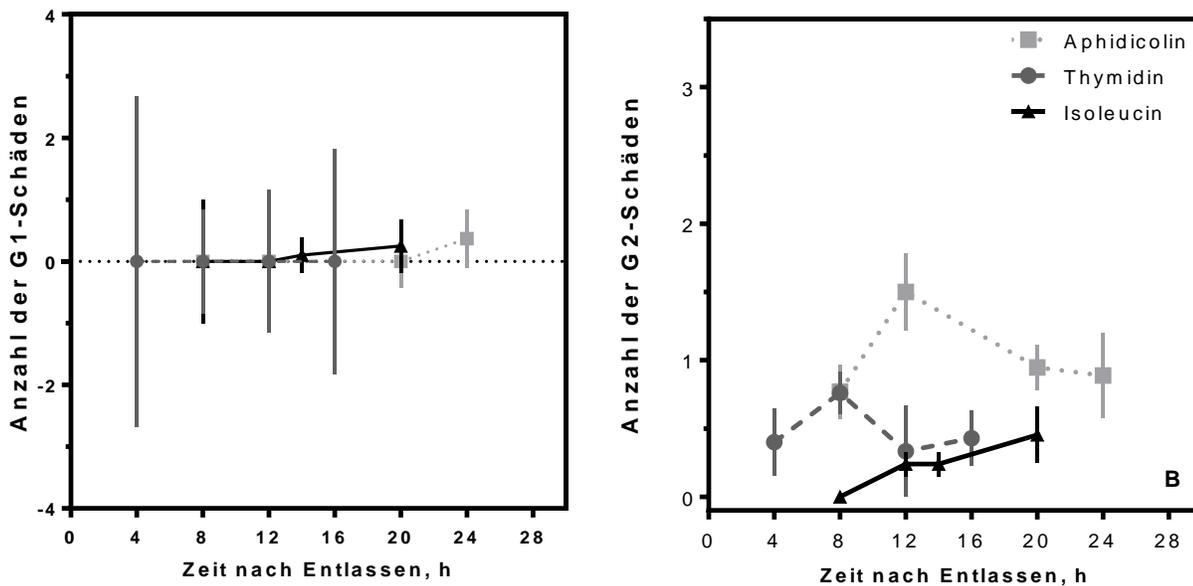


Abb. 14: Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen nach Behandlung mit Aphidicolin, Thymidin und Isoleucinentzug in CV-1 Zellen. Die Zellen wurden entweder mit Aphidicolin oder Thymidin für 16h behandelt, oder es wurde Isoleucin für 36 h dem Medium entzogen, dann wurden die Zellen entlassen und mit Colcemid behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Entlassen fixiert. Aufgetragen ist die Anzahl der Chromosomentyp- bzw. Chromatidtypaberrationen gegen die Zeit nach Entlassen aus der Synchronisierung. Fehlerbalken entsprechen dem Fehler des Mittelwertes.

Betrachtet man die Entstehung von Chromatidtypaberrationen durch die Behandlung mit den Synchronisierungsagenzien, so zeigte sich auch hier ein spezifisches Muster für die einzelnen Agenzien, wobei sich die Synchronisierung durch Aphidicolin am stärksten auf die Bildung von Chromatidtypaberrationen auswirkte. So zeigte sich nach Synchronisierung der Zellen mit Aphidicolin ein deutlicher Anstieg zum Zeitpunkt 12 h nach Entlassen. Es folgte eine Abnahme auf das Ausgangsniveau, mit $0,77 \pm 0,2$ Chromatidtypaberrationen nach 8 h, $1,5 \pm 0,28$ nach 12 h, $0,94 \pm 0,16$ nach 20 h und $0,89 \pm 0,3$ nach 24 h. Ein deutlich schwächerer Effekt auf die Bildung von Chromatidtypaberrationen wurde nach Synchronisierung mit Thymidin beobachtet, mit $0,4 \pm 0,24$ nach 4 h, $0,76 \pm 0,16$ nach 8 h, $0,33 \pm 0,33$ nach 12 h und $0,42 \pm 0,2$ nach 16 h Chromatidtypaberrationen pro Zelle. Die Synchronisierung mittels Entzuges von Isoleucin zeigte den geringsten Effekt auf die Bildung von Chromatidtypaberrationen. Es konnten keine Chromatidtypaberrationen zum Zeitpunkt 8 h nach Entlassen ermittelt werden, $0,24 \pm 0,08$ nach 12 h, $0,24 \pm 0,08$ nach 14 h und $0,45 \pm 0,2$ nach 20 h.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass zu frühen Fixierungszeitpunkten eher Chromatidtypaberrationen auftraten, zu späteren Fixierungszeitpunkten dagegen eher Chromosomentyp-

aberrationen. Es zeigte sich ebenfalls, dass die Methode der Zellsynchronisation deutliche Unterschiede aufwies und die geringste Anzahl an Chromosomenschäden durch die Synchronisierung mittels Isoleucinentzug induziert wurde. Die Synchronisierung mittels Aphidicolin und Thymidin zeigten insgesamt mehr Chromatidtypaberrationen. Die bei Aphidicolin entstandenen Schäden entsprachen der Dosis von 6 Gy bei exponentiell wachsenden Zellen. Da die Synchronisierungsmethode durch Isoleucinentzug am geeignetsten war, die Zellen gut zu synchronisieren, ohne dabei große Schäden hervorzurufen, wurden die Zellen in allen nachfolgenden Experimenten durch Isoleucinentzug synchronisiert.

4.5. Effekt von Bestrahlung und Behandlung mit Wasserstoffperoxid auf die Zellzyklusverteilung

Werden die Zellen in der G1-, S- oder G2-Phase des Zellzyklus geschädigt, so können die Zellen in ihrer Zellzyklusprogression verlangsamt oder angehalten werden. Durch Aktivierung der zelleigenen Schutzmechanismen und der entsprechenden Kontrollpunkte im Zellzyklus wird die Zelle im Zyklus angehalten. Reparaturmechanismen werden aktiviert, um die DNA-Schäden zu reparieren. Sobald die induzierten Schäden repariert wurden, können die Zellen weiter im Zellzyklus fortschreiten. Durch DNA Schädigung kann es somit zu einer Verzögerung des Zellzykluses und damit zu einem späteren Eintritt der Zellen in die erste Metaphase nach Behandlung kommen. Um nach einer Schädigung der Zellen durch Bestrahlung oder mit Wasserstoffperoxid den idealen Zeitpunkt für den maximalen Anteil an Mitosezellen zu finden, wurden die Zellen in der S-Phase geschädigt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Schädigung fixiert und analysiert. Die Induktion des Zellzyklusverzugs wurde für Zellen, die sich in der S-Phase befanden, und für den Eintritt der Zellen in die Metaphase bestimmt.

4.5.1. Auswirkungen von Bestrahlung und Behandlung mit Wasserstoffperoxid auf die Zellzyklusverteilung

Die Zellen wurden, wie in 3.4.3. beschrieben, durch Isoleucinentzug synchronisiert und dann in der S-Phase mit 6 Gy bestrahlt oder mit 200 μ M Wasserstoffperoxid geschädigt. Anschließend wurden die Zellen alle 2 h über einen Zeitraum von 10 h für die FACS-Analyse fixiert und anschließend ausgewertet.

Der Anteil der S-Phase wurde ab dem Zeitpunkt der Schädigung bestimmt (Abbildung 15). 13 h nach Beendigung der Synchronisierung zeigt die unbestrahlte Kontrolle einen maximalen Anteil an S-Phase Zellen von mehr als 60%. In den folgenden Stunden nahm der Anteil der S-

Phase Zellen ab. Nach 21 h ist der Anteil von S-Phase Zellen auf unter 10% gesunken.

Bei bestrahlten Zellen war der Anteil an S-Phase Zellen nach 13 h ebenfalls bei 61,94 %, nach 15 h sind noch 27,30 % der Zellen in der S-Phase, nach 17 h 5,47 %, nach 19 h 1,99 %, bis sich nach 20 h keine Zellen mehr in der S-Phase befanden. Somit zeigte sich bei Zellen, die in der S-Phase bestrahlt wurden, keine Verzögerung, da sie sich bei der Bestrahlung bereits unmittelbar in der S-Phase befinden.

Bei Zellen, die mit 200 μ M Wasserstoffperoxid geschädigt wurden, zeigte sich im Gegensatz dazu ein anderes Bild. Bei den mit Wasserstoffperoxid geschädigten Zellen wurde über einen Zeitraum von 4 h in der S-Phase geschädigt. Dies zeigte, dass die Zellen zu Beginn der Schädigung teilweise noch in der G1-Phase waren und somit der G1-Checkpoint aktiviert werden konnte. Nach 13 h befand sich ein Anteil von 11,14 % in der S-Phase. Der Anteil der S-Phase Zellen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid, erreichte nach 21 h mit 27,4 % das Maximum.

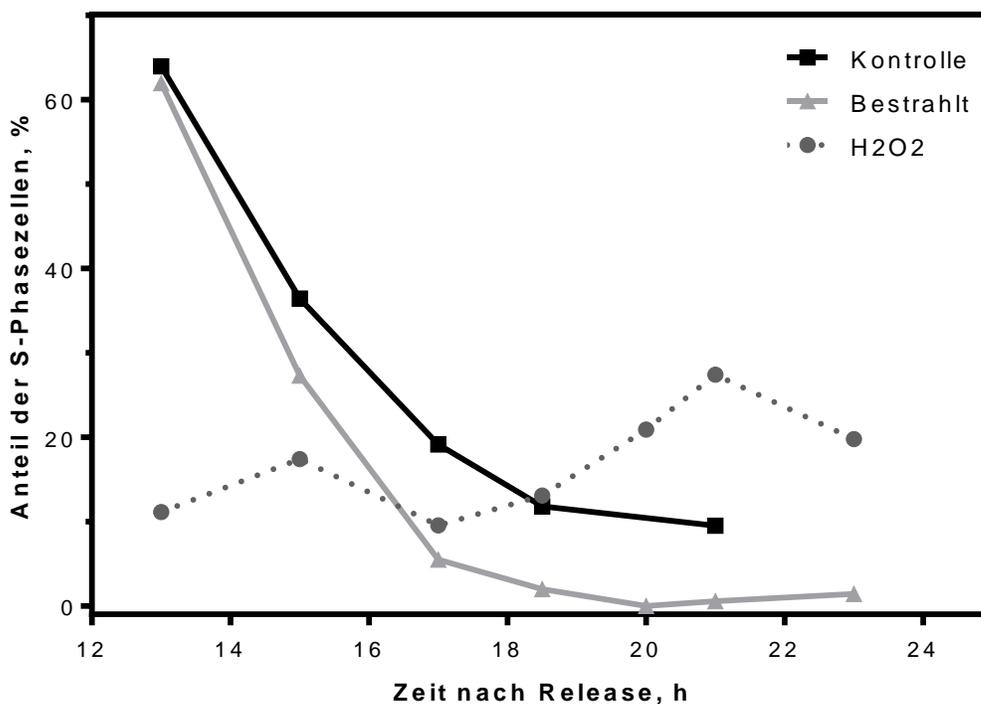


Abb. 15: Anteil der S-Phase Zellen nach Bestrahlung und Wasserstoffperoxid Schädigung. Die Zellen wurden mittels Isoleucinentzug synchronisiert und in der S-Phase mit 6 Gy bestrahlt oder mit 200 μ M Wasserstoffperoxid geschädigt. Aufgetragen ist der Anteil der S-Phase Zellen gegen die Zeit nach Synchronisierung.

Bestrahlung von CV-1 Zellen in der S-Phase wirkte sich nicht auf den Anteil der Zellen in der S-Phase aus. Eine Schädigung mit Wasserstoffperoxid hingegen zeigte eine Verzögerung und

Reduktion des maximalen Anteils der S-Phase Zellen um 8 h.

4.5.2. Auswirkungen von Bestrahlung und Behandlung mit Wasserstoffperoxid auf den Anteil mitotischer Zellen

Die Zellen wurden durch Isoleucinentzug synchronisiert und anschließend in der S-Phase mit 6 Gy bestrahlt oder mit 200 μ M Wasserstoffperoxid geschädigt. Um einen neuen maximalen Anteil an Mitosen zu erhalten, wurden die Zellen über einen Zeitraum von 10 h alle 2 h fixiert. Mit der Fixierung wurde 16 h nach Release begonnen.

Abbildung 16 zeigt den Anteil der mitotischen Zellen nach Release. Unbestrahlte Zellen zeigten einen maximalen Anteil von mitotischen Zellen 18 h nach Synchronisation mit 11,7 % mitotischen Zellen. Danach nahm der Anteil der mitotischen Zellen auf 5 % nach 22 h ab.

Anders als bei dem Anteil an S-Phase Zellen zeigten bestrahlte Zellen eine deutliche Reduktion der Metaphasen zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zu unbestrahlten Zellen. 16 h nach Synchronisation waren 0 % Metaphasen zu finden. Der Anteil mitotischer Zellen nahm zu, bis schließlich ein Maximum von 2,0 % Metaphasezellen nach 22 h erreicht wurde. Dieser Zeitpunkt wurde für die weiteren Experimente verwendet.

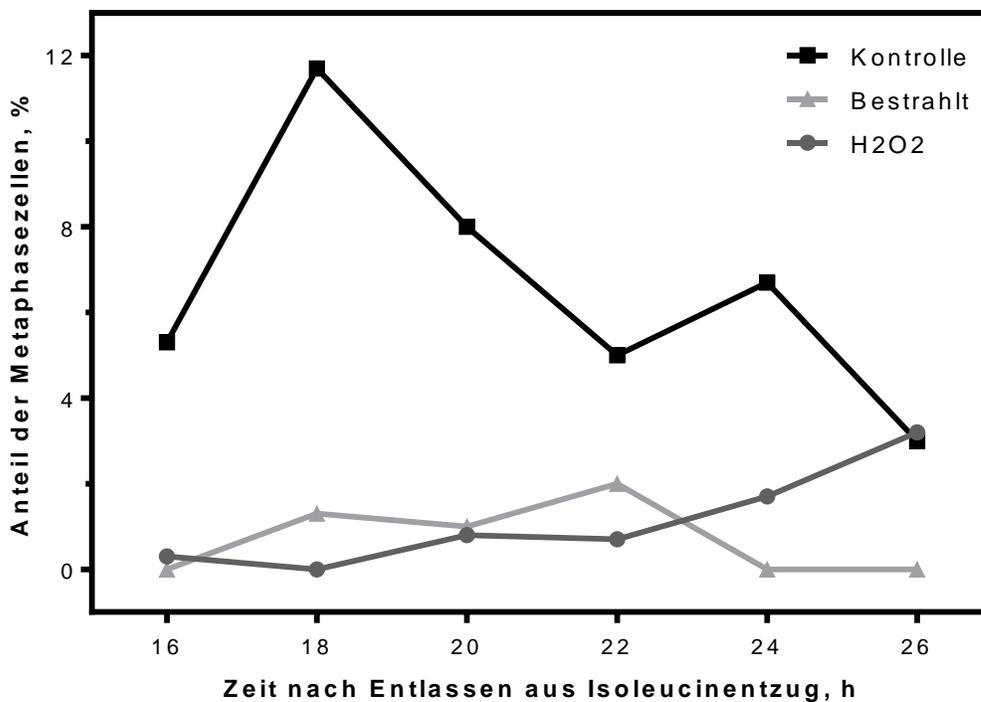


Abb. 16: Anteil mitotischer Zellen nach Bestrahlung und Wasserstoffperoxid Schädigung. Die Zellen wurden mittels Isoleucinentzug synchronisiert und in der S-Phase mit 6 Gy bestrahlt oder mit 200 μ M Wasserstoffperoxid geschädigt. Aufgetragen ist der Anteil der Metaphasezellen gegen die Zeit nach Synchronisierung.

Für Zellen, die mit Wasserstoffperoxid geschädigt wurden, zeigte sich, wie auch schon bei dem Anteil der S-Phase Zellen, eine deutliche Reduktion des Anteils der Metaphasezellen zu allen untersuchten Zeitpunkten. Ab 18 h nach Release zeigte sich ein leichter Anstieg von 0 % auf 3,2 % nach 26 h.

4.6. Verteilung von Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung nach Synchronisierung

Zellen wurden durch Isoleucinentzug synchronisiert und alle 4 h mit 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt. In der ersten Metaphase nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die Bestrahlung von Zellen mit 2 Gy wurde nur in der maximalen S-Phase, 13 h nach Synchronisierung, durchgeführt und zu keinem anderen Zeitpunkt, damit für die in dieser Arbeit wichtige S-Phase ein möglichst differenziertes Bild für die Induktion von Chromosomenaberrationen entsteht.

Der Anteil an Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus ist in Abbildung 17 a, b gezeigt. unbestrahlte Zellen zeigten zwischen $97,55 \pm 0,53$ und $97,99 \pm 0,21$ Chromosomenfragmente, sowie zwischen $0,71 \pm 0,09$ und $0,75 \pm 0,19$ Chromatidtypaberrationen.

Nach Bestrahlung in der S-Phase mit 2 Gy zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Chromatidtypaberrationen auf $1,19 \pm 0,13$ Schäden pro Zelle. Chromosomentypaberrationen lagen mit $0,0 \pm 0,28$ pro Zelle im Bereich der Kontrollzellen und zeigten somit nach Bestrahlung in der S-Phase mit 2 Gy keinen Anstieg an Chromsomentypaberrationen.

Nach Bestrahlung der Zellen mit 4 Gy zeigte sich eine Abnahme der Chromosomentypaberrationen in Abhängigkeit vom Zellzyklus. Zellen, die direkt nach der Synchronisierung mit 4 Gy bestrahlt wurden, zeigen $2,9 \pm 0,62$ Chromosomentypaberrationen, nach 13 h zeigten sich $1,33 \pm 0,47$ Chromosomentypaberrationen und nach 16 h sind $0,26 \pm 0,27$ Chromosomentypaberrationen vorhanden. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Zunahme der Chromatidtypaberrationen mit der Progression durch den Zellzyklus. Direkt nach Synchronisierung zeigten mit 4 Gy bestrahlte Zellen $0,5 \pm 0,19$ Chromatidtypaberrationen pro Zelle. Bei Bestrahlung 13 h nach Synchronisierung zeigten sich $1,44 \pm 0,25$ Chromatidtypaberrationen und nach 16h stiegen die Chromatidtypaberrationen auf $2,08 \pm 0,16$ an.

Bei der Bestrahlung mit 6 Gy zeigte sich ebenfalls eine zellzyklusabhängige Verteilung der Schäden. Bei Bestrahlung 4h nach Synchronisierung zeigten sich $1,31 \pm 0,4$ Chromosomentypaberrationen. In der S-Phase, 13h nach Synchronisierung, sank die Anzahl der Chromosomentypaberrationen auf $0,01 \pm 0,48$. Lediglich bei der Bestrahlung mit 6 Gy 8h nach Synchronisierung

stieg die Anzahl der Chromosomentypaberrationen auf $2,21 \pm 0,4$ an. Nach Bestrahlung mit 6 Gy konnte für Chromatidtypaberrationen eine Zunahme mit späteren Bestrahlungszeiten gezeigt werden. 4h nach Synchronisierung konnten $1,02 \pm 0,15$ Chromatidtypaberrationen pro Zelle beobachtet werden. Die Anzahl der Chromatidtypaberrationen stieg 8h nach Synchronisierung auf $1,27 \pm 0,16$ und nach 13h auf $2,32 \pm 0,38$ Schäden pro Zelle an.

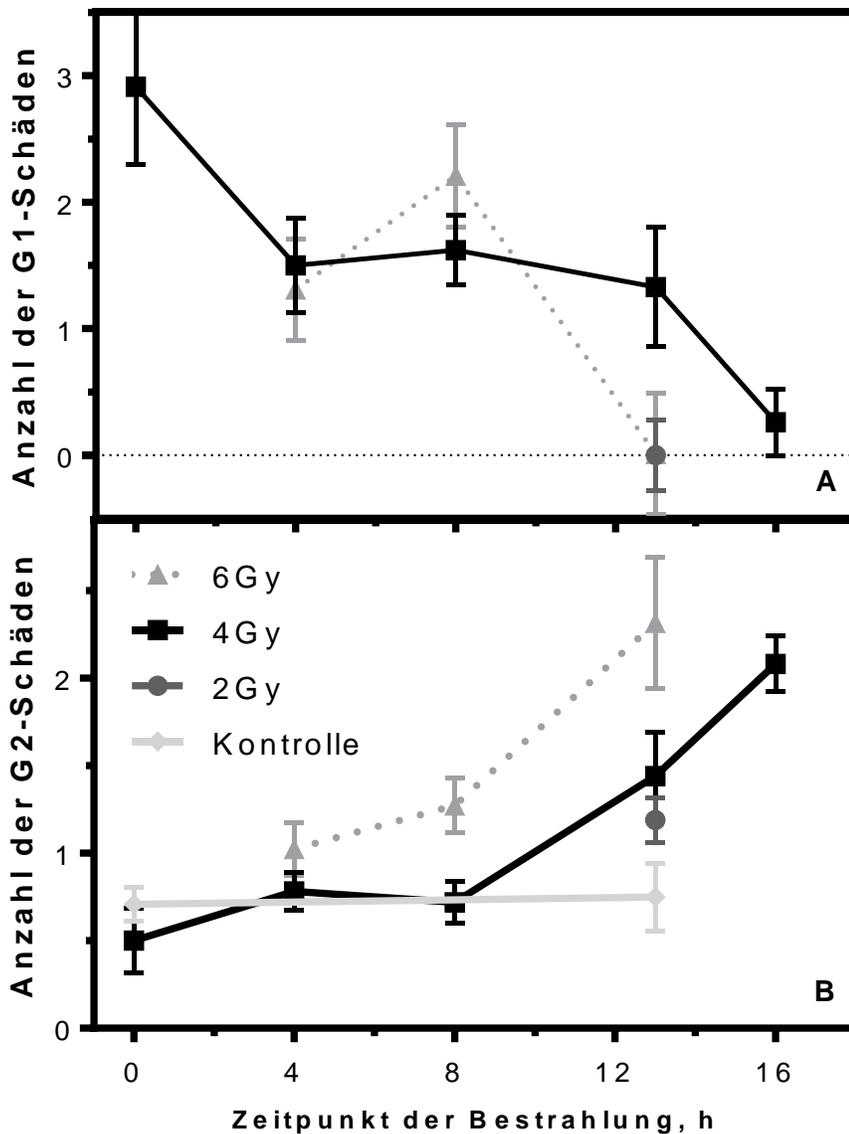


Abb. 17: Verteilung der Chromosomenaberrationen synchronisierter Zellen nach Bestrahlung. Zellen wurden mittels Isoleucinentzug synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Synchronisation mit 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt. In der ersten Mitose nach Schädigung wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Aufgetragen ist die Anzahl der Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen gegen die Zeit nach Entlassen aus der Synchronisierung. Fehlerbalken entspricht dem Fehler des Mittelwertes.

Für bestrahlte Zellen konnte eine Abhängigkeit der Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen mit der Phase, in der die Zellen bestrahlt wurden, und der Dosis gezeigt werden. Zellen, die mit höherer Dosis bestrahlt wurden, zeigten über den gesamten Bestrahlungszeitraum mehr G2 Aberrationen als Zellen, die mit niedrigerer Dosis bestrahlt wurden.

In der S-Phase konnte man deutlich den Unterschied der jeweiligen Dosis auf die Anzahl der Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen beobachten. Für Chromosomentypaberrationen zeigte die Bestrahlung mit 2 Gy in der S-Phase keinen Anstieg im Vergleich zum Kontrollwert. Bei Bestrahlung mit 4 Gy zeigte sich eine Zunahme auf $1,33 \pm 0,47$. Bei Bestrahlung mit 6 Gy zeigte sich keine relevante Zunahme mit $0,01 \pm 0,48$. Chromatidtypaberrationen zeigten ebenfalls eine Zunahme der Schäden in der S-Phase mit steigender Dosis. Unbestrahlte Zellen zeigten in der S-Phase $0,75 \pm 0,19$ Chromatidtypaberrationen pro Zelle. Mit 2 Gy bestrahlte Zellen zeigten in der S-Phase $1,19 \pm 0,13$ Chromatidtypaberrationen. Mit 4 Gy bestrahlte Zellen zeigten $1,44 \pm 0,25$ Chromatidtypaberrationen. Zellen, die mit 6 Gy bestrahlt wurden, zeigten in der S-Phase $2,32 \pm 0,38$ Chromatidtypaberrationen pro Zelle.

4.7. Verteilung von Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit 50, 100 und 200 μ M Wasserstoffperoxid nach Synchronisierung

Synchronisierte Zellen wurden alle 4h für 4h mit 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M Wasserstoffperoxid geschädigt. Anschließend wurden die Zellen in der ersten Metaphase nach Schädigung gesammelt und fixiert. Für Zellen, die mit 200 μ M Wasserstoffperoxid behandelt wurden, konnten nicht für jeden Behandlungszeitpunkt ausreichend Metaphasen gesammelt werden. Nur wenn die Zellen 4h nach Synchronisierung mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden, konnten genügend Mitosen für die Auswertung gesammelt werden.

Den Anteil der Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen nach Behandlung mit unterschiedlichen Dosen Wasserstoffperoxid zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus zeigt Abbildung 18 a, b. Unbehandelte Zellen zeigten zwischen $97,55 \pm 0,53$ und $97,99 \pm 0,21$ Chromosomenfragmente, sowie zwischen $0,71 \pm 0,09$ und $0,75 \pm 0,19$ Chromatidtypaberrationen. Nach Behandlung mit 50 μ M Wasserstoffperoxid zeigten Zellen kein vermehrtes Auftreten von Chromosomentypaberrationen. Bei Behandlung mit 50 μ M Wasserstoffperoxid 4 h nach Synchronisation zeigten die Zellen $0,18 \pm 0,23$ Chromosomentypaberrationen pro Zelle. Im weiteren Verlauf (nach 8h & 16h) konnte keine Erhöhung der Chromosomentypaberrationen festgestellt werden, nach 12 h konnten nicht genügend Mitosen gesammelt werden. Für die Entstehung von Chroma-

tidtypaberrationen war bei mit 50 μM behandelten Zellen kein Zusammenhang mit dem Behandlungszeitraum nach Synchronisierung zu erkennen. 4h nach Synchronisierung zeigten sich $1,14 \pm 0,12$ Chromatidtypaberrationen pro Zelle, nach 8 h waren $0,44 \pm 0,15$ und nach 16h $1,1 \pm 0,38$ Chromatidtypaberrationen pro Zelle zu finden.

Für die Behandlung der Zellen mit 100 μM Wasserstoffperoxid konnten Mitosen nur gesammelt werden, wenn die Zellen nach 8h, 12h oder 16h mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden und auch hier konnten zum Teil nur sehr wenige Mitosen ausgewertet werden. Für 100 μM zeigte sich in früheren Behandlungszeiträumen, im Vergleich zur Bestrahlung oder Behandlung mit 50 μM Wasserstoffperoxid, nach 8h & 12h kein vermehrtes Auftreten von Chromosomentypaberrationen. Nach 16h konnten $0,56 \pm 0,43$ Chromosomentypaberrationen pro Zelle gefunden werden. Ein Anstieg von Chromatidtypaberrationen zeigte sich für 100 μM bei späteren Behandlungszeiträumen im Zellzyklus, wie bereits bei bestrahlten Zellen und mit 50 μM Wasserstoffperoxid behandelten Zellen. 8 h nach Synchronisierung zeigten sich $0,32 \pm 0,07$ Chromatidtypaberrationen pro Zelle. Die Anzahl der Chromatidtypaberrationen stieg nach 12 h auf $1,0 \pm 0,0$ Chromatidtypaberrationen pro Zelle an und nach 16 h auf $1,33 \pm 0,36$ auf Chromatidtypaberrationen pro Zelle, insgesamt konnten jedoch zu späteren Zeiträumen bei der Behandlung mit Wasserstoffperoxid nur wenige Mitosen gesammelt werden.

Bei der Behandlung mit 200 μM Wasserstoffperoxid konnten nur für den Zeitpunkt 4h nach Synchronisierung genügend Mitosen gesammelt werden. 4h nach Synchronisierung zeigte sich hier für Chromosomentypaberrationen ein Wert von $0,01 \pm 0,27$ pro Zelle. Für Chromatidtypaberrationen zeigen sich $1,46 \pm 0,17$ Chromatidtypaberrationen pro Zelle.

Bei der Behandlung von Zellen mit Wasserstoffperoxid werden sowohl Chromosomentyp als auch Chromatidtypaberrationen induziert. Bei der Behandlung mit 50 μM Wasserstoffperoxid lässt sich mit fortschreitender Progression durch den Zellzyklus eine Zellzyklusphasenabhängige Verteilung der Schäden erkennen. Die Behandlung mit 100 μM und 200 μM Wasserstoffperoxid führte bei vielen Behandlungszeitpunkten zum Zelltod, sodass nicht für alle Zeitpunkte Daten vorliegen und zum Teil nur wenige Metaphasen analysiert werden konnten. Bei der Behandlung mit 100 μM Wasserstoffperoxid konnte mit späteren Behandlungszeiträumen und somit in späteren Zellzyklusphasen eine Zunahme sowohl der Chromosomentypaberrationen und der Chromatidtypaberrationen beobachtet werden. Eine Zunahme der Chromatidtypaberrationen, nicht aber der Chromosomentypaberrationen konnte bereits bei bestrahlten Zellen beobachtet werden. Eine Zunahme der Chromosomentypaberrationen auch bei späteren Behandlungszeitpunkten spricht für

eine äußerst starke Schädigung der Zellen durch Wasserstoffperoxid. Da bei der Behandlung mit 200 μM Wasserstoffperoxid nur 4 h nach Synchronisierung ausreichend Mitosen gesammelt werden konnten, zeigt ebenfalls wie stark die Schädigung durch Wasserstoffperoxid ist.

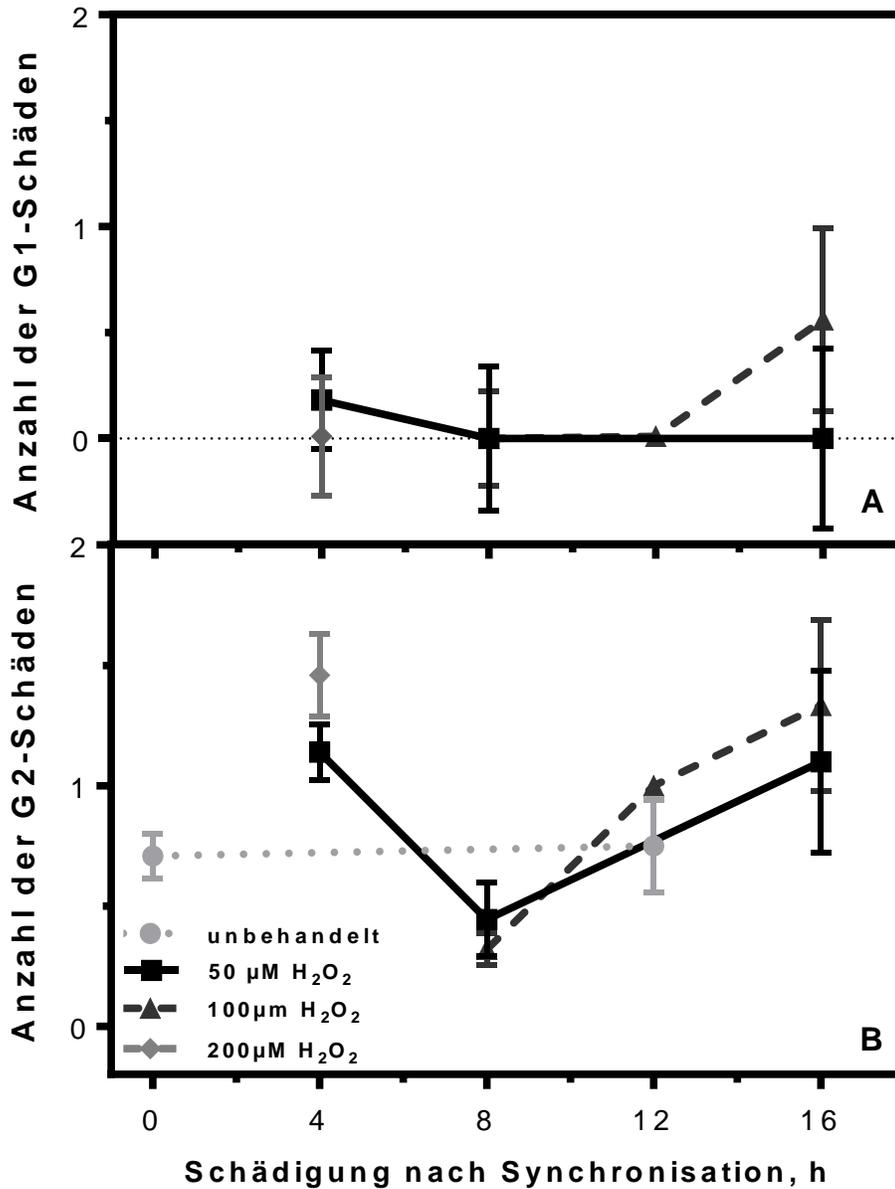


Abb. 18: Verteilung von Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit 50 μM , 100 μM und 200 μM Wasserstoffperoxid nach Synchronisierung. Zellen wurden mittels Isoleucinenzug synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Synchronisation mit 50, 100 oder 200 μM Wasserstoffperoxid behandelt. Anschließend wurden die Zellen in der ersten Mitose nach Schädigung fixiert und gefärbt. Aufgetragen ist die Anzahl der Chromosomentyp und Chromatidtypaberrationen gegen die Zeit nach Entlassen aus der Synchronisierung. Fehlerbalken entspricht dem Fehler des Mittelwertes.

5. DISKUSSION

Der Erhalt der genomischen Stabilität ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für das Überleben der Zelle. Insbesondere in der Synthesephase ist das Genom besonders gefährdet. Im Verlauf der S-Phase sind die Auswirkungen von ionisierender Bestrahlung auf die Bildung von Chromosomenaberrationen weitestgehend unbekannt. In diesem Zusammenhang ist es von besonderem Interesse, welcher der durch Bestrahlung induzierten Schadenstypen für die Bedeutung und Prozessierung strahleninduzierter Schäden innerhalb der S-Phase verantwortlich ist. Diesbezügliche Erkenntnisse könnten einen Beitrag zum besseren Verständnis der Tumorigenese mit entsprechendem Nutzen für die Tumorthherapie leisten.

Für die Beantwortung dieser Frage wurden zunächst verschiedene Methoden zur Synchronisierung von Zellen etabliert und hinsichtlich ihrer eigenen Schadensinduktion überprüft. Im Weiteren wurden Zellkulturen synchronisiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus mit ionisierender Bestrahlung und Wasserstoffperoxid geschädigt. Dabei wurden die geschädigten Zellen hinsichtlich der Bildung von Chromosomentypaberrationen und Chromatidtypaberrationen untersucht.

5.1. Methodische Vorarbeiten

5.1.1. Vergleich verschiedener Synchronisierungsmethoden

5.1.1.1. Aphidicolin

Das am häufigsten zur Synchronisierung eingesetzte Agens ist Aphidicolin, welches zu einer reversiblen Hemmung der DNA-Polymerase α (Perdali-Noy et al. 1980) führt und die Zellen am Replikationsstart anhält. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen für 16 h mit Aphidicolin in einer Konzentration von 2,5 μ M behandelt. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen wurde die Länge der Behandlung mit Aphidicolin auf mindestens eine Zellzykluslänge festgesetzt (Poxleitner et al. 2008, Hofstetrova et al. 2010), damit möglichst viele Zellen durch Aphidicolin an der Grenze von der G1- zur S-Phase angehalten wurden. Bei dieser Konzentration kann von einer reversiblen Blockierung der DNA-Polymerase α ausgegangen werden, ohne dabei eine Beeinflussung der späteren DNA-Synthese zu erwirken (Samaké et al. 1997).

Bei dieser Konzentration konnte ein maximaler Anteil an S-Phase Zellen nach einmaliger Behandlung von 80 % erreicht werden. Andere Untersuchungen konnten dagegen erst mit einem doppelten Aphidicolinblock einen vergleichbar hohen Anteil an S-Phase Zellen anreichern (Rad-

ford & Broadhurst 1988). In Embryonalzellen konnte dagegen nur ein maximaler Anteil an S-Phase Zellen von 55 % nach Behandlung mit Aphidicolin und dies erst 8h nach Entfernen des Aphidicolins erzielt werden (Samaké et al. 1997). In der hier vorliegenden Arbeit wurde der maximale Anteil von S-Phase Zellen bereits nach 3-4 h erreicht. Dies ist vergleichbar mit anderen Arbeiten, welche ebenfalls bereits 2-3 h bzw. 4,5 h nach Entlassen ein Maximum an S-Phase Zellen (Radford & Broadhurst 1988, Perdaly-Noy et al. 1980). Die möglichen Ursachen für eine Variation des S-Phase Maximums sind auf eine Variation des Zellzyklus der untersuchten Zelllinien zurückzuführen. Das in dieser Arbeit erzielte Maximum und Ausmaß der Synchronisierung ist mit den in der Literatur angegebenen Werten somit sehr gut zu vergleichen.

5.1.1.2. *Thymidin*

Die Synchronisierung von Zellen mit einem Thymidinüberschuss wurde von Xeros (1962) etabliert. Ein Überschuss an Thymidin hält die Zellen an der Grenze zwischen G1-Phase und S-Phase an (Harper 2005). Der Überschuss an Thymidin hemmt die Thymidinkinase wodurch ein Mangel dieses Nukleotids erzeugt wird, welcher zum Anhalten der DNA-Synthese führt. Im Vergleich zur Synchronisierung mit Aphidicolin etwas früher im Zellzyklus. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen für 16 h durch Zugabe von 10 mM Thymidin synchronisiert. Die Länge dieses so genannten Thymidinblockes wurde auf die Länge eines Zellzyklus festgelegt, um möglichst alle proliferierenden Zellen zu erreichen (Xeros 1962). Viele andere Arbeiten nutzten für die Synchronisierung einen doppelten Thymidinblock, um eine noch umfangreichere Synchronisierung zu erreichen. (Bootsma et al. 1964, Xeros 1962, Brown & Szyf 2008). Die mit CV-1 Zellen durchgeführten Experimente erzielten schon bei einem einfachen Thymidin-Block eine hohe Synchronität, daher war ein doppelter Thymidinblock nicht notwendig.

Die in dieser Arbeit verwendete Thymidin-Konzentration war im Vergleich zu den anderen mit 10 mM eher hoch. In den meisten anderen Arbeiten wurden zwischen 2 mM und 2,5 mM Thymidin zur Synchronisierung verwendet (Xeros 1962, Brown & Szyf 2008, Bootsma et al. 1964).

1-3h nach Entlassen aus dem Thymidin-Block wurde in dieser Arbeit ein maximaler Anteil an S-Phase Zellen von bis zu 80 % erreicht. Dies ist vergleichbar mit anderen, die im selben Zeitraum ein Maximum an S-Phase Zellen, mit 80-90 % nach 1,5-3 h erzielten (Bootsma et al 1964). Dagegen konnte in HeLa Zellen, bei zweimaliger Thymidinbehandlung nur ein maximaler Anteil an S-Phase Zellen von 48 % erreicht werden (Shelby et al. 2000) und für leukämischen Zellen konnte ebenfalls keine gute Synchronisierung erzielt werden konnte. Somit scheint eine Synchron-

nisierung mittels Thymidinblock extrem abhängig vom zu untersuchenden Zellsystem zu sein, sich allerdings sehr gut für die hier verwendeten CV-1 Zellen (Cooper et al. 2007) zu eignen.

5.1.1.3. Isoleucinentzug

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Synchronisierung von Zellen mittels Isoleucinentzug überprüft. Dazu wurden CV-1 Zellen für 36 h in isoleucinfreiem Medium belassen und anschließend wieder in Isoleucin-haltigem Medium inkubiert. Der Entzug der essentiellen Aminosäure, welche nicht durch die Zelle selbst hergestellt werden kann führt zu einer Mangelsituation, welche die Zellen in der wenig Stoffwechsel-aktiven G1/G0-Phase anhält. Dies führt dazu, dass bei einer Inkubation von 18h nach Beginn des Isoleucin-Entzugs keine Zellteilungen mehr stattfanden (Tobey et al. 1971). Durch Hinzufügen von Isoleucin wird der Arrest aufgehoben und die gesamte Zellpopulation kann synchron mit der DNA-Synthese beginnen.

In dieser Arbeit konnte ein maximaler Anteil an S-Phase Zellen von 60 % 13 h nach Zugabe von Isoleucin erreicht werden. Auch in anderen Zelllinien, wie die des syrischen Hamsters wurde ein S-Phaseanteil von 70 % 12h nach Isoleucinentzug (für 48h) beobachtet (Popescu et al., 1975). In humanen Keratinozyten wurde nur ein maximaler Anteil an S-Phase Zellen von 28,1 % nach 18h und 60 h Isoleucinentzug erreicht (Kobayashi et al. 1998). Wurde anstatt der FACS-Analyse der Nachweis durch Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin zur Zellzyklusanalyse eingesetzt konnte ein 100%iger Anteil an S-Phasezellen 21h nach Entlassen aus dem Isoleucin-Block beobachtet werden (Tobey et al. 1971).

Fasst man die Beobachtungen zusammen so konnte mit allen drei verwendeten Methoden der Synchronisierung vergleichbare Synchronisierungsgrade erreicht werden. Es war im Weiteren zu klären, welches der Agenzien möglichst nur eine sehr geringe DNA-Schädigung bei maximaler Synchronisierung bewirkte.

5.2. DNA-Schäden durch Synchronisierung von Zellen durch Aphidicolin, Thymidin und Isoleucinentzug

Bei der Synchronisierung von CV-1 Zellen mit Aphidicolin, Thymidin und Isoleucinentzug werden die Zellen artifiziell im Zellzyklus angehalten wodurch die Zellen geschädigt werden können. Im Folgenden wird die Wirkung der Agenzien auf das Entstehen von chromosomalen Schäden diskutiert.

5.2.1. DNA-Schäden durch Synchronisierung mit Aphidicolin

Es konnte eine erhöhte Anzahl von Chromatidtypaberrationen, mit $1,5 \pm 0,28$ pro Zelle im

Vergleich zur Kontrolle mit $0.4 \pm 0,08$ nach Inkubation mit $2,5 \mu\text{M}$ Aphidicolin für 16h in CV-1 Zellen beobachtet werden. Dies bedeutet eine 4-fache Steigerung der Rate an spontan auftretenden Aberrationen. Die Anzahl der Chromosomentypaberrationen wurde durch die Synchronisation mit Aphidicolin nicht verändert.

In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass eine Konzentration von $1,4 \mu\text{M}$ Aphidicolin die Entstehung von Blastozyten aus embryonalen Zellen hemmt (Samaké & Smith, 1997). Dies wird auf eine vermehrte Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen zurückgeführt, in deren Folge es zu einer erhöhten Apoptoserate in humanen Leukämiezellen kam (Kurose et al. 2006).

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Aphidicolin durch seine hemmende Wirkung der Polymerase α insbesondere an common fragile sites (DNA-Abschnitte, in denen gehäuft Brüche auftreten) bevorzugt Doppelstrangbrüche erzeugt (Glover et al. 2006) und dass es einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Doppelstrangbrüche mit der Aphidicolin-Konzentration gibt (Glover et al. 1984). Es wurde auch beobachtet, dass Chromosomenaberrationen durch alleinige Inkubation mit Aphidicolin konzentrationsabhängig entstehen (Galloway et al. 1998). So zeigten 30% der Zellen Chromosomenaberrationen bei einer hohen Aphidicolinkonzentration von $5 \mu\text{M}$ in CHO Zellen. In primären Lymphozyten zeigten 45 % der Zellen Chromosomenschäden nach einer Behandlung mit $0,2 \mu\text{M}$ Aphidicolin (Carme et al. 1999). Dagegen gibt es nur eine Studie, die keine erhöhte Anzahl von Doppelstrangbrüchen nach Aphidicolinbehandlungen feststellen konnte (Radford & Bradhurst 1988).

Fasst man die Daten zusammen, so ist davon auszugehen, dass trotz guter Synchronisierungsergebnisse mit über 80%, Aphidicolin allein eine erhebliche Anzahl an Schäden induziert und deshalb nicht als Agenz für die Untersuchung von Chromosomenaberrationen geeignet ist.

5.2.2. DNA-Schäden durch Synchronisierung mit Thymidin

Es konnte keine erhöhte Anzahl an Chromosomentypaberrationen, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, nach Synchronisierung mit 10 mM Thymidin für 16 h beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch eine erhöhte Anzahl an Chromatidtypaberrationen mit $0,33 \pm 0,33$ nach 12 h bis $0,76 \pm 0,16$ nach 8 h. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen die ebenfalls eine erhöhte Anzahl von DNA-Schäden nach Synchronisierung mit Thymidin beobachteten. So konnten sowohl vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche (Kurose et al. 2006), Chromatidtypaberrationen (Yang & Hahn 1966) als eine auch asymmetrische Verteilung von Chromosomen auf Tochterzellen (Bootsma et al. 1964) beobachtet werden. In einer Arbeit konnten allerdings keine toxischen Effekte beobachtet werden (Xeros et al. 1962).

Somit eignet sich die Methode des Thymidinüberschusses zwar sehr gut zur Synchronisierung von Zellen, allerdings ist bei dieser Synchronisierungsmethode die Anzahl an entstandenen Schäden zu hoch und vor allem zu vielfältig, um dieses Agens für die später durchgeführten Experimente zu verwenden.

5.2.3. DNA-Schäden durch Synchronisierung mit Isoleucinentzug

Die Synchronisierung durch Isoleucinentzug zeigte keine Auswirkungen auf die Anzahl der Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen nach einer Inkubationszeit von 36h. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der einzigen anderen Arbeit, die bei einem Isoleucinentzug nur in 2-5 % der Zellen Chromosomenschäden beobachtete und dies unabhängig von der Länge des Isoleucinentzuges (Popescu et al. 1986).

Obwohl durch die Synchronisierung mittels Aphidicolin eine um etwa 20% höhere Synchronisierungsrate erzielt werden konnte wurden in dieser Arbeit im Weiteren mit dem Entzug von Isoleucin weitergearbeitet.

5.3. Auswirkung von Wasserstoffperoxid und Bestrahlung auf den mitotischen Index

Die Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung oder Wasserstoffperoxid führt aufgrund der entstandenen Schäden und der daraufhin aktivierten Zellzykluskontrollpunkte zu einer Verlangsamung des Zellzyklusfortschritts. Um den idealen Zeitpunkt für den Eintritt der Zellen in die erste Mitose nach Behandlung zu überprüfen wurden die Zellen in einem Abstand von 2h über einen Zeitraum von 26h nach Entlassen aus dem Isoleucin-Block gesammelt und der mitotische Index bestimmt (Abbildung 16). Es zeigte sich eine generelle Reduktion des mitotischen Index sowohl nach Bestrahlung als auch nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid, sowie eine Verzögerung des Zellzyklusfortschritts um 4 h nach Bestrahlung und von 8h nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid.

Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Nasnova et al. 1998, Forrester et al. 2000, Durante et al. 1994 & 1999, Griffin et al. 1994, Liua et al. 2013), die ebenfalls einen Zellzyklusverzug von ca. 1 h pro Gy beschrieben, sowie einem generell geringeren mitotischen Index. Auch für die Behandlung mit Wasserstoffperoxid konnte gezeigt werden, dass sich der mitotische Index bereits bei einer Konzentration von 150 μ M deutlich reduzierte (Oya et al. 1986, Rueff et al. 1993).

5.4. Auswirkung von Wasserstoffperoxid und Bestrahlung auf das chromosomale Scha-

densspektrum

Um die Wirkung von ionisierender Bestrahlung und der Behandlung mit Wasserstoffperoxid im zeitlichen Verlauf untersuchen zu können, wurden die Zellen mittels Isoleucinentzug synchronisiert und zu unterschiedlichen Zeiten nach Entlassen aus dem Isoleucin-Block behandelt. Es wurden Chromosomenaberrationen, spezifiziert in Chromosomentyp- bzw. Chromatidtypaberrationen untersucht.

5.4.1. Vergleich der Chromosomenaberrationen exponentiell wachsender und S-Phase synchronisierter CV-1 Zellen nach Bestrahlung

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit während der S-Phase zeigt eine große Variation, mit der höchsten Empfindlichkeit bei Eintritt und der höchsten Resistenz bei Austritt aus der S-Phase. Es wurde überprüft ob sich die großen Unterschiede in der Sensitivität in der Verteilung der Chromosomenaberrationen im Verlaufe der S-Phase nach Bestrahlung widerspiegeln und in welchem Verhältnis sie zur Verteilung der Chromosomenaberrationen exponentieller Zellen stehen (Abbildungen 13 und 17).

5.4.2. Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in synchronisierten Zellen

Um die Strahlenwirkung auf die Anzahl der Chromosomenaberrationen im Zellzyklusverlauf zu bestimmen wurden CV-1 Zellen synchronisiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Entlassen aus der Synchronisierung bestrahlt. Ionisierende Strahlung induziert ein breites Spektrum an DNA-Schäden, mit einem sehr kleinen Anteil an primären DNA-Doppelstrangbrüchen, hat aber das Potenzial durch die hohe Dichte induzierter Basen-Schäden und Einzelstrangbrüche sekundäre Doppelstrangbrüche zu erzeugen. Sekundäre Doppelstrangbrüche können entstehen, wenn nicht reparierte Basenschäden und Einzelstrangbrüche auf eine Replikationsgabel stoßen, wo allein durch fortschreiten der Replikationsmaschinerie aus einem Einzelstrangbruch ein einseitiger Doppelstrangbruch produziert werden kann. Um die Wirkung der primären und der sekundären, replikations-assoziierten Doppelstrangbrüche zu vergleichen, wurden parallel zur Bestrahlung Doppelstrangbrüche durch Wasserstoffperoxid, welches bei niedrigen Konzentrationen nur Basenschäden und Einzelstrangbrüche induziert, hervorgerufen (s. 5.4.6.). Die Zellen wurden in der ersten Mitose nach Behandlung mithilfe von Colcemid angehalten und fixiert, um die Chromosomenschäden untersuchen zu können. Durch die methodischen Vorarbeiten war sichergestellt, dass sich die Zellen im Untersuchungszeitraum 0-16 h zunächst in der G1-, dann S- und später in der G2-Phase befanden. Das entstandene Schadensmuster wurde zu jedem Behand-

lungszeitpunkt untersucht.

Im Gegensatz zu vielen anderen Arbeiten wurde in dieser Arbeit erstmalig die Entstehung von Chromosomenaberrationen im Verlauf der S-Phase nach Synchronisierung in der G1-Phase analysiert. Vorherige Arbeiten untersuchten Chromosomenschäden entweder in der G1-Phase oder in der G2-Phase.

Betrachtet man nach ionisierender Bestrahlung die Anzahl der Chromosomentypaberrationen so zeigte sich wie zu erwarten ein Maximum bei Bestrahlung in der G1-Phase und ein deutlich geringer Anteil in der G2-Phase. Ebenfalls entsprechend der Erwartung zeigte sich für die Anzahl der Chromatidtypaberrationen ein Maximum in der G2-Phase und nur ein sehr geringer Anteil am Ende der G1-Phase. Dies wurde für alle eingesetzten Bestrahlungsdosen beobachtet. Insgesamt erzeugten höhere Dosen in CV-1 Zellen mehr Schäden als niedrigere Dosen. Die mit der Dosis steigende Anzahl der Aberrationen, die in dieser Arbeit gefunden wurden, stimmten mit den Ergebnissen von Nagasawa et al. (1991) in CHO Zellen überein. Es konnte erstaunlicherweise eine Zunahme von Chromatidtypaberrationen nach Bestrahlung in der G1-Phase von (Aghamohammadi & Savage 1992) beobachtet werden. Dies kann eigentlich nur dadurch erklärt werden, dass nicht alle induzierten Schäden vor Beginn der S-Phase repariert wurden, da typischerweise in der G1-Phase induzierte DNA-Schäden beide Chromatiden betreffen sollten.

Die Abnahme von Chromosomentypaberrationen parallel zur Zunahme von Chromatidtypaberrationen nach Bestrahlung in unterschiedlichen Zellzyklusphasen, die in dieser Arbeit gefunden wurden, konnte von Wilson et al. (2010b) in CHO-Zellen mittels Dichte-Zentrifugation bestätigt werden. Eine gleichzeitige Abnahme von Chromosomentypaberrationen parallel zu einer Zunahme von Chromatidtypaberrationen konnte ebenfalls von Durante et al. (1994) beobachtet werden.

5.4.3. Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G1-Phase

Die meisten der hier zitierten Arbeiten beschäftigten sich mit der ausschließlichen Analyse von Chromosomenaberrationen einer einzigen Zellzyklusphase. Dagegen wurde in dieser Arbeit erstmalig die Entstehung von Chromosomenaberrationen im Verlauf des Zellzykluses von der G1-Phase bis zur Mitose analysiert. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der G1, S oder G2 behandelt und in der ersten darauf folgenden Mitose die Chromatidtyp- und Chromosomentypaberrationen bestimmt.

Bei Bestrahlung in der G1-Phase wurde insbesondere bei einer hohen Dosis neben den erwarteten Chromosomentypaberrationen auch Chromatidtypaberrationen beobachtet. Diese Beobach-

tung wird bestätigt durch Nagasawa et al. (1991) und Nasnova et al. (1998), die ebenfalls einen Anteil an Chromatidtypaberrationen von 20-30% beobachteten obwohl die Zellen in der G1-Phase synchronisiert und einer Dosis von 6 Gy dünn ionisierender Strahlung oder 3 Gy dicht ionisierender Bestrahlung behandelt wurden. Ein noch höherer Anteil an Chromatidtypaberrationen bei Bestrahlung in der G1-Phase wurde insbesondere bei Zellen mit einem Defekt bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beobachtet.

Dass sich diese erhöhte Anzahl auf eine unvollständige Synchronisierung der Zellen zurückführen lässt ist auszuschließen, da sich dieses Phänomen erst bei höheren Bestrahlungsdosen zeigt und bei geringen Dosen vollständig fehlt. Es ist daher wahrscheinlicher, dass es sich um nicht abgeschlossene Reparaturereignisse handelt, welche auf eine fortschreitende Replikationsgabel gestoßen sind und entweder zu einem unvollständig replizierten Areal führten, sichtbar in Form einer Lücke oder zu einem Abbruch der Reparatur, sichtbar in Form eines Chromatidbruchs.

5.4.4. Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der S-Phase

CV-1 Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Synchronisation durch Isoleucinenzug im Verlauf der S-Phase bestrahlt wurden, zeigten eine Zunahme der Chromatidtypaberrationen bei gleichzeitiger Abnahme von Chromosomentypaberrationen. Dies konnte für alle untersuchten Dosen (2, 4 und 6 Gy) beobachtet werden. Bei einer Dosis von 4 Gy wurde die höchste Anzahl an Chromosomentypaberrationen beobachtet (Abbildung 17). Die Anzahl der Chromatidtypaberrationen nahm im Zeitraum von 8 bis 13 Stunden sowohl bei 4, als auch bei 6 Gy zu (Abbildung 17). Nach 13 Stunden zeigten die Zellen weniger Chromosomentypaberrationen, die aber immer noch über dem Kontrollwert lagen.

Direkt vergleichbare Arbeiten zu den hier gefundenen Ergebnissen in der S-Phase gab es nicht. Allerdings konnte von Anderen für das Entstehen von Chromatidtypaberrationen und Austauschaberrationen, die zu der Gruppe der Chromatidtypaberrationen zählen, ebenfalls eine Zunahme im Verlauf der S-Phase sowohl nach dünn ionisierender Bestrahlung als auch nach Bestrahlung mit α -Partikeln beobachtet werden (Savage 1975, Nagasawa et al. 1991, Griffin et al. 1994, Boei et al. 2012).

Im Verlauf der S-Phase können neben Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen auch Schwesterchromatid-austausche (SCEs) entstehen. SCEs gelten als typische Chromosomenaberrationen ohne Verlust genetischen Materials (Wilson et al. 2007) und man geht davon aus, dass sie direkt bei der Reparatur an offenen Replikationsgabeln entstehen. Viele Arbeiten, die

sich mit der Bildung von Chromosomenaberrationen im Verlauf der S-Phase beschäftigen, setzen deshalb die Analyse von SCEs ein. Durch differentielle Färbung der beiden Schwesterchromatiden ist es möglich, diese Austausche nachzuweisen (Wojcik et al. 2004, Sayed-Aly et al. 2002).

Spontan entstehen etwa 3-4 SCEs/Zelle/Zellzyklus als natürliches Nebenprodukt normaler Replikation (Wilson et al. 2007, Pinkel et al. 1985, Stoilov et al. 2002). Welcher Schaden genau für die Induktion von SCEs verantwortlich ist und ob die Schäden auch aus der G1-Phase kommen können wird noch diskutiert (Wojcik et al. 2004, Nagasawa et al. 1991). Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass SCEs durch die Reparatur von Einzelstrangbrüchen oder DNA-Vernetzungen, die in G1-Phase oder S-Phase induziert wurden, entstehen (Kato 1977, Wojcik et al. 2004, Wilson et al. 2007 und Tucker et al. 1993). Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Behandlung von S-Phasezellen mit Cadmium zu einem Anstieg von SCEs in humanen Lymphozyten führt (Saplakoglu & Iscan 1998). Allerdings ist der genaue Mechanismus, der zu einem SCE führt, noch nicht mit Sicherheit geklärt. Der wahrscheinlichste Weg, der zu einem SCE führt, ist die durch homologe Rekombination induzierte Wiederaufnahme der Replikation an einer geschädigten Replikationsgabel (über Holliday-Junction) (Wilson et al. 2007, Helleday 2003, Kato 1977), die an einem Bruch oder einer Lücke im zu replizierenden Strang initiiert wird (Wilson et al. 2007, Saleh-Gohari et al. 2005, Saffhill & Ockey 1985, Helleday 2003). Diese Präferenz für HR gegenüber NHEJ konnte auch nach Induktion von Basenschäden durch MMS (Methylmethanesulfonat) beobachtet werden (Nikolova et al. 2010). Als ursächlichen Schaden für die Entstehung eines SCEs kommen ebenfalls zwei Einzelstrangbrüche auf den beiden gegenüberliegenden Schwesterchromatiden in Frage, die ebenfalls als Substrat der HR betrachtet werden und durch Interaktion der beiden DNA-Moleküle zu einer Holliday-Struktur, gefolgt von einem SCE führen (Kato 1977).

Darüberhinaus gibt es die Vorstellung, dass auch in der G1-Phase nicht reparierte Einzelstrangbrüche im Rahmen der Zellzyklusprogression in die S-Phase gelangen und durch Reparatur mittels HR SCEs entstehen. Über den Einfluss von DNA-Schäden die aus der G1-Phase kommend und vor der S-Phase noch nicht repariert wurden auf die Anzahl der SCEs gibt es eine Reihe von Theorien (Wojcik et al. 2004, Stoilov et al. 2002). Mühlmann-Diaz & Bedford (1995) beschrieben, dass es sich hierbei, fälschlicherweise um als SCEs bezeichnete Chromosomenaberrationen handelt, die eigentlich auf parazentrische Inversionen zurückzuführen sind und damit kein klassischen SCE darstellen. Dies wird bestätigt durch Daten von Nagasawa et al. (1991), die

deutlich zeigten, dass SCEs ausschließlich bei einer Schädigung in der S-Phase entstehen. Sie beobachteten keinen Anstieg von SCEs von in der G1-Phase bestrahlten Zellen bei gleichzeitigem deutlichem Anstieg von Chromosomentypaberrationen. Dagegen zeigten sie eine deutliche Zunahme der SCEs mit bis zu 0,49 pro Chromosom nach einer Bestrahlung mit α -Partikel bei einer Dosis von 1,3 mGy in reparaturkompetenten Zellen bei Bestrahlung in der S-Phase (Nagasawa et al. 2008). Auch Morgan & Crossen (1980), beobachteten SCEs nur bei Bestrahlung in der S-Phase.

Im Gegensatz dazu wurde von Wojcik et al. (2004) und Stoilov et al. (2002) gezeigt, dass SCEs auch entstanden, wenn die Zellen in der G1-Phase bestrahlt oder mit DNaseI oder AluI behandelt wurden. Wojcik et al. (2004) konnte sogar zeigen, dass die Anzahl der SCEs in der G1-Phase am höchsten ist bei Bestrahlung mit 4,8 Gy Röntgenstrahlung und bei Bestrahlung in der S-Phase sogar niedriger. Diese Beobachtung wird auch bestätigt nach Behandlung mit DNaseI und AluI, mit ebenfalls einer höheren Anzahl von SCEs bei Behandlung in der G1-Phase im Vergleich zur Behandlung in der S-Phase (Stoilov et al. 2002). In Reparaturkompetenten Zellen konnte dagegen nach keiner Schädigung in der G2-Phase SCEs beobachtet werden (Renault et al. 1982, Kato 1977, Wojcik et al. 2004, Morgan & Crossen 1980), außer es lag ein Defekt in der HR vor (Conrad et al. 2011). Obwohl die Beobachtungen zur Bildung von SCEs etwas heterogen erscheint, ist davon auszugehen dass diese in erster Linie durch Reparatur an Replikationsgabeln mittels HR in der S-Phase entstehen und nicht bereits in der G1-Phase.

Die Bedeutung von SCEs bezogen auf die Genotoxizität, wird dagegen eher gering eingeschätzt, da ihre Bildung weder zum Verlust noch zu einer verändernden Umlagerung von genetischem Material führt. Somit haben SCEs, genauso wie symmetrische Translokationen keine Auswirkung auf die Strahlenempfindlichkeit und können im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter in Betracht gezogen werden.

5.4.5. Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G2-Phase

Auch die Verteilung der Chromosomenaberrationen in CV-1 Zellen welche in der G2-Phase bestrahlt wurden zeigte entsprechend der Erwartung einen deutlichen Trend zu einer vermehrten Bildung von Chromatidtypaberrationen im Vergleich zur Bildung von Chromosomentypaberrationen. Die Zellen wurden in der G1-Phase synchronisiert und wurden 16 h nach Entlassen aus dem Synchronisations-Block bestrahlt und in der ersten Mitose nach Bestrahlung analysiert (18h nach Entlassen, Abbildung 12). Es zeigten sich nach Bestrahlung mit 4 Gy $2,08 \pm 0,16$ Chromatidtyp- und $0,26 \pm 0,27$ Chromosomentypaberrationen. Die Anzahl der Chromosomentypaberra-

tionen sank im Vergleich zur Bestrahlung in der G1- und S-Phase. Die Anzahl der Chromatidtypaberrationen hingegen stieg mit späteren Zellzyklusphasen an.

Zur Bestimmung von Chromatidtypaberrationen wird in erster Linie der G2-Assay verwendet. Im G2-Assay werden exponentiell wachsende Zellen bestrahlt, mit Dosen maximal bis zu 1 Gy und ab 30 Minuten nach Bestrahlung für nur 60 Minuten in der folgenden Mitose gesammelt. Mit dieser Methode werden somit nur Zellen untersucht die sich bereits kurz vor der Mitose befanden (Sipi et al. 2000). Der Einsatz der geringen Dosis in dieser Untersuchungsmethode zeigt darüber hinaus an, dass Zellen am Ende der G2-Phase besonders strahlenempfindlich sind und bei höheren Dosen die Proliferation einstellen (Wilson et al. 2010, Terzoudi et al. 2000). Eine weitere mögliche Untersuchungsmethodik für Chromosomenaberrationen in der G2-Phase stellt die PCC-Methode (premature chromosome condensation) dar. Bei dieser Methode wird das Chromatin der G2-Phasezelle vorzeitig zum Kondensieren gebracht, bevor die Zelle die Mitose erreicht. Dies geschieht durch Fusion der zu untersuchenden Zelle mit einer mitotischen Zelle (Pantelias & Maillie 1983, Terzoudi et al. 2000).

Die Daten die durch die beiden Untersuchungsmethoden generiert werden, also nach Herstellung mit der PCC-Technik oder dem G2-Assay, sind nicht direkt miteinander vergleichbar. So zeigt die PCC-Technik mit etwa 4 Brüchen/Zelle/Gy deutlich höhere Werte als die Analyse mittels G2-Assay, mit etwa 2,2 Brüchen/Zelle/Gy. Die Ursachen dafür werden vielfältig diskutiert. So werden für die Analyse der PCC-Fragmente sowohl in der G1-Phase als auch in der G2-Phase immer höhere Werte beobachtet, als mit anderen Untersuchungsmethoden und es wird diskutiert, dass der vorzeitige Kondensierungsprozess der in dieser Technik provoziert wird, bereits durch DNA-Reparatur geschlossene DNA-Stränge wieder öffnet, da das Chromatin an diesen Stellen länger fragil bleibt. Eine weitere Ursache für die Unterschiede ist mit Sicherheit der besonders strahlenempfindliche Ausschnitt der G2-Phase welcher innerhalb des G2-Assays betrachtet wird. Am Ende der G2-Phase befindet sich ein Zellzykluskontrollpunkt, der möglicherweise gerade besonders stark geschädigte Zellen anhält und so zu einer geringeren Anzahl an Chromosomenaberrationen in der Mitose führt. Beobachtungen zeigen, dass dieser G2-Arrest schnell und effizient direkt nach Bestrahlung ausgelöst wird, über die Zeit aber durchlässig wird und Zellen weiter proliferieren lässt, obwohl die DNA-Schädigung noch nicht vollständig beseitigt wurde (Krempler et al. 2007). Dies erklärt auch, warum die Anzahl an PCC-Fragmenten deutlich höher ist, da diese Methode keine Selektion durch einen aktiven Zellzykluskontrollpunkt erfährt. Dies wird auch bestätigt durch die parallele Untersuchung von Chromosomenschäden mittels PCC und

G2-Assay die ebenfalls eine deutlich höhere Anzahl an Chromatid-Brüchen mit PCC im Vergleich zu G2-Assay beobachteten (Bryant & Mozdarani 2007).

5.4.6. Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid in der G1-, S- und G2-Phase

Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid von Zellen die sich in der S-Phase befanden führte zu einer extremen Reduktion des mitotischen Index, nach einer Konzentration von 100 μM (Abbildung 18). Es zeigte sich allerdings eine geringere Sensitivität wenn die Zellen in der G1- oder der G2-Phase mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden. Wurden die Zellen in der G1-Phase mit 50 μM Wasserstoffperoxid behandelt, wurden wie zu erwarten in der Hauptsache Chromosomentypaberrationen beobachtet. Allerdings wurden ebenfalls Chromosomentypaberrationen bei Behandlung in der G2-Phase beobachtet. Dies passierte allerdings in deutlich geringerer Anzahl als in der G1-Phase. In der frühen G1-Phase zeigte sich für Chromatidtypaberrationen ein Anstieg, in der späten G1/frühen S-Phase keine Erhöhung und in der G2-Phase wieder ein Anstieg der Chromatidtypaberrationen nach Behandlung mit 50 μM Wasserstoffperoxid. Insgesamt konnte für die Behandlung mit 100 μM Wasserstoffperoxid ein Anstieg von Chromosomentyp-, sowie von Chromatidtypaberrationen in der späten G1-, S- und G2-Phase beobachtet werden. Für die Behandlung mit 200 μM Wasserstoffperoxid konnten nur Ergebnisse in der frühen G1-Phase erzielt werden. Hier zeigte sich für Chromatidtypaberrationen eine Erhöhung, nicht jedoch für Chromosomentypaberrationen.

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse stimmen überein mit den Ergebnissen von Oya et al. (1986). Die Fibroblasten wurden 24 h nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid gesammelt und fixiert. Somit ist davon auszugehen, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Behandlung in der G1-Phase befanden, wenn es nicht zu einem Zellzyklusarrest gekommen sein sollte. Für Behandlungsdosen ab 50 μM Wasserstoffperoxid konnten vermehrt Chromosomentyp- und Chromatidtypaberrationen beobachtet werden. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen der Dosis und der Anzahl der entstandenen Schäden sowohl für Chromosomentyp- als auch Chromatidtypaberrationen beobachtet werden (Oya et al. 1986). Zudem kam es in anderen Arbeiten bei steigenden Dosen zu einer Verminderung des mitotischen Index, was auf vermehrtes Zellsterben hindeutet (Oya et al. 1986, Rueff et al. 1993). Die Fähigkeit von Wasserstoffperoxid sowohl Chromatidtypaberrationen als auch Chromosomentypaberrationen zu induzieren, spricht für eine S-Phase Abhängigkeit (Rueff et al. 1993).

Die ansteigende Konzentration Wasserstoffperoxid führt zu einer unterschiedlichen Ausprä-

gung von DNA-Schäden. Bei einer Behandlung zwischen 50 μM und 100 μM geht man von einer hauptsächlich Induktion von Basenschäden und Einzelstrangbrüchen aus (Dahm-Daphi et al. 2000); Einzelstrangbrüche konnten bereits ab einer Dosis von 10 μM Einzelstrangbrüche nachgewiesen werden (Wojewodzka et al. 2002). Bei hohen Dosen von Wasserstoffperoxid kommt es zu einer so häufigen Induktion dieser Schäden, dass sie gegenüberliegend auf der DNA wie ein Doppelstrangbruch erscheinen. So konnten ab einer Dosis von 200 μM (Iliakis et al. 1992) oder 1 mM (Dahm-Daphi et al. 2000) auch Doppelstrangbrüche beobachtet werden.

Somit würde man bis zu einer Konzentration von 100 μM Wasserstoffperoxid keine Chromosomenaberrationen erwarten. Oya et al. (1986) konnte bereits ab einer Dosis von 50 μM Wasserstoffperoxid sowohl Chromatidtyp- als auch Chromosomentypaberrationen beobachten und Caporossi et al. (2003) beobachteten Chromosomenaberrationen bereits bei einer Dosis von 30 μM . Diese beobachteten Chromosomenaberrationen müssen somit das Resultat eines Basenschadens bzw. eines Einzelstrangbruchs sein der auf eine Replikationsgabel stößt und nicht repariert wurde.

Andere Arbeiten analysierten die Bildung von Einzelstrangbrüchen oder Apoptose. Dabei konnte gezeigt werden, dass schon eine Dosis von 70 μM bei 34°C (Limoli et al. 1997) oder erst ab 1 mM (Iliakis et al. 1992) zu einer Reduktion der überlebenden Zellen auf 1 % führte. In der Folge beobachtete Limoli et al. (1997) bei einer Konzentration von bis zu 300 μM Wasserstoffperoxid keine Chromosomenaberrationen, wohl aber Einzelstrangbrüche und Basenschäden. Da bei dieser Konzentration nur noch sehr wenige Zellen überlebten, geht Limoli et al. (1997) davon aus, dass Wasserstoffperoxid nicht in der Lage ist, genomische Instabilität durch Chromosomenaberrationen zu induzieren, aber in der Lage ist, Zellen in die Apoptose zu bringen.

Die hier aufgezeigten Arbeiten insbesondere ihre Heterogenität zeigen auf, dass es wenig Daten gibt, die die Auswirkung von Wasserstoffperoxid auf die Chromosomen zu den verschiedenen Zellzyklusphasen zeigen. Zudem sind die Ergebnisse nicht einheitlich und auch in der hier vorliegenden Arbeit sind die gesammelten Daten schwer auszuwerten, da die benutzten Dosen bereits eine stark verzögernde Wirkung auf den Zellzyklus, sowie eine zytotoxische Wirkung hatten und somit nicht für alle Untersuchungszeiträume und Dosen die Mitosen ausgewertet werden konnten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zelluläre Strahlenempfindlichkeit variiert in Abhängigkeit des Zellzyklus. Im Verlauf der S-Phase variiert die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ebenfalls, zu Beginn der S-Phase zeigt sich eine deutliche Strahlensensitivität mit einem stetigen Anstieg zur extremen Resistenz in der späten S-Phase. Bei Eintritt der Zellen in die replikative S-Phase die intrazelluläre Signalkaskade zur Schadensdetektion durch ATM aktiviert und das NHEJ steht zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zur Verfügung. Im Verlauf der Replikation steht der Aktivierung der Schadensantwort auch die durch ATR vermittelte Signalkaskade zur Verfügung, welche zusätzlich die HR und die ICL (Interstrang-Crosslink)-Reparatur aktiviert. Die Kombination von Zellzyklus-kontrollpunkten und Regulation der DNA-Reparaturmechanismen könnte ursächlich für den deutlichen Anstieg der Resistenz im Verlauf der S-Phase sein und sollte sich anhand von chromosomalen Aberrationen nachweisen lassen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Methoden zur Synchronisierung von Zellen etabliert und hinsichtlich der durch Synchronisation induzierten Schäden überprüft. Es zeigte sich, dass alle drei Agenzien zu einer Anreicherung von Zellen in der G1-Phase führten, mit 60-80% der Zellen. Die Synchronisierung mit Aphidicolin und Thymidin führte zur Schädigung der DNA, mit $0,77 \pm 0,2$ - $1,5 \pm 0,28$ Chromatidtypaberrationen für Aphidicolin pro Zelle und $0,33 \pm 0,3$ - $0,76 \pm 0,16$ Chromatidtypaberrationen für Thymidin pro Zelle. Nach Synchronisierung mittels Isoleucin-Entzug wurde keine Schädigung beobachtet. Alle weiteren Experimente wurden nach Synchronisierung mittels Isoleucin durchgeführt.

Bezogen auf die Zellzyklusverteilung zeigte sich keine Verzögerung des S-Phase-Eintritts nach ionisierender Bestrahlung, mit 60%. Die Wasserstoffperoxid-Behandlung zeigte dagegen einen G1-Arrest und einen verzögerten S-Phase Eintritt, mit 27% nach 21h. Beide Agenzien verursachten eine vergleichbare Reduktion des mitotischen Index, mit 2 % 22 h nach Bestrahlung und 3,2% 26 h nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid. Dies lässt auf einen entsprechenden G2-Arrest schließen. Die erstmalige Analyse der Chromosomenaberrationen im zeitlichen Verlauf der S-Phase nach Bestrahlung zeigte, dass zu Beginn der S-Phase in erster Linie Chromosomentypaberrationen, mit $1,62 \pm 0,27$ auftraten, deren Anteil in der mittleren S-Phase sank und in der späten S-Phase nicht nachzuweisen war. Dagegen zeigte die Analyse der Chromatidtypaberrationen ein gegenläufiges Bild, zu der S-Phase Beginn keine und im Verlauf ein stetiger Anstieg, mit einem Maximum am Ende der S-Phase, mit $2,08 \pm 0,16$. Dies lässt darauf schließen, dass die Auswirkung von Mutationen verschiedener DNA-Reparaturwege sich hinsichtlich des Musters der chromosomalen Aberrationen in der S-Phase charakterisieren lassen. Dies soll in weiteren Experimenten auch hinsichtlich der entsprechenden Signalkaskaden geklärt werden um langfristig insbesondere Tumorzellen spezifisch zu strahlensensitivieren.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Aghamohammadi S.Z., Savage J.R.K. (1992) The effect of X-irradiation on cell cycle progression and chromatid aberrations in stimulated human lymphocytes using cohort analysis studies. *Mutation Research*, 268: 223-230
- Bartek J., Lukas C., Lukas J. (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5(10): 792-804
- Bartek J., Lukas J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell, Biol.*, 13: 738–747
- Blomen V.A., Boonstra J. (2007) Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 3084-3104
- Boei J., Vermeulen S., Skubakova M., Meijers M., Loenen W., Wolterbeek R., Mullenders L., Vrieling H., Giphart-Gassler M. (2012) No threshold for the induction of chromosomal damage at clinically relevant low doses of X rays.. *Radiation Research* 177(5):602-13
- Bolderson E., Richard D.J., Zhou B.S., Khanna K.K. (2009) Recent Advances in Cancer Therapy Targeting Proteins Involved in DNA Double-Strand Break Repair. *Clin Cancer Res* 15(20): 6314-6320
- Bootsma D., Budke L., Vos O. (1964) Studies on synchronous division of Tissue culture Cells initiated by excess Thymidine. *Experimental Cell Research* 33. 301-309
- Borgmann K., Dede M., Wrona A., Brammer I., Overgaard J., Dikomey E. (2004) For X-irradiated normal human Fibroblasts, only half of cell inactivation results from chromosomal damage. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 58, No. 2, 445–452
- Branzei D., Foiani M. (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 297-308
- Brown S. E., Szyf M. (2008) Dynamic epigenetic states of ribosomal RNA promoters during the cell cycle. *Cell Cycle* 7(3): 382-390
- Bryant P. (2004) Repair and chromosomal damage. *Radiotherapy and Oncology* 72: 251-256
- Bryant P., Mozdarani H. (2007) A comparison of G2 phase radiation-induced chromatid break kinetics using calyculin-PCC with those obtained using colcemid block. *Mutagenesis* 22 (5): 359-362
- Caporossi D., Ciafre S.A., Pittaluga M., Savini I., Farace M.G. (2003) Cellular responses to H2O2 and Bleomycin-induced oxidative stress in L6C5 rat myoblasts. *Free Radical Biology & Medicine* 35 (11): 1355–1364
- Carne F., Rosa M., Josep E. (1999) Chromosome aberrations induced by aphidicolin. *Mutation Research* 430: 47-53
- Conrad S., Künzel J., Löbrich M. (2011) Sister chromatid exchanges occur in G2-irradiated cells. *Cell Cycle* 10(2): 222-228;

- Cooper S., Chen K.Z., Ravi S. (2007) Thymidine block does not synchronize L1210 mouse leukaemic cells: implications for cell cycle control, cell cycle analysis and whole-culture synchronization. *Cell Proliferation* 41: 156-167
- Crissman HA, Oka MS, Steinkamp JA (1976) Rapid staining methods for analysis of deoxyribonucleic acid and protein in mammalian cells. *J Histochem Cytochem* 24(1): 64-71
- Dahm-Daphi J., Saß C., Alberti W. (2000) Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (1): 67-75
- Dikomey E., Borgmann K., Kriegs M., Mansour W., Rieckmann T. (2012) Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen. In: *Onkologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen* (Hrsg. Zeller, zur Hausen), ecomed, München, 2012, pp 1-19
- Dikomey E., Dahm-Daphi J., Kasten U. (2001) DNA-Schäden und ihre Reparatur. In: *Freyschmidt J* (Hrsg). *Handbuch Diagnostische Radiologie*. Springer-Verlag, Berlin
- Dunst J., Kampf R., Kimmig B., Kremer B. (2008) Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel Partikeltherapiezentrum ab 2012. *Schleswig-Holsteinisches Ärzteblatt* 10/2008: 63-68
- Durante M., Furusawa Y., Hideyuki M., Kawata T., Gotoh E. (1999) Association between G2-Phase Block and Repair of Radiation-Induced Chromosome Fragments in Human Lymphocytes. *Radiation Research* 151: 670-676
- Durante M., Gialanella G., Grossi G.F., Nappo M., Pugliese M., Bettega D., Calzolari P., Noris Chiorda G., Ottolenghi A., Tallone-Lombardi L. (1994) Radiation-induced chromosomal aberrations in mouse 10T1/2 cells: dependence on cell-cycle stage at the time of irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 65(4): 437-447
- Forrester H.B., Albright N., Ling C., Dewey W.C. (2000) Computerized Video Time-Lapse Analysis of Apoptosis of REC:Myc Cells X-Irradiated in Different Phases of the Cell Cycle. *Radiation Research* 154: 625-639
- Furler R.L. (2012) <http://www.robertlfurler.com/2012/01/09/why-is-glucose-metabolized-differently-throughout-the-cell-cycle> [Stand: 05.11.2014, 11:10]
- Galloway S.M., Miller J.E., Armstrong M.J., Bean C.L., Skopek T.R., Nichols W.W. (1998) DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens. *Mutation Research* 400: 169-186
- Ganten D., Ruckpaul K.(Hrsg.) (2003) *Grundlagen der Molekularen Medizin. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg. S.262 ISBN 3-540-43207-8
- Glover T. (2006) Common fragile sites. *Cancer Letters* 232:4-12
- Glover T., Berger C., Coyle J., Echo B. (1984) DNA polymerase a inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet* 67: 136-142
- Gray JW (1974) Cell cycle analysis from computer synthesis of deoxyribonucleic acid histograms. *J Histochem Cytochem* 22(7): 642-650

- Griffin C.S., Harvey A.N., Savage J.R.K. (1994) Chromatid damage induced by ²³⁸Pu α-particles in G₂ and S phase Chinese hamster V79 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 66(1): 85-98
- Hall E.J., Giaccia A.J. (2012) *Radiobiology for the Radiobiologist*, 7th Edition, Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, Figure 4.7
- Harper J.V. (2005) Synchronization of Cell Populations in G₁/S and G₂/M Phases of the Cell Cycle. *Cell Cycle Control* 296: 157-166
- Helleday T. (2003) Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research* 532: 103-115
- Helleday T., Lo J., van Gent D.C., Engelwald B.P., (2007) DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair* 6(7): 923-935
- Helleday T., Petermann E., Lundin C., Hodgson B., Sharma R.A. (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8(3): 193-204
- Hirao A., Kong Y.Y., Matusoka S., Wakeham A., Ruland J., Yoshida H., Liu D., Elledge S.J., Mak T.W. (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287, 1824-1827.
- Hofstetrova K., Uzlikova M., Tumova P., Troell K., Svard S.G., Nohynkova E. (2010) Giardia intestinalis: Aphidicolin influence on the trophozoite cell cycle. *Experimental Parasitology* 124: 159–166
- Hübscher U, Maga G, Spadari S. (2002) Eukaryotic DNA Polymerases. *Annual review of biochemistry* 71: 133-63
- Iliakis G.E., Pantelias G.E., Okayasu R., Blakely W. (1992) Induction by H₂O₂ of DNA and Interphase Chromosome Damage in Plateau-Phase Chinese Hamster Ovary Cell. *Radiation Research* 131: 192-203
- Jackson S.P., Bartek J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071-1078
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D., (2011) Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians* 61(2): 69-90
- Karp G. (2005) *Molekulare Zellbiologie*. Aus dem Amerikanischen übersetzt von Kurt Beginnen, Sebastian Vogel und Susanne Kuhlmann-Krieg
- Kato H. (1977) Mechanisms for Sister Chromatid Exchanges and Their Relation to the Production of Chromosomal Aberrations. *Chromosoma* 59: 179-191
- Kobayashi T., Hashimoto K., Okumura H., Asada H., Yoshikawa K. (1998) Endogenous EGF-Family Growth Factors are Necessary for the Progression from the G₁ to S Phase in Human Keratinocytes. *Journal of investigative Dermatology*. 111 (4): 616-620
- Krempler A., Deckbar D., Jeggo P.A. Löbrich M. (2007) An Imperfect G₂/M Checkpoint Contributes to Chromosome Instability Following Irradiation of S and G₂ Phase Cells. *Cell Cycle* 6(14): 1682-1686

- Kurose A., Tanaka T., Huang X., Traganos F., Darzynkiewicz Z. (2006) Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage. *Cell Prolif* 39: 231-240
- Labib K., De Piccoli G. (2011) Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Phil. Trans. R. Soc. B* 366: 3554-3561
- Laskey R.A., Fairman M.P., Blow J.J. (1989) S Phase of the Cell Cycle. *Science* 246: 609-614
- Limoli C.L., Kaplan M.I., Phillips J.W., Adair G.M., Morgan W.F. (1997) Differential Induction of Chromosomal Instability by DNA Strand-breaking Agents. *Cancer Research* 57: 4048-4056
- Liua C., Kawatab T., Furusawaa Y., Zhou G., Inouee K., Fukadab J., Kotab R., Georgef K., Cucinottag F., Okayasuc R. (2013) Chromosome aberrations in normal human fibroblasts analyzed in G0/G1 and G2/M phases after exposure in G0 to radiation with different linear energy transfer (LET); *Mutation Research* 756(1-2):101-7
- Morgan W.F., Crossen P.E. (1980) X Irradiation and Sister Chromatid Exchange in Cultured Human Lymphocytes. *Environmental Mutagenesis* 2: 149-155
- Mühlmann-Diaz M.C., Bedford J.S. (1995) Comparison of Gamma-Ray-Induced Chromosome Ring and Inversion Frequencies. *Radiation Research* 143: 175-180
- Nagasawa H., Little J.B., Inkret W.C., Carpenter S., Raju M.R., Chen D.J., Strniste G.F. (1991) Response of X-Ray-Sensitive CHO Mutant Cells (xrs-6c) to Radiation II. Relationship between Cell Survival and the Induction of Chromosomal Damage with Low Doses of a Particles. *Radiation Research* 126: 280-288
- Nagasawa H., Wilson P.F., Chen D.J., Thompson L.H., Bedford J.S., Little J.B. (2008) Low doses of alpha particles do not induce sister chromatid exchanges in bystander Chinese hamster cells defective in homologous recombination. *DNA Repair* 7: 515-522
- Nasnova E., Ritter S., Fomenkova T., Kraft G. (1998) Induction of chromosomal Damage in CHO-K1 Cells and their repair-deficient Mutant XRS5 by X-ray and particle irradiation. *Adv. Space Res* 22(4): 569-578
- Nikolova T., Ensminger M., Löbrich M., Kaina B. (2010) Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methylmethanesulfonate. *DNA Repair* (10):1050-1063
- Ohi R., Gould K.L. (1999) Regulating the onset of mitosis. *Current Opinion in Cell Biology* 11: 267-273
- Oya Y., Yamamoto K., Tonomura A. (1986) The biological activity of hydrogen peroxide I. Induction of chromosome-type aberrations susceptible to inhibition by scavengers of hydroxyl radicals in human embryonic fibroblasts. *Mutation Research* 172: 245-253
- Pantelias G.E., Maillie H.D. (1983) A Simple Method for Premature Chromosome Condensation Induction in Primary Human and Rodent Cells Using Polyethylene Glycol. *Somatic Cell Genetics* 9(5): 533-547
- Pedrali-Noy G., Spadari S., Miller-Faures A., Miller A.O.A., Kruppa J., Koch G. (1980) Synchrono-

- nization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase α with aphidicolin. *Nucleic Acids Research* 8(2): 377-387
- Pinkel D., Thompson L.H., Gray J.W., Vanderlaan M. (1985) Measurement of Sister Chromatid Exchanges at Very Low Bromodeoxyuridine Substitution Levels Using a Monoclonal Antibody in Chinese Hamster Ovary Cells. *Cancer Research* 45: 5795-5798
- Popescu N.C., Casto B.C., DiPaolo J.A. (1975) Infrequent Chromosome Aberrations in Syrian Hamster Cells Following Partial Synchrony by Amino-Acid Deprivation. *J. Cell Physiology* 86: 599-604
- Poxleitner, M.K., Dawson, S.C., Cande, W.Z. (2008) Cell cycle synchrony in *Giardia intestinalis* cultures achieved by using nocodazole and aphidicolin. *Eukaryotic Cell* 7: 569–574
- Radford I.R., Broadhurst S. (1988) Aphidicolin synchronization of mouse L cells perturbs the relationship between cell killing and DNA double-strand breakage after X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 53(2): 205-215
- Renault G., Gentil A., Chouroulinkov I. (1982) Kinetics of induction of sister-chromatid exchanges by X-rays through two cell cycles. *Mutation Research* 94: 359-368
- Rueff J., Bras A., Cristovao L., Mexia J., Sa da Costa M., Pires V. (1993) DNA strand breaks and chromosomal aberrations induced by H2O2 and 60Co γ -radiation. *Mutation Research* 289: 197-204
- Saffhill R., Ockey C.H. (1985) Strand breaks arising from the repair of the 5-bromodeoxyuridine-substituted template and methyl methanesulphonate-induced lesions can explain the formation of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 92: 218-224
- Saleh-Gohari N., Bryant H.E., Schultz N., Parker K.M., Cassel T.N., Helleday T. (2005) Spontaneous Homologous Recombination Is Induced by Collapsed Replication Forks That Are Caused by Endogenous DNA Single-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology* 25(16): 7158-7169
- Samaké S., Smith L.C. (1997) Synchronization of Cell Division in eight-cell Bovine Embryos Produced in vitro: Effects of Aphidicolin. *Theriogenology* 48:969-976
- Saplakoglu U., Iscan M. (1998) Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated in vitro with cadmium in G and S phase of their cell cycles. *Mutation Research* 412: 109-114
- Savage J.R.K. (1975) Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics* 12: 103-122
- Sax K. (1940) An analysis of X-Ray induced chromosomal Aberrations in *Tradescantia*. *Genetics* 25: 41-68
- Sayed-Aly M., Wojcik A., Schunck C., Obe G. (2002) Correlation of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individual CHO cells pre-labelled with BrdU and treated with DNaseI or X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 78(11): 1037-1044
- Shelby R, Monier K, Sullivan KF (2000) Chromatin assembly at Kinetochores is uncoupled from DNA replication. *The Journal of cell biology* 151(5):1113-8.

- Sipi P., Lindholm C., Salomaa S. (2000) Kinetics of formation of exchanges and rejoining of breaks in human G0 and G2 lymphocytes after low-LET radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 76(6): 823-830
- Statistisches Bundesamt: www.destatis.de; Gesundheitsberichterstattung des Bundes, <http://www.bpb.de/nachschlagen/zahlen-und-fakten/soziale-situation-in-deutschland/61832/todesursachen>
- Stoilov L., Wojcik A., Giri A.K., Obe G. (2002) Kinetics of formation of exchanges and rejoining of breaks in human G0 and G2 lymphocytes after low-LET radiation. *Mutagenesis* 17(5): 399-403
- Takeda D.Y., Dutta A. (2005) DNA replication and progression through S phase. *Oncogene* 24: 2827-2843
- Terzoudi G.I., Jung T., Hain J., Vrouvas J., Margaritis K., Donta-Bakoyiannis C., Makropoulos V., Angelakis P. Pantellias G.E. (2000) Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients: the role of cdk1/cyclin-B activity level in the mechanisms involved. *Int. J. Radiat. Biol.* 76(5): 607-615
- Tobey R.A., Ley K.D. (1971) Isoleucine-mediated Regulation of Genome Replication in Various Mammalian Cell Lines. *Cancer Research* 31: 46-51
- Tucker J.D., Auletta A., Cimino M.C., Dearfield K.L., Jacobson-Kram D., Tice R.R., Carrano A.V. (1993) Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutation Research* 297: 101-180
- Uto K., Inoue D., Shimuta K., Nakajo N., Sagata N. (2004). Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism. *The EMBO Journal* 23: 3386-3396
- Wilson D.M., Thompson L.H. (2007) Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research* 616:11-23
- Wilson P.F., Hinz J.M., Urbin S.S., Nham P.B., Thompson L.H. (2010b) Influence of homologous recombinational repair on cell survival and chromosomal aberration induction during the cell cycle in y-irradiated CHO cells. *DNA-Repair* 9:737-744
- Wilson P.F., Nagasawa H., Fitzek M.M., Little J.B., Bedford J.S. (2010) G2-Phase Chromosomal Radiosensitivity of Primary Fibroblasts from Hereditary Retinoblastoma Family Members and Some Apparently Normal Controls. *Radiation Research* 173: 62-70
- Wojcik A., Bruckmann E., Obe G. (2004) Insights into the mechanisms of sister chromatid exchange formation. *Cytogenet. Genome Res.* 104: 304-309
- Wojewodzka M., Buraczewska I., Kruszewski M. (2002) A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutation Research* 518: 9-20
- Xeros N. (1962) Desoxyriboside Control and Synchronozation of Mitosis. *Nature* 194: 682-683
- Yang S.J., Hahn G.M., Bagshaw M.A. (1966) Chromosome Aberrations induced by Thymidine. *Experimental Cell Research* 42: 130-135

8. LEBENS LAUF

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

9. DANKSAGUNG

Nach langjähriger Arbeit ist diese Doktorarbeit nun abgeschlossen und auch diese Arbeit ist nicht das Werk einer einzelnen Person; deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Zunächst einmal möchte ich mich ganz besonders bei PD Dr. rer. nat. Kerstin Borgmann bedanken, die mich über die langen Jahre geduldig und motivierend betreut hat und während allen Phasen dieser Arbeit immer wieder neue Denkanstöße und Erklärungen geliefert hat.

Ebenfalls gilt mein Dank Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey, der es mir ermöglicht hat, in seinem Institut die Dissertation zu machen.

Mein Dank gilt auch Alexandra Zielinski, die mich während der Zeit im Labor warmherzig unterstützt hat und auch am Mikroskop eine große Hilfe war und immer ein offenes Ohr für meine praktischen Fragen hatte.

Außerdem möchte ich den weiteren Mitarbeitern des Labors für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie danken, dass sie mich so herzlich aufgenommen haben und bei praktischen Fragen immer hilfreich zur Seite standen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung in dieser Zeit, meiner Mutter, die immer wieder rasch Korrektur gelesen hat, und meinem Vater, der stets ein Auge darauf hatte, dass die Arbeit abgeschlossen wird.

10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: