

Aus dem Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie
der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Leiter: Prof. Dr. E. Dikomey

Bedeutung von DNA-Doppelstrangbrüchen für den
permanenten G1-Arrest von normalen humanen
Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung

Dissertation

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

MIRCO AHRENS

aus Soltau

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

29.09.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter:

PD Dr. J. Dahm-Daphi

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter:

PD Dr. D. Rades

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung der Strahlentherapie in der Behandlung von Tumorerkrankungen	1
1.2 Fibrose als Spätreaktion nach Bestrahlung	1
1.3 Individuelle Strahlenempfindlichkeit	2
1.4 Mechanismen der Zelinaktivierung	3
1.4.1 Mitosetod	3
1.4.2 Apoptose	4
1.4.3 Zellzyklusarrest und Differenzierung	5
1.5 Bedeutung des G1-Kontrollpunkts für den permanenten G1-Arrest	10
1.6 Bedeutung von DNA-Doppelstrangbrüchen für den permanenten G1-Arrest	10
1.7 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Zellkulturen	14
2.2 Konfluenz	14
2.3 Restimulation und BrdU-Markierung	15
2.4 Bestrahlung	15
2.5 Fixation	16
2.6 Färbung	16
2.7 Flusszytometrie	17
2.8 Auswertung	18
2.9 Statistische Auswertung	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Zellzyklusprogression unbestrahlter Zellen	20
3.2 Zellzyklusprogression bestrahlter Zellen	22
3.3 Transienter und permanenter G1-Arrest	22
3.4 Dosisabhängigkeit des permanenten G1-Arrests	27
3.5 Zeitabhängigkeit des permanenten G1-Arrests	30
3.6 G1-Kontrollpunkt	32
3.7 Permanenter G1-Arrest bei verschiedenen Fibroblastenlinien	35

3.8	Zusammenhang zwischen dem permanenten G1-Arrest und der Anzahl initialer DNA-Doppelstrangbrüche bei verschiedenen Fibroblastenlinien	37
3.9	Zusammenhang zwischen dem permanenten G1-Arrest und der Anzahl residueller DNA-Doppelstrangbrüche bei verschiedenen Fibroblastenlinien	40
3.10	Zeitliche Abfolge von Doppelstrangbruch-Reparatur und G1-Kontrollpunkt	43
4	Diskussion	45
4.1	Messung des permanenten G1-Arrests (Definition, Möglichkeiten, Grenzen)	45
4.1.1	Dauer der Restimulations- und G1-Phase	46
4.1.2	Transienter G1-Arrest	47
4.1.3	Nicht-proliferierende Zellen	48
4.1.4	Primärer permanenter G1-Arrest	49
4.2	Dosisabhängigkeit des permanenten G1-Arrests	50
4.3	Zeitabhängigkeit des permanenten G1-Arrests	51
4.3.1	Bestrahlung vor der Restimulation	51
4.3.2	Bestrahlung nach der Restimulation	52
4.3.3	Bestrahlung vor dem G1-Kontrollpunkt	52
4.3.4	DNA-Doppelstrangbrüche am G1-Kontrollpunkt	54
4.4	Zelllinienabhängigkeit des permanenten G1-Arrests	55
4.4.1	Einfluss residueller DNA-Doppelstrangbrüche auf den permanenten G1-Arrest	56
4.4.2	Einfluss des permanenten G1-Arrests auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	57
4.4.3	Einfluss von p53 auf den permanenten G1-Arrest und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	58
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62
	Danksagung	73
	Lebenslauf	74
	Eidesstattliche Versicherung	75

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Strahlentherapie in der Behandlung von Tumorerkrankungen

Die Bestrahlung von soliden Tumoren gehört zu den etablierten therapeutischen Maßnahmen der modernen Medizin. Die Auswirkungen der Bestrahlung treffen grundsätzlich alle vermehrungsfähigen Zellen. Ziel der Strahlentherapie ist es, den Effekt auf das Tumorgewebe zu maximieren und dabei gleichzeitig die Nebenwirkungen, verursacht durch unvermeidliche Bestrahlung des Normalgewebes, so gering wie möglich zu halten. Dies beinhaltet eine optimale Anpassung des Bestrahlungsfelds an die Tumormasse sowie die Applikation einer unter der Wirkung/Nebenwirkung-Relation größtmöglichen Strahlendosis. Während beim kurativen Therapieansatz die Inaktivierung aller Tumorzellen angestrebt wird, zielt die palliative Therapie vor allem auf eine rasche Reduzierung des Tumolvolumens.

1.2 Fibrose als Spätreaktion nach Bestrahlung

Bei der Strahlentherapie von Tumoren kann es zu Nebenwirkungen kommen, die eine Reduktion der Bestrahlungsdosis notwendig machen und so den Erfolg einer kurativen Therapie beeinträchtigen können. Nebenwirkungen können aber auch erstmalig nach Abschluss der Strahlentherapie manifest werden. Je nach Zeitpunkt des Auftretens der unerwünschten Normalgewebsreaktionen werden Früh- von Spätreaktionen unterschieden. Frühreaktionen treten innerhalb der ersten 90 Tage nach Bestrahlungsbeginn auf; Spätreaktionen hingegen können auch erst nach Monaten oder Jahren auftreten. Typische Frühreaktionen sind Erytheme, Mucositis, Dermatitis, Strahlenmyelopathie und Knochenmarksnekrosen sowie Zytopenien; sie sind zumeist reversibel. Tritt ein besonders schwerer Akutschaden auf, so resultiert daraus der sogenannte "Consequential Late Effect", der eine narbige Abheilung des irreversibel geschädigten Normalgewebes bezeichnet. Spätreaktionen sind die Fibrose von Haut und inneren Organen, Teleangiektasien und Linsentrübung. Sie sind nicht reversibel und zeigen meist einen chronisch progredienten Verlauf. Die schweren, nicht tolerierbaren Spätreaktionen des bestrahlten Normalgewebes sind dabei der limitierende Faktor für die Dosierung bei der Strahlentherapie von Tumoren.

Eine der relevanten Spätreaktionen ist die Fibrose mit vermehrter Proliferation des Bindegewebes, die zu lebensbedrohlichen Komplikationen (z. B. an Leber, Niere, Lunge) führen kann. Zu berücksichtigen sind aber auch schwere, nicht-letale fibrotische Gewebeschäden, wie sie z. B. nach der Bestrahlung von Brustkrebspatientinnen auftreten können, bei denen sich durch fibrotisches Umwachsen von Nervenbahnen quälende, zum Teil lebenslang bestehende Schmerzsyndrome einstellen können (Überblick in Herrmann und Baumann 1997).

1.3 Individuelle Strahlenempfindlichkeit

Patienten zeigen hinsichtlich der Ausbildung einer Fibrose wie auch des Auftretens anderer Spätreaktionen nach Bestrahlung zum Teil ausgeprägte individuelle Unterschiede. Einige Patienten sind im Anschluss an eine Bestrahlung nach einem standardisierten Dosisschema beschwerdefrei, bei anderen stellen sich im weiteren Verlauf gravierende Komplikationen ein. Diese individuelle Strahlenempfindlichkeit wird auf genetische Faktoren zurückgeführt (Überblick in Burnet et al. 1998). Um das Therapieschema von Krebspatienten optimieren zu können, wird nach Parametern gesucht, die eine Voraussage der Strahlenempfindlichkeit ermöglichen. Dabei geht man grundsätzlich von der Annahme aus, dass für die Entstehung von Fibrose die Fibrozyten – nach Ausdifferenzierung von Fibroblasten – eine entscheidende Rolle spielen (Rodemann und Bamberg 1995). Fibroblasten werden aus Stanzbiopsien der Haut gewonnen und *in vitro* untersucht. Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit wird an Hand des Zellüberlebens im Kolonietest ermittelt. Bestrahlte Zellen werden verdünnt ausgesät und die gebildeten Kolonien nach etwa zwei Wochen ausgezählt. Eine Kolonie entspricht dabei der Nachkommenschaft einer überlebenden Zelle. Eine erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit zeigt sich in einer verminderten Fähigkeit zur Bildung von Kolonien. Dies setzt den Verlust der Teilungsfähigkeit der bestrahlten Zellen voraus, was als Zellinaktivierung bezeichnet wird.

Fibroblastenkulturen verschiedener Patienten weisen mitunter deutliche Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit auf. Der Zusammenhang zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit und Normalgewebsreaktionen wurde untersucht. Dabei zeigten sich in einigen Studien Korrelationen zwischen der Strahlenempfindlichkeit *in vitro* und dem Auftreten von Spätreaktionen (Burnet et al. 1992, Geara et al. 1993, Johansen et al. 1994,

1996; Brock et al. 1995); spätere Studien konnten dies allerdings nicht bestätigen (Rudat et al. 1997, 1999; Russel et al. 1998, Peacock et al. 2000). An den Reaktionen des Normalgewebes nach Bestrahlung scheinen neben der zellulären Strahlenempfindlichkeit auch andere Faktoren maßgeblich beteiligt zu sein. Die Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit zu verstehen ist Grundvoraussetzung zur Entwicklung prädiktiver Tests und zur Entwicklung neuer Ansätze zum Schutz des Normalgewebes. Die Mechanismen, die *in vitro* für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von Bedeutung sind, sind Gegenstand eingehender Untersuchungen.

1.4 Mechanismen der Zellinaktivierung

Zur Zellinaktivierung, die im Kolonietest gemessen wird, tragen prinzipiell drei Wege bei: (1) der Mitosetod, (2) die primäre/prämitotische/p53-abhängige Apoptose (Interphasetod) sowie (3) der primäre/prämitotische/p53-abhängige permanente Zellzyklusarrest (Überblick in Brammer und Jung 1993, Hendry und West 1997, Dikomey et al. 2003).

Die beschriebenen Inaktivierungswege sind in jeder Zellart unterschiedlich stark ausgeprägt. Der vorrangige Inaktivierungsweg von Fibroblasten nach therapeutisch relevanten Strahlendosen ist der Mitosetod. Desweiteren konnte festgestellt werden, dass Fibroblasten nach Bestrahlung vermehrt und beschleunigt zu Fibrozyten ausdifferenzieren (Rodemann et al. 1991). Dazu scheren die Zellen aus der G1-Phase aus. Als Auslöser der verstärkten Differenzierung wird ein Proliferationsstopp in der G1-Phase angenommen.

1.4.1 Mitosetod

Der Mitosetod ist der wichtigste Zellinaktivierungsweg aller proliferierenden Zellen. Puck und Marcus (1956) konnten erstmals zeigen, dass Bestrahlung zu einer Abnahme des Zellüberlebens im Kolonietest führt. Der mitotische Zelltod ist auf das Entstehen sogenannter letaler Chromosomenaberrationen zurückzuführen, die einen irreversiblen Verlust der Teilungsfähigkeit verursachen. Durch Bestrahlung kann es grundsätzlich zu Schädigungen aller Strukturen des Zytoplasmas und des Zellkerns kommen, nach Röntgen- und Gammabestrahlung vorwiegend verursacht durch Bildung von Hydroxylradikalen aus Wasser

(Goodhead 1994, Riley 1994). Am bedeutsamsten sind dabei Schädigungen der DNA wie Basenschäden, Einzel- und Doppelstrangbrüche (Ward 1988). Wird ein DNA-Schaden nicht oder nur falsch repariert, kann es während der Mitose unter Verlust eines DNA-Fragments zur Fixierung einer letalen Chromosomenaberration kommen. Der Verlust von DNA ist für die Zelle ein letales Ereignis, weil auf diese Weise essentielle Gene verloren gehen und es der Zelle in der Folge an lebenswichtigen Proteinen mangelt. Als Charakteristikum des mitotischen Zelltods bleibt somit festzuhalten, dass die Zelle zunächst noch eine Teilung durchlaufen muss, damit es in der Mitose zur Fixierung einer letalen Aberration kommt. Auf letale Chromosomenaberrationen und den damit verbundenen Verlust der Teilungsfähigkeit können Zellen auf unterschiedliche Weise reagieren. Entweder werden sie durch Apoptose abgebaut, zerfallen nekrotisch oder werden zu einer vorzeitigen Differenzierung gezwungen.

Da der mitotische Zelltod den Hauptinaktivierungsweg aller proliferierenden Zellen nach Bestrahlung darstellt, kommt der Reparatur von DNA-Schäden – die letztlich über die Bildung letaler Chromosomenaberrationen entscheidet – eine besondere Bedeutung zu. An der Erkennung von DNA-Schäden und deren Beseitigung sind eine Vielzahl von Mechanismen beteiligt (Kanaar et al. 1998, Nilsen und Krokan 2001, Karran 2000). Die meisten der erzeugten DNA-Schäden werden korrekt repariert, und nur wenige werden nicht oder falsch repariert. Es konnte gezeigt werden, dass das Zellüberleben von der Anzahl residueller, d. h. nicht-reparierter Doppelstrangbrüche bestimmt wird (Dikomey et al. 1998, Wurm et al. 1994, Kiltie et al. 1997, Sarkaria et al. 1998). Die Gesamtzahl der pro Gy erzeugten Doppelstrangbrüche variiert in normalen Zellen nicht oder nur sehr wenig (Dikomey et al. 1998, 2000). Durch die hochspezialisierten Reparatursysteme können selbst nach Bestrahlung mit 100 Gy innerhalb von 10 bis 16 Stunden 90 bis 98 % der initial erzeugten Doppelstrangbrüche repariert werden (Dikomey et al. 2000).

1.4.2 Apoptose

Die Apoptose wird auch als "programmierter Zelltod" bezeichnet. Sie ist eine Form der geregelten Zellbeseitigung, ein durch die Zelle selbst eingeleiteter kontrollierter Abbau. Apoptose tritt sowohl physiologisch im Rahmen der Zellalterung, unter dem Einfluss externer Wachstumsfaktoren oder immunologischer Attacken als auch bei Vorliegen von Zellstress und DNA-Schäden auf. Der Abbau erfolgt durch zahlreiche Enzyme unter der Bildung von

apoptotischen Körpern, die von phagozytierenden Zellen aufgenommen und dann weiter abgebaut werden. Bei der strahleninduzierten Apoptose ist zwischen der primären/prämitotischen Apoptose und der sekundären/postmitotischen Apoptose zu unterscheiden (Forrester et al. 1999, Shinomiya et al. 2000). Die sekundäre/postmitotische Apoptose tritt in Zellen auf, die nach Bestrahlung die erste Mitose durchlaufen haben und in denen sich letale Chromosomenaberrationen manifestiert haben. Sie ist somit eine der drei möglichen Folgereaktionen letaler Chromosomenschäden. Die primäre/prämitotische Apoptose stellt dagegen einen eigenständigen alternativen Inaktivierungsweg dar. Ausgelöst durch DNA-Schäden kommt es innerhalb weniger Stunden nach Bestrahlung und vor dem Erreichen der ersten Mitose (Interphasen) zum kontrollierten Zelltod. Auf diese Weise werden geschädigte Zellen aus der Wachstumspopulation entfernt, bevor DNA-Schäden während der Mitose in Form letaler Chromosomenaberrationen fixiert werden können. Für die Induktion von Apoptose ist ein funktionsfähiges p53 erforderlich (Lowe et al. 1993, Clarke et al. 1993). Die primäre/prämitotische Apoptose ist der charakteristische Inaktivierungsweg für bestimmte Zelltypen wie z. B. Lymphozyten und Thymozyten. Bei Fibroblasten hingegen tritt sie charakteristischerweise nicht auf, sondern wird durch das BCL2-Onkoprotein blockiert (Chung et al. 1998).

1.4.3 Zellzyklusarrest und Differenzierung

DNA-Schäden können zu einem Zellzyklusarrest führen. Hierbei muss grundsätzlich ein transienter von einem permanenten Arrest unterschieden werden. Ein transienter Arrest findet sich bei allen Zelltypen nach Bestrahlung vor allem in der G₂-Phase des Zellzyklus, bei Fibroblasten und anderen Zelltypen zudem in der G₁-Phase und nach höheren Dosen auch in der S-Phase. Beim transienten Arrest wird die Zelle vorübergehend im Zellzyklus angehalten. Die biologische Aufgabe besteht darin, dass Zellen erst dann in die nächste Phase des Zellzyklus eintreten, wenn die vorherige fehlerfrei abgeschlossen ist (Elledge 1996). Insbesondere durch den transienten G₂-Arrest wird der Zelle Zeit vor der Mitose zur Verfügung gestellt, um das genetische Material zu prüfen und eventuell vorhandene DNA-Schäden zu reparieren (Weinert und Hartwell 1988, Hartwell und Weinert 1989). In dieser Weise beeinflusst ein transienter Arrest zwar indirekt das Zellüberleben im Kolonietest, trägt aber selbst nicht zur Zellinaktivierung bei.

Der Arrest in der G1-Phase wurde erstmals von Little (1968) für Fibroblasten beschrieben. Fibroblasten zeigen nach Bestrahlung sowohl einen transienten als auch einen permanenten G1-Arrest (Nagasawa und Little 1983, Little und Nagasawa 1985). Durch den transienten G1-Arrest ist die Zelle in der Lage, DNA-Schäden zu beseitigen, bevor sie mit der hochkomplexen DNA-Replikation in der S-Phase beginnt (Kastan et al. 1991, Lane 1992). Ein permanenter Arrest bewirkt dagegen eine dauerhafte Blockierung der Zellen vor der S-Phase. Bei der permanenten Arretierung von Zellen in der G1-Phase wird grundsätzlich zwischen einem p53-abhängigen primären/frühen/prämitotischen G1-Arrest und einem sekundären/späten/postmitotischen G1-Arrest unterschieden. Treten als Folge nicht- oder falsch-reparierter DNA-Schäden in der Mitose letale Chromosomenaberrationen auf, so kann die Zelle sekundär, d. h. in der nächsten G1-Phase des Zellzyklus (postmitotisch) arretiert und dem Proliferationspool entzogen werden. Es handelt sich dabei um eine der drei möglichen Folgereaktionen des Mitosetods.

Ein strahleninduzierter primärer permanenter G1-Arrest ist dagegen bisher nur für normale Fibroblasten beschrieben worden. Er führt prophylaktisch (prämitotisch) dazu, dass Zellen mit DNA-Schäden gar nicht erst in die S-Phase gelangen. Nach Bestrahlung von normalen Fibroblasten mit 4 Gy konnten je nach Zelllinie Anteile von 7 bis 90 % permanent G1-arretierter Zellen ermittelt werden, welche die G1-Phase selbst nach 4 Tagen nicht verlassen konnten (Williams et al. 1997, Linke et al. 1997, Boyle et al. 1999). Dauerhaft in der G1-Phase blockierte Zellen können keine Kolonien mehr bilden. Der primäre permanente G1-Arrest stellt bei Fibroblasten nach Bestrahlung somit einen eigenständigen Inaktivierungsweg dar und macht etwa die Hälfte der Gesamtzellinaktivierung von Fibroblasten aus, während die andere Hälfte durch letale Chromosomenaberrationen hervorgerufen wird (Borgmann et al. 2004). Die große Bedeutung der permanenten Arretierung für ein proliferierendes Gewebe ist in der Bewahrung der genomischen Stabilität zu sehen, indem auf diese Weise geschädigte Zellen aus der Wachstumspopulation eliminiert werden können (Di Leonardo et al. 1994, Williams et al. 1997, Linke et al. 1997).

Für Fibroblasten wurde außerdem das mit der permanenten Arretierung eng verbundene Phänomen der strahleninduzierten terminalen Differenzierung untersucht. Die terminale Differenzierung verläuft von teilungsfähigen Fibroblasten über mehrere Zwischenstufen zu funktionellen Fibrozyten, die ihre Teilungsfähigkeit verloren haben und nicht in den Zellzyklus zurückkehren können (Bayreuther et al. 1988, 1991, 1992; Rodemann et al. 1989).

Das postmitotische Stadium kann entweder erreicht werden durch eine bestimmte Anzahl von Zellteilungen (Rodemann et al. 1989, Hayflick 1965, Rubin 1997) oder durch Exposition gegenüber verschiedenen Stressoren (Rodemann 1989, Rodemann et al. 1991, Serrano und Blasco 2001). Es konnte gezeigt werden, dass auch nach Bestrahlung die Ausdifferenzierung von Fibroblasten vermehrt und beschleunigt abläuft (Rodemann et al. 1991, Lara et al. 1996, Herskind et al. 2000). So konnte bei einer Lungenfibroblastenlinie bereits nach 1 Gy ein Anteil von 80 % terminal differenzierter Fibrozyten beobachtet werden. Auch hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Fibroblastenlinien (Herskind et al. 2000). Als essentieller Schritt für die terminale Differenzierung wird der permanente G1-Arrest angesehen, da der Ausgangspunkt der Differenzierung die G1-Phase ist, aus der die Fibroblasten in die G0-Phase ausscheren (Abb. 1.1).

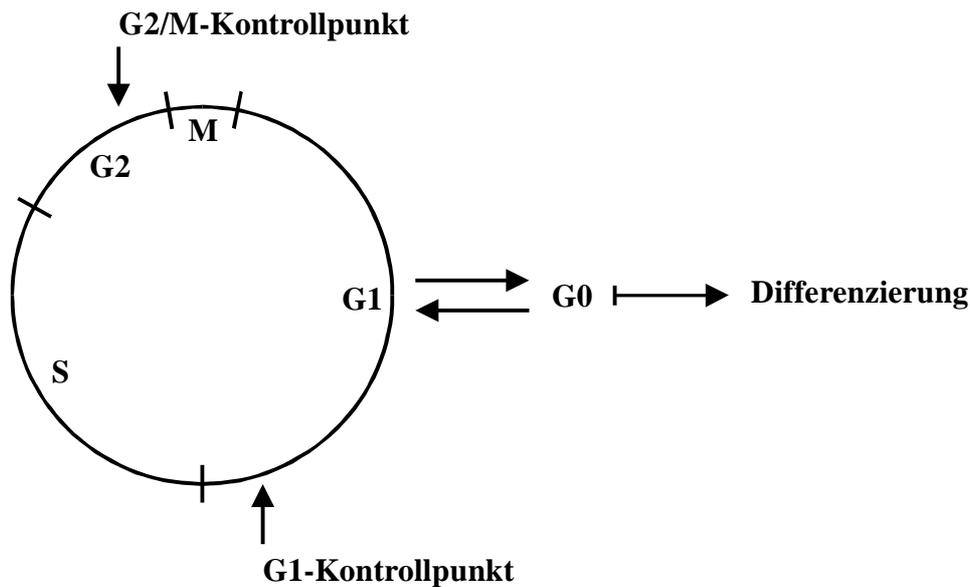


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Phasen des Zellzyklus und der Kontrollpunkte. Proliferierende Zellen durchlaufen die G1-, S-, G2- und M-Phase. Teilungsinaktive Zellen sind in der Regel in der G1-Phase aus dem Zellzyklus ausgetreten und befinden sich (reversibel) in der G0-Phase (Ruhephase) oder beschreiten (irreversibel) den Weg der terminalen Differenzierung. Die wichtigsten Kontrollpunkte sind der G1-Kontrollpunkt vor der S-Phase und der G2/M-Kontrollpunkt vor der Mitose.

Die molekularen Mechanismen, die zur Auslösung des strahleninduzierten G1-Arrests führen, sind nur zum Teil bekannt. Von entscheidender Bedeutung im Zellzyklus scheint als "Wächter des Genoms" (Lane 1992) das Produkt des Tumorsuppressorgens p53 zu sein

(Kastan et al. 1991, Kuerbitz et al. 1992). Das p53-Protein kann durch zahlreiche Stressoren der Zelle aktiviert werden und bewirkt eine Stabilisierung des Genoms durch (1) Bereitstellen von Zeit zur DNA-Reparatur vor der S-Phase (Kastan et al. 1991, 1992; Kuerbitz et al. 1992), (2) Aussortieren geschädigter Zellen aus der Wachstumspopulation durch permanenten G1-Arrest (Di Leonardo et al. 1994, Linke et al. 1997, Williams et al. 1997), (3) Beteiligung an DNA-Reparaturprozessen (Ford und Hanawalt 1995), (4) Bereitstellen von Zeit zur DNA-Reparatur in der G2-Phase (Bouffler et al. 1995, Stewart et al. 1995, Agarwal et al. 1995) und (5) Induktion von Apoptose (Lowe et al. 1993, Clarke et al. 1993).

Die ersten Schritte der Signaltransduktion scheinen für den transienten und den permanenten G1-Arrest gleich zu sein (Abb. 1.2). Durch Bestrahlung erzeugte DNA-Schäden führen zur Induktion von p53 (Nelson und Kastan 1994, Lu und Lane 1993). Unter normalen Umständen verbleibt das kurzlebige p53 auf niedrigem Niveau und zeigt eine relativ ineffiziente DNA-Bindungskapazität und eine nur geringe Transkriptionsaktivierung. Bestrahlung führt durch posttranslationale Modifikation des p53-Proteins zur Verlängerung der Halbwertszeit. Zusammen mit einer gesteigerten Produktion kommt es dadurch zu einem rapiden Anstieg von p53 nach Bestrahlung. Zusätzlich konnte eine erhöhte Fähigkeit sowohl zur DNA-Bindung als auch zur Aktivierung der Transkriptionsmaschinerie (Lakin und Jackson 1999) nachgewiesen werden. Das p53-Protein als Transkriptionsfaktor (Farmer et al. 1992, Funk et al. 1992) führt in der Folge zu einer vermehrten Expression von p21 (Di Leonardo et al. 1994). Das Protein p21 ist durch Eingreifen in die regulatorischen Mechanismen des Zellzyklus essentiell für die Auslösung eines permanenten G1-Arrests (Azzam et al. 2000). Die Progression von Zellen durch den Zellzyklus wird über Komplexe aus Cyclin-abhängigen Kinasen (engl.: "Cyclin dependent kinase", Cdk) und Cyclinen gesteuert. Die verschiedenen Cdks sind die katalytischen Untereinheiten dieser Komplexe. Sie sind nur in Verbindung mit den regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, enzymatisch aktiv. Die unterschiedlichen Cycline sind dabei jeweils nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus vorhanden. Das Retinoblastom-Protein (Rb) ist ein nachgeschaltetes Glied in der Signalkette. In der späten G1- und der S-Phase wird es durch Cdks phosphoryliert und setzt dadurch den Transkriptionsfaktor E2F frei, der für die Transkription der für die S-Phase benötigten Enzyme verantwortlich ist (Überblick in Wagener 1996). Das p21-Protein als Cdk-Inhibitor vermittelt seine Wirkung über die Bildung inhibitorischer Komplexe mit Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (Harper et al. 1993, Xiong et al. 1993, El-Diery et al. 1994). Die Komplexbildung der Cycline mit ihren Kinasen selbst wird dabei nicht behindert (Dulic et al.

1994). Für den Eintritt in die S-Phase sind insbesondere CyclinE/Cdk2-Komplexe (Dulic et al. 1992, Koff et al. 1992) und für den weiteren Verlauf der S-Phase CyclinA/Cdk2-Komplexe (Girard et al. 1991, Pagano et al. 1992) essentiell. Durch Blockierung dieser Kinasen unterbleibt die Phosphorylierung des Rb-Proteins (Buchkovich et al. 1989, Chen et al. 1989, DeCaprio et al. 1992). Das hypophosphorylierte Rb-Protein hält weiter den Transkriptionsfaktor E2F gebunden, so dass die Transkription der für den Eintritt in die S-Phase benötigten Enzyme nicht erfolgen kann (Weintraub et al. 1992, Weinberg 1995). Dadurch kommt es zum Zellzyklusarrest vor der S-Phase, d. h. zum G1-Arrest. Beim transienten G1-Arrest kommt es anschließend wieder zu einem Rückgang der p53-abhängigen Aktivierung von p21. Beim permanenten G1-Arrest dagegen wird die gleichzeitige Aktivierung des Proteins TGF- β für eine fortbestehende p21-Aktivierung verantwortlich gemacht (Ravitz und Wenner 1997). Die strahleninduzierte Aktivierung von TGF- β erfolgt zum einen durch Aktivierung von latentem TGF- β aus der extrazellulären Matrix und zum anderen durch p53-abhängige TGF- β -Expression (Barcellos-Hoff 1996, Ehrhart et al. 1997). Zudem kommt es zur Aktivierung weiterer Cdk-Inhibitoren wie p16 (Chen et al. 2004).

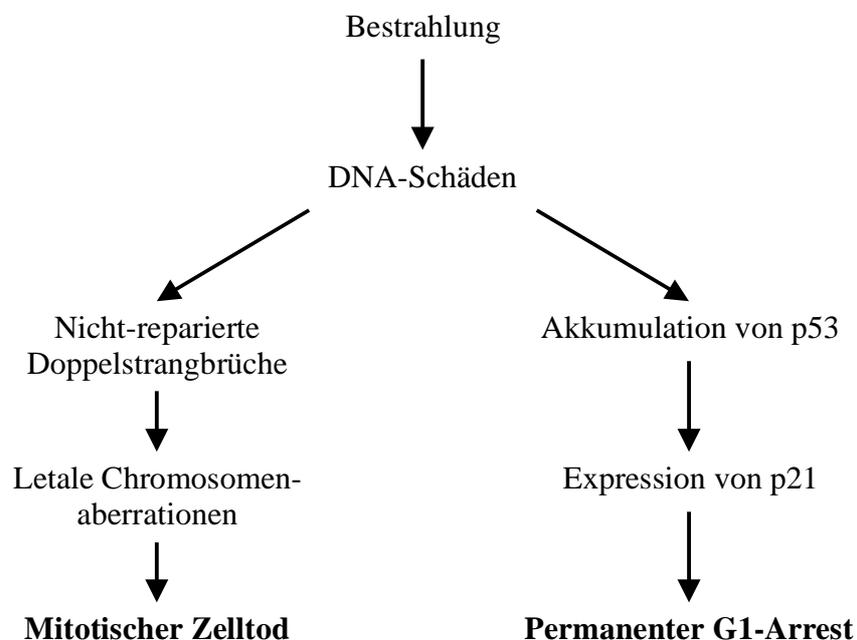


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Inaktivierungswege von normalen humanen Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung. Den gemeinsamen Ausgangspunkt für beide Wege der Zelinaktivierung stellen durch Bestrahlung verursachte DNA-Schäden, insbesondere Doppelstrangbrüche, dar. Nicht-reparierte Doppelstrangbrüche führen letztlich zum Mitosetod. Über Akkumulation von p53 und p21 kommt es zum dauerhaften Arrest von Fibroblasten in der G1-Phase. Apoptose als Mechanismus der Zelinaktivierung kommt bei Fibroblasten nicht vor (s. Text).

1.5 Bedeutung des G1-Kontrollpunkts für den permanenten G1-Arrest

Die Zelle verfügt über ein hochspezialisiertes Zellzyklus-Kontrollsystem (Pardee 1989, Little 1994, Elledge 1996, O'Connor 1997, Bernhard et al. 1995, Larner et al. 1997). Aufgabe eines solchen Systems ist es, das Voranschreiten im Zellzyklus zu kontrollieren und erst dann zu erlauben, wenn die Voraussetzungen für die nächste Phase geschaffen sind. Relativ gut untersucht sind zwei Kontrollpunkte im Zellzyklus: Der G1-Kontrollpunkt befindet sich vor der DNA-Replikation in der G1-Phase, der G2/M-Kontrollpunkt in der G2-Phase kurz vor der Mitose.

Es konnte gezeigt werden, dass die Auslösung des permanenten G1-Arrests abhängig davon war, zu welchem Zeitpunkt Zellen im Zellzyklus bestrahlt wurden. So konnte durch Bestrahlung von Zellen innerhalb der G1-Phase ab einem bestimmten Zeitpunkt vor der S-Phase kein G1-Arrest mehr ausgelöst werden (Nagasawa et al. 1984). Daraus wurde gefolgert, dass dem G1-Kontrollpunkt für die Auslösung des G1-Arrests eine bedeutende Rolle zukommt (Pardee 1989). Die Lokalisation des G1-Kontrollpunkts wurde genauer untersucht. In einer exponentiell wachsenden Fibroblastenkultur befanden sich 73 % der Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung vor einem G1-Kontrollpunkt in der G1-Phase (Gadbois und Lehnert 1997). Es konnte an durch Kontaktinhibition synchronisierten Normalfibroblasten, die durch verdünnte Aussaat zu erneuter Proliferation restimuliert wurden, gezeigt werden, dass bei Bestrahlung innerhalb der ersten 12 Stunden nach Restimulation die Proliferation vollständig unterbunden werden konnte. Hingegen konnten bei Bestrahlung später als 12 Stunden nach der Restimulation die Zellen weiterproliferieren und in die S-Phase eintreten. Unbestrahlte Kontrollen der gleichen Zelllinie traten aber erst ca. 16 Stunden nach der Restimulation in die S-Phase ein (Di Leonardo et al. 1994). Somit kann ein G1-Kontrollpunkt in der späten G1-Phase vermutet werden. Die Aufgabe des G1-Kontrollpunkts besteht darin, die zum G1-Arrest führenden Mechanismen – von der Detektion von DNA-Schäden über die Induktion von p53 und p21 bis zur Blockierung der Cyclin-abhängigen Kinasen – einzuleiten.

1.6 Bedeutung von DNA-Doppelstrangbrüchen für den permanenten G1-Arrest

Die Bedeutung von DNA- und Chromosomenschäden für die Strahlenempfindlichkeit wurde an Fibroblastenkulturen untersucht, die sich in ihrer Strahlenempfindlichkeit unterschieden.

Eindeutige Ergebnisse lieferte eine Studie, in der Korrelationen zwischen der Anzahl nicht-reparierter Doppelstrangbrüche, der Anzahl letaler Chromosomenaberrationen und der Strahlenempfindlichkeit festgestellt wurden (Dede, in Vorbereitung). Fibroblastenlinien, die eine relativ hohe Inaktivierungsrate, d. h. eine hohe Strahlenempfindlichkeit aufwiesen, zeigten auch relativ viele letale Chromosomenaberrationen und umgekehrt. Gleichzeitig wiesen diese Zelllinien eine relativ hohe Anzahl an nicht-reparierten Doppelstrangbrüchen auf. Die Messungen definierter DNA-Schäden konzentrierten sich dementsprechend auf Doppelstrangbrüche, die mit den Techniken der neutralen Gelelektrophorese gemessen wurden. Während die Anzahl der erzeugten Doppelstrangbrüche relativ konstant war und allein von der Strahlendosis abhing (Dikomey et al. 2000, El-Awady et al. 2003), wiesen die verschiedenen Fibroblastenlinien Unterschiede in der Anzahl nicht-reparierter Doppelstrangbrüche auf. Gleichzeitig wurde bei allen untersuchten Zelllinien eine Korrelation gefunden: Je größer die Anzahl der nicht-reparierten Doppelstrangbrüche war, desto strahlenempfindlicher war die Zelllinie (Wurm et al. 1994, Kiltie et al. 1997, Zhou et al. 1997, Sarkaria et al. 1998, Dikomey et al. 2000). Daraus kann gefolgert werden, dass die Anzahl der residuellen Doppelstrangbrüche entscheidend für den Mitosetod ist. Für die Abweichungen in der Anzahl nicht-reparierter Doppelstrangbrüche werden Unterschiede in der Reparaturkapazität der Zellen diskutiert. Noch ist allerdings unklar, welche Faktoren dafür verantwortlich sind (Kasten et al. 1999, Brammer et al. 2001).

Die Bedeutung von Doppelstrangbrüchen für den permanenten G1-Arrest ist Gegenstand eingehender Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass Doppelstrangbrüche die spezifischen Läsionen für die Induktion von p53 darstellen (Nelson und Kastan 1994, Lu und Lane 1993). Dies lässt die Vermutung zu, dass Doppelstrangbrüche die entscheidenden DNA-Schäden für die Auslösung eines permanenten G1-Arrests sind. Die Interpretation der Abhängigkeit des G1-Arrests von der Strahlendosis als "Eintrefferkurve" führte zu der Erkenntnis, dass allein ein einzelner Doppelstrangbruch für die Auslösung eines permanenten G1-Arrests ausreichend ist (Di Leonardo et al. 1994, Linke et al. 1997, Huang et al. 1996). In diesem Kontext wurde der Zusammenhang zwischen p53-Status und G1-Arrest, DNA-Reparatur sowie Strahlenempfindlichkeit untersucht. Bestrahlung von Fibroblasten führte dabei sowohl zum transienten als auch zum permanenten G1-Arrest. Es konnte gezeigt werden, dass Halten der Zellkultur in Konfluenz in Abhängigkeit von p53 zu einer Zunahme des Zellüberlebens führte. Während der Zeitspanne der Konfluenz hatten die Zellen Gelegenheit zur Reparatur potentiell letaler Schäden. Dadurch kam es zu einer Abnahme der

Chromosomenaberrationen und des transienten wie des permanenten G1-Arrests, was auf einen Zusammenhang zwischen der Reparatur potentiell letaler Schäden und der Auslösung der permanenten G1-Arretierung hindeutet (Little und Nagasawa 1985).

1.7 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es bei verschiedenen Fibroblastenlinien einen Zusammenhang zwischen dem permanenten G1-Arrest und der Anzahl initialer oder residueller Doppelstrangbrüche gibt. Eine bestehende Korrelation könnte dabei Hinweise liefern auf eine molekulare Verknüpfung zwischen Zellzykluskontrollmechanismen und DNA-Reparaturvorgängen. Es wurde schon erläutert, dass die Auslösung eines G1-Arrests entscheidend davon abhängt, zu welchem Zeitpunkt die Zellen in der G1-Phase bestrahlt werden. Spielt der G1-Kontrollpunkt für den G1-Arrest eine entscheidende Rolle, so muss insbesondere das Vorliegen von Doppelstrangbrüchen an diesem Kontrollpunkt betrachtet werden.

Der permanente G1-Arrest wurde folgendermaßen gemessen: Kulturen von normalen humanen Fibroblasten wurden durch einwöchiges Wachstum in Konfluenz gebracht. Durch Kontaktinhibition befanden sich die Zellen dann synchron in der G0-Phase des Zellzyklus. Die Zellen wurden in diesem Zustand bestrahlt, anschließend (sofort oder nach 16 Stunden Verzögerung) verdünnt ausgesät und damit zum Übergang von der G0- in die G1-Phase restimuliert. In ihrem Nährmedium wurden sie mit Bromdesoxyuridin (BrdU) inkubiert, das bei der Replikation in der S-Phase statt Thymidin in die DNA eingebaut wird. Damit wurden all diejenigen Zellen markiert, die in der Lage waren, die G1-Phase zu durchlaufen und in die S-Phase einzutreten. Zu verschiedenen Zeiten nach Restimulation (bis 96 Stunden) wurden die Zellen fixiert und der Anteil BrdU-positiver Zellen gemessen. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Flusszytometers, bei dem Zellen in Suspension einzeln auf gefärbte Zellinhaltsstoffe hin ausgemessen werden. Aus dem nach Bestrahlung verminderten Anteil an BrdU-markierten Zellen (im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen) wurde indirekt der Anteil strahleninduziert permanent G1-arretierter Zellen ermittelt. Im Einzelnen wurden untersucht:

(1) der permanente G1-Arrest in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Dabei wurde durch Bestrahlung mit verschiedenen Dosen eine unterschiedliche Anzahl initialer

Doppelstrangbrüche erzeugt. Gleichzeitig wurde durch unterschiedliche Reparaturzeiten die Anzahl residueller, d. h. nicht-reparierter Doppelstrangbrüche variiert. So konnte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Dosisabhängigkeit des permanenten G1-Arrests und der Anzahl initialer bzw. residueller Doppelstrangbrüche existiert.

(2) das Ausmaß des permanenten G1-Arrests in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung. Die zeitliche Position des G1-Kontrollpunkts im Zellzyklus wurde bestimmt. Durch Variation des Zeitpunkts der Bestrahlung relativ zum G1-Kontrollpunkt wurde die Anzahl der noch verbliebenen Doppelstrangbrüche variiert. Dadurch konnte untersucht werden, ob der G1-Arrest ansteigt, wenn die Bestrahlung zunehmend dichter an den G1-Kontrollpunkt herangerückt wird und ob dabei die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche von Bedeutung ist.

(3) der permanente G1-Arrest in Abhängigkeit von der Zelllinie. Neun verschiedene Fibroblastenlinien, die sich hinsichtlich ihres Reparaturvermögens für Doppelstrangbrüche und ihrer Strahlenempfindlichkeit unterscheiden, wurden dahingehend untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Anzahl residueller Doppelstrangbrüche und dem Anteil permanent in der G1-Phase arretierter Zellen besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturen

Alle Versuche wurden mit humanen Hautfibroblasten durchgeführt. Zum Einsatz kamen Fibroblastenlinien dreier Normalspender (NFHH, NFHH2, HSF13) sowie Zelllinien, die aus Hautbiopsien von Brustkrebspatientinnen (AF01 bis AF12, Johansen et al. 1996) gewonnen wurden. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen mit Grundflächen von 25 oder 75 cm² (Greiner, Frickenhausen). Als Nährmedium fungierten 5 bzw. 15 ml DMEM-Medium (Gibco, Paisley, UK), welches 15 % fetales Kälberserum (Gibco, Paisley, UK) enthält. Proliferation der Zellkultur und Verbleib bis zur Versuchsdurchführung erfolgten in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Für die Stammhaltung wurden die Zellen einmal pro Woche umgesetzt. Für die Versuche wurden Zellkulturen nach 6 bis 12 Passagen verwendet. Die Zellernte, d. h. das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden, erfolgte durch "Abtrypsinieren": Nach Absaugen des Zellmediums wurden die Zellkulturflaschen mit Trypsin-Lösung (0,1 ml pro cm² Flaschenboden; Gibco, Paisley, UK) versetzt und anschließend für 2 Minuten in einem Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Das "Abkugeln" der Zellen wurde unter einem Mikroskop verfolgt. Waren die Zellen vom Flaschenboden gelöst, wurden sie mit Zellmedium abgespült. Die Zellzählung erfolgte mit einem Coulter Counter (Coulter Electronics, Luton, UK).

2.2 Konfluenz

Die Synchronisation der Fibroblasten in der G₀-Phase des Zellzyklus wurde durch Kontaktinhibition erreicht. Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10⁴ Zellen pro cm² Flaschenboden ausplattiert. Konfluenz lag dann vor, wenn mikroskopisch zwischen den abgesetzten Fibroblasten kein freier Flaschenboden mehr sichtbar war. Die Zeitspanne bis zum Erreichen der Konfluenz betrug 5 bis 8 Tage. Flusszytometrische Kontrollmessungen ergaben, dass die Zellen dann zu mehr als 95 % den DNA-Gehalt von G₀- bzw. G₁-Phasezellen aufwiesen.

2.3 Restimulation und BrdU-Markierung

Zur Restimulation in den Zellzyklus wurden die konfluenten Fibroblasten abtrypsiniert, in 25-cm²-Gewebekulturflaschen verdünnt mit einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen pro cm² ausplattiert und mit 5 ml Zellmedium versetzt. Durch kontinuierliche Inkubation mit Bromdesoxyuridin (BrdU) konnten diejenigen Fibroblasten markiert werden, die während der Inkubationszeit in der Lage waren, in die DNA-Synthesephase (S-Phase) einzutreten oder diese zu durchlaufen. BrdU wurde dabei während der S-Phase des Zellzyklus an Stelle von Thymidin in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Zum Zeitpunkt der Restimulation wurden BrdU (Serva, Heidelberg) sowie Cytidin (Sigma, St. Louis, USA) zur Verhinderung von Zellzyklusstörungen durch BrdU in einer Endkonzentration von 0,8 µg/ml bzw. 0,64 µg/ml Zellmedium hinzugegeben (Abb. 2.1). Bis zu ihrer Fixation verblieben die Kulturen in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Zu verschiedenen Zeiten nach Restimulation (bis 96 Stunden) wurden die Zellen fixiert.

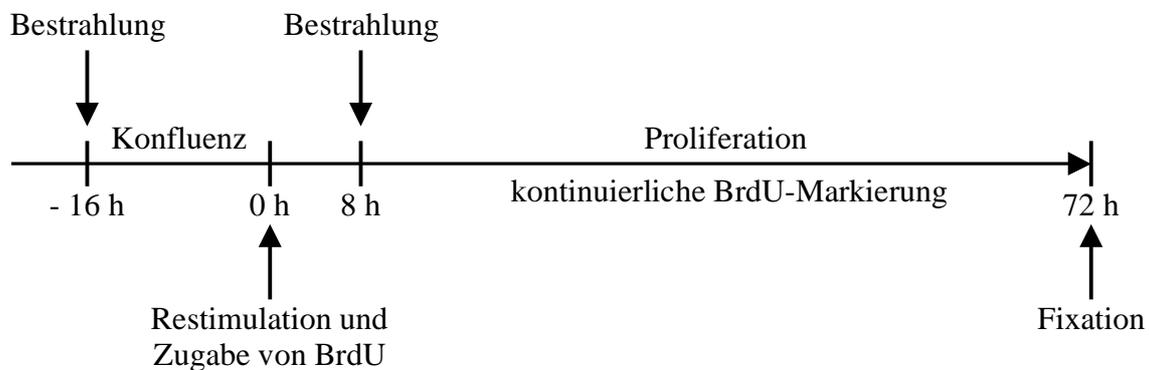


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Die Fibroblasten wurden durch Konfluenz synchronisiert und durch verdünnte Aussaat zur Proliferation restimuliert. Zum Zeitpunkt der Restimulation erfolgte die Zugabe von BrdU. Durch kontinuierliche Inkubation während der Proliferation wurden die Zellen mit BrdU markiert. Die Zellen wurden 72 h nach Restimulation fixiert, gefärbt und flusszytometrisch gemessen. Die Bestrahlung erfolgte zu verschiedenen Zeiten vor oder nach der Restimulation (hier: 16 h vor bzw. 8 h nach der Restimulation).

2.4 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Fibroblasten erfolgte mit einer technischen Röntgenröhre (Seifert, Ahrensburg). Die Röhrenspannung betrug 200 kV und die Anodenstromstärke 20 mA. Zur

Filterung wurde zusätzlich zum 0,5-mm-Al-Eigenfilter noch ein 0,5-mm-Cu-Filter eingesetzt. Bestrahlt wurde mit Dosisleistungen von 2 bis 4 Gy/min und Gesamtdosen von 1 bis 6 Gy. Die Normalfibroblasten wurden einmalig vor oder nach der Restimulation zu verschiedenen Zeitpunkten bestrahlt (Abb. 2.1). Die Bestrahlung vor der Restimulation erfolgte in Konfluenz. Bei Bestrahlung nach der Restimulation proliferierten die Zellen bereits im Zellzyklus.

2.5 Fixation

Die Fibroblasten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Restimulation fixiert (Abb. 2.1). Dazu wurden die Zellen nach Ablösen vom Flaschenboden durch Trypsin in 10 ml Medium aufgenommen und in Polystyrolröhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt. Anschließend wurden sie für 5 Minuten bei 400 g und Raumtemperatur zentrifugiert, mit 2 ml Tris-Puffer (1,2 g% Tris[hydroxymethyl]-aminomethan, 0,6 g% NaCl, 8,4 Vol.% 1 N HCl ad aqua dest.; pH 7,5) aufgenommen, auf einem Vortexer in 4 ml 70-prozentiges Ethanol eingetroppt und mit 6 ml 100-prozentigem Ethanol versetzt. Bis zur Färbung und Messung wurde die Zellsuspension bei -20 °C gehalten.

2.6 Färbung

Die BrdU-Markierung wurde durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Die fixierte Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Zur Denaturierung und Permeabilisierung der Zellen folgte nach Hinzufügen von 2 ml HCl-Triton-Lösung (0,1 Vol.% Triton X-100 [Serva, Heidelberg] ad 2 N HCl) eine 30-minütige Inkubation im Wasserbad bei 37 °C. Danach wurde zweimal mit 3 ml 0,1 M Borat-Lösung (3,8 g% $B_4Na_2O_7 \times 10 H_2O$ ad aqua dest.) und einmal mit 3 ml PBS (Phosphatpuffer-Lösung: 0,8 g% NaCl, 0,02 g% KCl, 0,1 g% $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$, 0,02 g% KH_2HPO_4 ad aqua dest.; pH 7,6) gewaschen. Um unspezifische Antigenstrukturen zu blockieren, wurden die Zellen in 1 ml PBT-Ziegen Serum-Lösung (0,5 Vol.% Tween 20 [Sigma, St. Louis, USA], 0,5 Vol.% Ziegen Serum [Gibco, Paisley, UK] ad PBS) für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zur Detektion des an Stelle von Thymin in die DNA

eingebauten BrdU kamen 100 µl einer ersten, gegen BrdU gerichteten Antikörper-Lösung (1 Vol.% Maus-Anti-BrdU-Immunglobulin [Dako, Glostrup, Dänemark] ad PBT-Ziegenserum-Lösung) zum Einsatz. Die Inkubation fand für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Dunkelheit statt. Es folgten zweimaliges Waschen mit 3 ml PBS sowie 15-minütiges Inkubieren mit 1 ml PBT-Ziegenserum-Lösung, gefolgt von Zentrifugieren und Abgießen des Überstands. Der erste Antikörper wurde mit 100 µl einer zweiten Antikörper-Lösung (2,5 Vol.% Ziege-Anti-Maus-Immunglobulin [Dako, Glostrup, Dänemark] ad PBT-Ziegenserum-Lösung) markiert; dieser zweite Antikörper band an den ersten Antikörper und war mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) verbunden. Die 1-stündige Inkubation erfolgte in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Anschließend wurde zweimal mit 3 ml PBS gewaschen. Zur gleichzeitigen Fluoreszenzfärbung der gesamten DNA wurde 1 ml Propidiumjodid-Lösung (0,1 g% Propidiumjodid ad PBS) hinzugegeben. Nach Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit für 15 Minuten und Filtration der Zellsuspension durch eine Nylon-Gaze mit einer Porengröße von 53 µm (Sefar, Rüslikon, Schweiz) verblieben die Zellen in der Färbelösung bis zur Messung im Kühlschrank bei 4 °C.

2.7 Flusszytometrie

Die Messung der Fluoreszenzen erfolgte mit einem Flusszytometer FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Die Zellen wurden dabei mit einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Erfasst wurden pro Zelle zwei Fluoreszenzintensitäten. Abbildung 2.2 zeigt exemplarisch die Ergebnisse zweier Messungen. In der Punktwolken-Darstellung (englisch: "Dot Plot") entspricht jeder Punkt einer Zelle, für die eine Rot- und eine Grün-Fluoreszenz gemessen wurde. Die Rot-Fluoreszenz wurde mit einem Langpass-Filter (F13-H) bei Wellenlängen > 670 nm gemessen und stammte im Wesentlichen vom Propidiumjodid (Emissionsmaximum bei 617 nm); sie war folglich dem DNA-Gehalt einer Zelle proportional. Auf diese Weise konnten Zellen mit einfachem DNA-Gehalt von Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt unterschieden werden. Die Grün-Fluoreszenz wurde mit einem Bandpass-Filter (F11-H) bei einer Wellenlänge von 515 bis 545 nm gemessen und setzte sich aus der schwachen Autofluoreszenz der Zelle sowie der Anti-BrdU-FITC-Fluoreszenz zusammen (Emissionsmaximum bei 525 nm). Sie war somit dem BrdU-Gehalt proportional, was darauf schließen ließ, ob die Zelle irgendwann innerhalb der BrdU-Inkubationszeit in die S-Phase des Zellzyklus eingetreten war oder diese durchlaufen hatte. Bei den

flusszytometrischen Ausmessungen wurden jeweils zwischen 1000 und 5000 Zellen erfasst. Die gemessenen Daten wurden mit einem Macintosh-Computer aufgenommen.

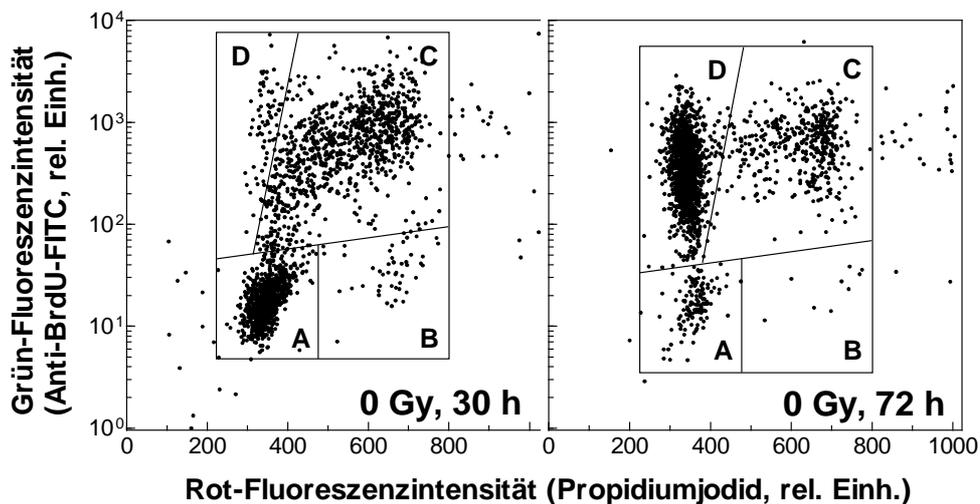


Abb. 2.2: Punktwolken-Darstellung (englisch: "Dot Plot") zweier flusszytometrischer Messungen mit Auswahlfenstern ("Gates") zur Bestimmung der Anteile von Subpopulationen. Kontaktinhibierte humane Fibroblasten (NFHH) wurden restimuliert, mit BrdU inkubiert und nach 30 bzw. 72 h fixiert und gefärbt. Die Messung erfolgte mit einem FACScan-Flusszytometer. Jeder Punkt entspricht einer Zelle, für die zwei Fluoreszenzintensitäten gemessen wurden. Die Rot-Fluoreszenzintensität stammt vom Propidiumjodid und ist dem DNA-Gehalt proportional. Die Grün-Fluoreszenzintensität stammt vom FITC und ist dem BrdU-Gehalt (plus Autofluoreszenz) proportional. Die Auswertung erfolgte durch interaktives Setzen von Auswahlfenstern, die die folgenden Subpopulationen umschließen:

- A: unmarkierte Zellen in der G0- bzw. G1-Phase ohne Eintritt in die S-Phase (einfacher DNA-Gehalt und Grün-Autofluoreszenz),
- B: unmarkierte Zellen in der G2-Phase ohne Eintritt in die S-Phase (doppelter DNA-Gehalt und Grün-Autofluoreszenz),
- C: markierte Zellen innerhalb der S-Phase oder in der G2-Phase nach Durchlaufen der S-Phase (erhöhter bis doppelter DNA-Gehalt und erhöhter BrdU-Gehalt),
- D: markierte Zellen in der G1-Phase nach Durchlaufen der S-Phase und Mitose (einfacher DNA-Gehalt und erhöhter BrdU-Gehalt).

2.8 Auswertung

Die flusszytometrischen Daten wurden mit der Software Cell Fit (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) ausgewertet. An Hand der Punktwolken-Darstellungen wurde der Anteil BrdU-positiver Zellen bestimmt. Dazu wurden am Computerbildschirm interaktiv Auswahlfenster (englisch: "Gates") festgelegt, indem um abgrenzbare Punktwolken Begrenzungslinien gelegt

wurden, welche Subpopulationen von Zellen umschlossen. Die Anzahl der Zellen in diesen Auswahlfenstern wurde registriert.

In der Abbildung 2.2 umschließt Auswahlfenster A jene Zellen, die einen einfachen DNA-Gehalt besitzen und kein BrdU in ihre DNA eingebaut haben und deren schwache Grün-Fluoreszenz allein von der Autofluoreszenz stammt. Auswahlfenster B enthält Zellen, die ebenfalls kein BrdU eingebaut haben und einen doppelten DNA-Gehalt zeigen. Auswahlfenster C umgrenzt Zellen, die eine BrdU-Markierung und einen erhöhten DNA-Gehalt aufweisen. Auswahlfenster D beinhaltet Zellen, die BrdU eingebaut haben und einen einfachen DNA-Gehalt besitzen. Als BrdU-positiv wurden die Zellen der Auswahlfenster C und D gewertet. Zellen in Auswahlfenster C sind proliferierende Zellen, die nach der Restimulation bis in die erste S-Phase oder die erste G2- oder M-Phase vorgewandert sind und dabei während der S-Phase BrdU in die neusynthetisierte DNA eingebaut haben. Bei den Zellen in Auswahlfenster D handelt es sich um jene Zellen, welche darüber hinaus die erste Zellteilung durchlaufen haben und sich in der G1-Phase des nächsten Zellzyklus befinden. Weil durch die Teilung aus einer BrdU-positiven Zelle zwei Tochterzellen entstehen, wurde zur Bestimmung des Anteils BrdU-positiver Zellen nur die Hälfte der von Auswahlfenster D umschlossenen Subpopulation gewertet. Der Anteil BrdU-positiver Zellen, f_{BrdU} , wurde gemäß Gleichung 2.1 berechnet:

$$f_{\text{BrdU}} = \frac{C + \frac{1}{2}D}{A + B + C + \frac{1}{2}D} \quad (\text{Gl. 2.1}),$$

wobei A, B, C und D die jeweilige Anzahl von Zellen in den gleichnamigen Auswahlfenstern darstellen.

2.9 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen und Kurvenanpassungen (englisch: "Fits") wie auch grafische Darstellungen wurden mit dem Statistik- und Grafikprogramm PRISM (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Kurvenanpassungen erfolgten mit Hilfe nicht-linearer Regression.

3 Ergebnisse

3.1 Zellzyklusprogression unbestrahlter Zellen

Abbildung 3.1 zeigt an Hand einer ausgewählten Serie flusszytometrischer Messungen (0 h und 0 Gy, 17 h bis 72 h) die Progression von unbestrahlten humanen Fibroblasten durch den Zellzyklus. Normalfibroblasten konfluenter Kulturen (der Linie NFHH) wurden durch verdünnte Aussaat zu erneuter Proliferation angeregt (restimuliert), dabei kontinuierlich mit BrdU inkubiert und 17, 30, 40 bzw. 72 h nach Restimulation gemessen.

Unmittelbar nach Restimulation (Abb. 3.1, 0 h) waren zwei Gruppen von Zellen zu erkennen, wobei die meisten den DNA-Gehalt von G₀- bzw. G₁-Phasezellen (Auswahlfenster A) und nur wenige den doppelten DNA-Gehalt von G₂-Phasezellen (B) aufwiesen. Die Darstellung von proliferierenden Zellen durch eingebautes BrdU ist zu diesem Zeitpunkt (0 h Inkubationsdauer) noch nicht möglich. Die nächste Messung zeigt, dass 17 h nach der Restimulation einige wenige Fibroblasten ($\leq 5\%$) bereits die S-Phase (17 h, C) bzw. die Zellteilung (17 h, D) durchlaufen hatten; diese bildeten den kleinen Anteil proliferierender Zellen, der auch in konfluenten Kulturen immer zu finden ist. Die meisten Zellen befanden sich jedoch noch in der G₀- oder G₁-Phase (17 h, A). Dies verdeutlicht, dass innerhalb der ersten 17 h keine oder nur wenige Zellen aus der G₀-Phase die S-Phase erreicht hatten. Zum Zeitpunkt von 30 h nach der Restimulation war eine größere Fraktion von Zellen mit erhöhtem BrdU- und DNA-Gehalt zu erkennen (30 h, C). Dies zeigt, dass viele Fibroblasten in die S-Phase des Zellzyklus eingetreten waren. Nach 40 h Proliferationsdauer waren deutlich Fraktionen von Zellen in der G₂-Phase nach DNA-Replikation (40 h, C) sowie in einer späteren G₁-Phase nach mitotischer Zellteilung zu erkennen (40 h, D). Nach 72 h wies Punktvolke C keine S-Phasezellen mehr auf, die aus der Punktvolke A hervorgegangen waren, was derart gedeutet wurde, dass alle proliferationsfähigen Zellen die G₀- und die G₁-Phase verlassen hatten. Die Fraktion jener Zellen, die gar nicht in die S-Phase eingetreten waren, zeigte 72 h nach Restimulation ein Minimum (72 h, A und B). Demgegenüber stand ein großer Pool von Zellen, die proliferiert hatten (72 h, C und D; 89 %). Besonders deutlich war die Zellfraktion zu erkennen, deren Fibroblasten mindestens eine Mitose durchlaufen hatten und sich erneut in der G₁-Phase befanden (72 h, D).

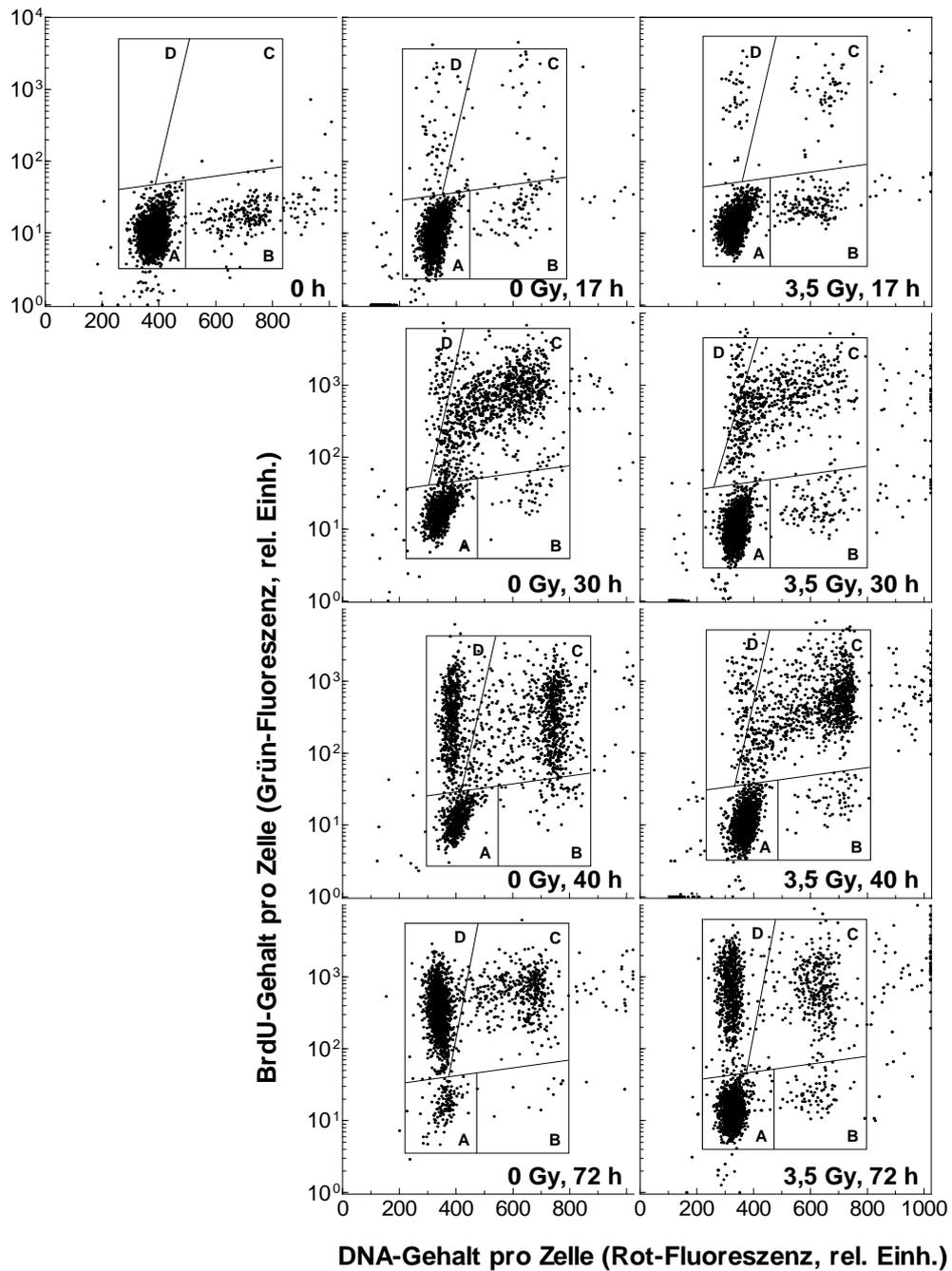


Abb. 3.1: Zellzyklusprogression von unbestrahlten und bestrahlten humanen Fibroblasten nach Restimulation aus der Konfluenz. Kontaktinhibierte Zellen (NFHH) wurden mit 0 oder 3,5 Gy bestrahlt, durch verdünnte Aussaat restimuliert, kontinuierlich mit BrdU inkubiert und nach 0, 17, 30, 40 bzw. 72 h fixiert und gefärbt. Pro Zelle (Punkt) wurde der Gehalt an DNA und BrdU mit dem Flusszytometer gemessen. Mit Hilfe der Auswahlfenster A bis D wurden die Anteile der Zellen in den Subpopulationen quantifiziert (vgl. Abb. 2.2). Der Anteil der BrdU-positiven Zellen (C und D) nahm bei den unbestrahlten Zellen mit der Zeit von 5 % (0 Gy, 17 h) auf 89 % (0 Gy, 72 h) zu, während dieser Anteil bei bestrahlten Zellen lediglich von 4 % (3,5 Gy, 17 h) auf 44 % (3,5 Gy, 72 h) anstieg.

3.2 Zellzyklusprogression bestrahlter Zellen

Abbildung 3.1 zeigt außerdem an Hand weiterer Messungen (3,5 Gy, 17 h bis 72 h) die Auswirkung von Röntgenbestrahlung auf die Proliferation von Fibroblasten. Die Zellen wurden dabei in Konfluenz mit einer Dosis von 3,5 Gy bestrahlt und unmittelbar danach restimuliert.

Wie bei den unbestrahlten war auch bei den bestrahlten Fibroblasten 17 h nach Restimulation kein nennenswerter Anteil von Zellen zu beobachten, der bereits in die S-Phase eingetreten war (Auswahlfenster C). Die Messungen zu späteren Zeitpunkten zeigten qualitativ die gleichen Abschnitte der Zellzyklusprogression mit einem deutlichen Anteil an S-Phasezellen nach 30 h (C), einer Zunahme der markierten Zellen in der G2-Phase und ersten Teilungen nach 40 h (C und D) sowie mit der finalen Anhäufung der markierten Zellen in einer späteren G1-Phase nach 72 h (D). Die Messungen zeigten jedoch quantitative Unterschiede in zweierlei Hinsicht: (1) Das Einsetzen der ersten Teilungen erfolgte bei den bestrahlten Zellen später (3,5 Gy, 40 h) als bei den unbestrahlten (0 Gy, 40 h). (2) Der Anteil der Zellen, die am Ende der Beobachtungszeit markiert waren, war nach Bestrahlung mit 44 % deutlich geringer (3,5 Gy, 72 h) als ohne Bestrahlung (0 Gy, 72 h: 89 % markierte Zellen). Das bedeutet gleichzeitig, dass der Anteil an Zellen, die in der G0- bzw. G1-Phase aufgehalten wurden und damit unmarkiert blieben, nach Bestrahlung deutlich größer war. Dass nach Bestrahlung mehr Zellen in der G0- bzw. G1-Fraktion verblieben, wird dem strahleninduzierten permanenten G1-Arrest zugeschrieben. Zur Quantifizierung der Zellzykluseffekte wurde der Anteil BrdU-positiver Zellen (nach Gl. 2.1) bestimmt.

3.3 Transienter und permanenter G1-Arrest

Abbildung 3.2 zeigt den Anteil BrdU-positiver Fibroblasten (der Linie NFHH) in Abhängigkeit von der Zeit nach Restimulation. Untersucht wurden sowohl unbestrahlte (Kontrolle) als auch bestrahlte Fibroblastenkulturen, die jeweils Röntgenstrahlen mit einer Dosis von 3,5 Gy ausgesetzt wurden. Die Zellen wurden entweder unmittelbar danach (unmittelbare Restimulation) oder 16 h später (verzögerte Restimulation) restimuliert.

Die Abbildung zeigt, dass in allen drei Fällen während der ersten 17 h nach der Restimulation keine nennenswerten Anteile von Zellen markiert wurden; die Zellen benötigten diese Zeitspanne, um die G0-Phase zu verlassen und die G1-Phase zu erreichen. Erst danach begannen Zellen, in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten und BrdU in ihre DNA einzubauen. Der Anteil BrdU-positiver Zellen stieg in der Folge bis 60 h nach Restimulation stetig an, um sich dann einem konstanten Maximalwert zu nähern. Die Daten wurden mit einer Gompertz-Funktion gefittet entsprechend der Formel:

$$f_{\text{BrdU}} = \exp \left\{ b - \left(\frac{a}{t+d} \right)^{1/c} \right\} \quad (\text{Gl. 3.1}),$$

wobei f_{BrdU} den Anteil der BrdU-positiven Zellen zum Zeitpunkt t nach Bestrahlung repräsentiert und a , b , c und d Koeffizienten darstellen. Die Funktion besitzt einen Maximalwert $f_{\text{BrdU,max}} = \exp(b)$; die für die drei Versuchsbedingungen berechneten Werte sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Der maximale Anteil markierter Zellen lag bei der unbestrahlten Kontrolle mit einem Wert von 61 % am höchsten, nach Bestrahlung und verzögerter Restimulation mit 49 % niedriger und nach unmittelbarer Restimulation mit 38 % am niedrigsten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die Bestrahlung ein Teil der Zellen (zumindest für die Dauer der Beobachtungszeit von 96 h) permanent in der G1-Phase arretiert wurde. Der Anteil arretierter Zellen war dabei bei Bestrahlung unmittelbar vor der Restimulation deutlich größer als bei verzögerter Restimulation.

Es fällt auf, dass auch bei unbestrahlten Kulturen 39 % der Zellen nicht in den Zellzyklus eintraten, sondern dauerhaft in der G0- oder G1-Phase verblieben. Dieser Anteil permanent G1-arretierter Zellen war demnach nicht strahleninduziert. Unter der Annahme, dass dieser Anteil nicht-proliferationsfähiger Zellen mit und ohne Bestrahlung gleich ist, wurden diese Zellen durch eine Normierung auf die unbestrahlte Kontrolle nicht weiter berücksichtigt. Die durch Bestrahlung verursachte Erniedrigung des Maximalwerts ist auf diejenigen Zellen zurückzuführen, die als Folge der Bestrahlung selbst nach 96 h nicht in der Lage gewesen waren, in die S-Phase einzutreten, und die deshalb als strahleninduziert "permanent in G1 arretierte Zellen" (Williams et al. 1997) bezeichnet werden. Der Anteil dieser Zellen wurde (für verzögerte und unmittelbare Restimulation) berechnet als relative Abnahme des

jeweiligen Maximalwerts, $f_{\text{BrdU,max}}(3,5 \text{ Gy})$, bezogen auf den der unbestrahlten Kontrolle, $f_{\text{BrdU,max}}(0 \text{ Gy})$:

$$f_{\text{G1}} = \frac{\text{BrdU}_{\text{max},0 \text{ Gy}} - \text{BrdU}_{\text{max},3,5 \text{ Gy}}}{\text{BrdU}_{\text{max},0 \text{ Gy}}} \quad (\text{Gl. 3.2}).$$

Für die Zelllinie NFHH ergab sich demzufolge nach Bestrahlung mit 3,5 Gy ein Anteil strahleninduziert permanent arretierter Zellen von 38 % für unmittelbare Restimulation und 20 % für verzögerte Restimulation (Tab. 3.1). Bei den folgenden Experimenten wurde der maximale Anteil BrdU-positiver Zellen nicht mehr durch Messung vollständiger Einbau-Kinetiken bestimmt, sondern nach BrdU-Inkubation über 72 h, da sich zu diesem Zeitpunkt alle Kurven bereits im Plateau befanden.

Die Fitkurven von Abbildung 3.2 zeigen außerdem, dass die bestrahlten Fibroblasten gegenüber den unbestrahlten verzögert in die S-Phase einliefen. Um für eine Zellkultur, bestrahlt oder unbestrahlt, einen Zeitpunkt für den Eintritt in die S-Phase zu definieren, wurde, wie von Williams et al. (1997) vorgeschlagen, der Zeitpunkt herangezogen, an dem die Hälfte der proliferierenden Zellen nach der Restimulation in die S-Phase eingetreten war. Dies entspricht dem Zeitpunkt des Halbmaximalwerts der Kurven. Die Berechnung ergab für die Kurven der Abbildung 3.2, dass der Eintritt der unbestrahlten Zellen in die S-Phase 23 h nach der Restimulation erfolgte, während bestrahlte Zellen, die verzögert restimuliert wurden, erst nach 31 h und Zellen, die unmittelbar nach Bestrahlung restimuliert wurden, nach 33 h in die S-Phase eintraten. Die zeitliche Differenz im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollkultur wird als transienter G1-Arrest bezeichnet. Dieser betrug 8 h für verzögert und 10 h für unmittelbar nach Bestrahlung restimulierte Zellen.

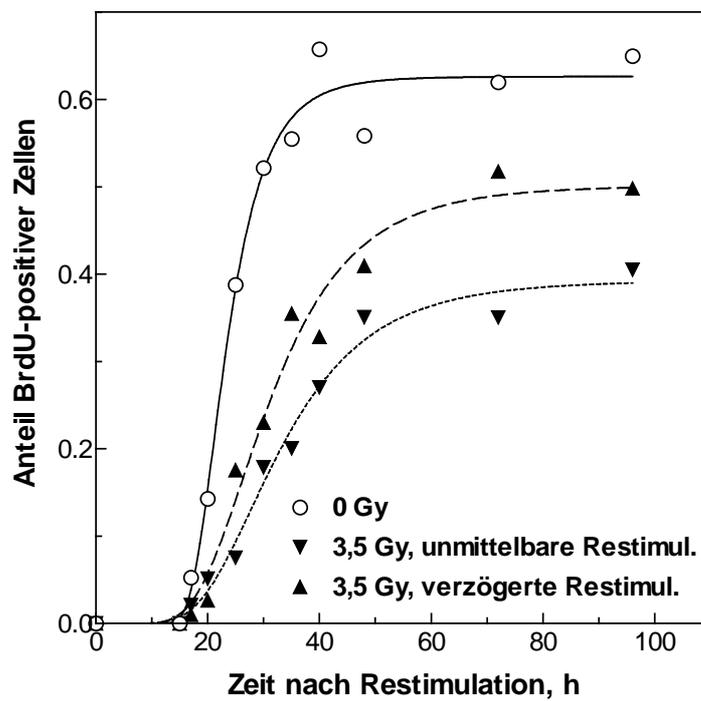


Abb. 3.2: Anteil BrdU-positiver Fibroblasten in Abhängigkeit von der Zeit nach Restimulation. Normalfibroblasten konfluenter Kulturen (der Linie NFHH) wurden durch verdünnte Aussaat zu erneuter Proliferation angeregt (restimuliert), dabei kontinuierlich mit BrdU inkubiert und zu verschiedenen Zeiten nach der Restimulation flusszytometrisch gemessen. Die Zellen blieben unbestrahlt (0 Gy) oder wurden mit 3,5 Gy bestrahlt und entweder unmittelbar danach oder um 16 h verzögert restimuliert. Die Kurven wurden mit der Gompertz-Funktion gefittet.

Zelllinie	DSB		Ko.	BrdU _{max}		G1-Arrest	
	init.	resid.		u. R.	v. R.	u. R.	v. R.
AF01	0,41	0,046	0,610	0,112	0,370	0,817	0,394
AF02	0,35	0,076	0,683	0,377	0,479	0,448	0,299
AF03	0,39	0,047	0,483	0,043	0,229	0,911	0,527
AF05	0,35	0,050	0,538	0,263	0,299	0,511	0,443
AF06	0,35	0,076	0,684	0,512	0,590	0,252	0,138
AF09	0,35	0,043	0,728	0,376	0,419	0,483	0,424
AF11	0,44	0,034	0,443	0,166	0,187	0,625	0,577
AF12	0,35	0,085	0,516	0,119	0,194	0,769	0,624
NFHH	0,37	0,065	0,613	0,379	0,489	0,382	0,202

Tab. 3.1: Parameter des permanenten G1-Arrests und der Erzeugung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen von normalen humanen Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung.

AF01-12: Brustkrebs-Patientinnen

NFHH: Normalspender

DSB: Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen, gemessen mit neutraler Gelelektrophorese. Die relativen Werte entsprechen dem Anteil der gewanderten DNA-Fragmente. (Daten aus Dikomey et al. 2000, Dikomey und Brammer 2000)

init.: Relative Anzahl von Doppelstrangbrüchen unmittelbar nach 20 Gy

resid.: Relative Anzahl von Doppelstrangbrüchen 24 h nach 100 Gy

BrdU_{max}: Maximaler Anteil BrdU-positiver Zellen

Ko.: Unbehandelte Zellen (Kontrolle)

u. R.: Unmittelbare Restimulation

v. R.: Verzögerte Restimulation 16 h nach Bestrahlung

G1-Arrest: Anteil permanent in G1 arretierter Zellen

3.4 Dosisabhängigkeit des permanenten G1-Arrests

Abbildung 3.3 zeigt den Anteil permanent in der G1-Phase arretierter Zellen zum einen in Abhängigkeit von der Strahlendosis und zum anderen vom Zeitpunkt der Bestrahlung. Normalfibroblasten konfluenten Kulturen (der Linie HSF13) wurden restimuliert und für 72 h kontinuierlich mit BrdU inkubiert, um den maximalen Anteil BrdU-positiver Zellen zu messen und damit den Anteil permanent G1-arretierter Zellen zu bestimmen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (entweder vor oder nach der Restimulation) wurden die Zellen Strahlendosen von 0 bis 6 Gy ausgesetzt. Unweigerlich verknüpft war damit, dass sich die Zellen dabei in unterschiedlichen Wachstumszuständen (einzeln oder konfluent, in Zellsuspension oder im Zellrasen) befanden. Die Bestrahlung erfolgte entweder 16 h vor der Restimulation (verzögerte Restimulation, - 16 h) oder direkt davor (unmittelbare Restimulation, - 0 h), wobei sich die Zellen jeweils im Zellrasen der konfluenten Flasche befanden. Erfolgte die Bestrahlung nach der Restimulation, so wurde entweder direkt danach bestrahlt (unmittelbare Bestrahlung, + 0 h), wobei sich die Zellen noch in Zellsuspension befanden, oder mit einer Verzögerung von 6 h (verzögerte Bestrahlung, + 6 h), nachdem sich die meisten Zellen wieder einzeln auf dem Flaschenboden abgesetzt hatten.

In der Abbildung zeigt sich für alle Versuchsbedingungen ein kontinuierlicher Anstieg des G1-Arrests mit der Strahlendosis, wobei die Werte einem Sättigungswert zuzustreben scheinen, der allerdings oberhalb des Messbereichs von 6 Gy liegt. Die Daten wurden entsprechend mit einer Funktion gefittet, bei der die Werte exponentiell auf einen Maximalwert zustreben:

$$f_{G1} = f_{G1, \max} \times [1 - \exp(-k \times D)] \quad (\text{Gl. 3.3}),$$

wobei f_{G1} den Anteil G1-arretierter Zellen, $f_{G1, \max}$ den Maximalwert desselben, D die Dosis und k einen Koeffizienten repräsentieren. Für den Koeffizienten wurde dabei ein konstanter Wert von $k = 0,56$ eingesetzt, der sich aus einem gemeinsamen Fit aller Daten ergab. Der Fit diente nicht der Bestimmung des Maximalwerts (Extrapolation), sondern der Berechnung von Zwischenwerten (Interpolation).

Aus der Abbildung wird deutlich, dass das Ausmaß des G1-Arrests für alle Dosen sehr unterschiedlich war, je nachdem, zu welchem Zeitpunkt die Zellen bestrahlt bzw. restimuliert wurden. Legt man für einen Vergleich eine Dosis von 3,5 Gy zu Grunde, dann ergeben sich aus den Fitkurven Werte für den Anteil G1-arretierter Zellen von 37 % (- 16 h), 56 % (- 0 h), 64 % (+ 0 h) und 43 % (+ 6 h). Im Vergleich der beiden Zellkulturen, die vor der Restimulation bestrahlt wurden (Abb. 3.3 A), zeigte sich ein um 34 % relativ geringeres Ausmaß des G1-Arrests bei der verzögerten Restimulation (A, - 16 h) als bei der unmittelbaren Restimulation (A, - 0 h). Befinden sich Fibroblasten zwischen Bestrahlung und Restimulation also noch einen gewissen Zeitraum in Konfluenz, so resultiert daraus ein geringerer G1-Arrest. Bestrahlt man Fibroblastenkulturen direkt vor bzw. nach der Restimulation, so besteht ein Unterschied im G1-Arrest in der Form, als bei Bestrahlung unmittelbar nach der Restimulation (B, + 0 h) 14 % relativ mehr Zellen in der G1-Phase arretiert werden als bei der Bestrahlung vor der Restimulation (A, - 0 h). Fibroblasten sind demnach hinsichtlich des G1-Arrests direkt nach der Restimulation strahlenempfindlicher als vor der Restimulation. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass sich die Zellen nach der Restimulation noch für etwa 4 h in Suspension befinden. Zögert man die Bestrahlung nach der Restimulation weiter hinaus, so nimmt die Empfindlichkeit wieder ab (Abb. 3.3 B), denn mit einer Verzögerung von 6 h bestrahlte Fibroblastenkulturen (B, + 6 h) zeigten einen um 33 % relativ geringeren G1-Arrest als Zellkulturen, die ohne Verzögerung bestrahlt wurden (B, + 0 h). Festzuhalten bleibt, dass der Anteil G1-arretierter Zellen bei Bestrahlung 6 h nach Restimulation damit nicht weiter angestiegen war, auch wenn der Bestrahlungszeitpunkt zeitlich näher am Übergang von der G1- in die S-Phase lag, für den ein Wert von 23 h nach Restimulation für unbestrahlte Kontrollkulturen ermittelt worden war (Abb. 3.2, 0 Gy).

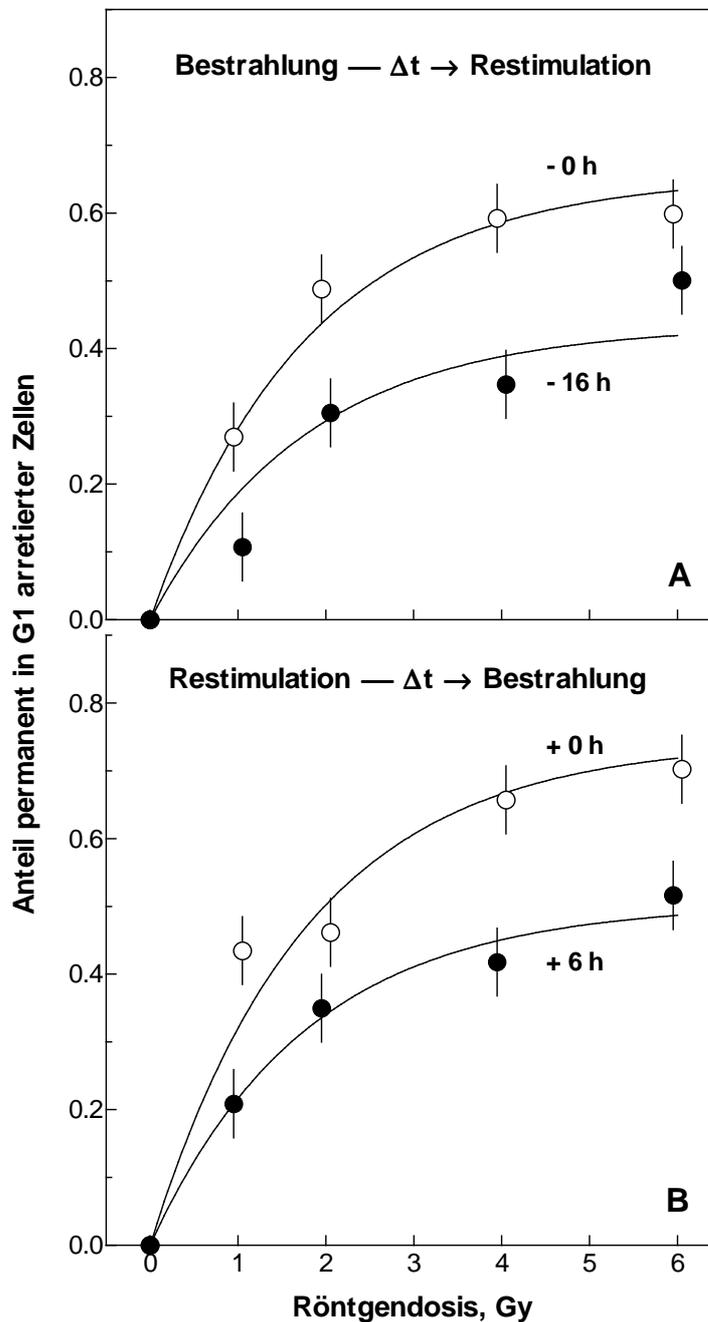


Abb. 3.3: Strahleninduzierter permanenter G1-Arrest von humanen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Strahlendosis und dem Zeitpunkt der Bestrahlung. Normalfibroblasten konfluenter Kulturen (der Linie HSF13) wurden durch verdünnte Aussaat zu erneuter Proliferation angeregt (restimuliert), dabei kontinuierlich mit BrdU inkubiert und 72 h nach der Restimulation flusszytometrisch gemessen. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten in Bezug auf die Restimulation bestrahlt: 16 h vor (- 16 h), direkt vor (- 0 h), direkt nach (+ 0 h) oder 6 h nach (+ 6 h) der Restimulation. Die Daten wurden gemeinsam mit einer exponentiellen Sättigungsfunktion gefittet, die als einzige Variable den Maximalwert enthält.

3.5 Zeitabhängigkeit des permanenten G1-Arrests

Abbildung 3.4 stellt die Zeitabhängigkeit des permanenten G1-Arrests detaillierter dar. Erneut wurden Normalfibroblasten konfluenter Kulturen (der Linie NFHH) restimuliert und für 72 h kontinuierlich mit BrdU inkubiert, um den maximalen Anteil G1-arretierter Zellen zu messen. Die Zellen wurden diesmal zu verschiedenen Zeiten nach der Restimulation von 0 bis 24 h in 2-h-Abständen jeweils mit der gleichen Dosis von 3,5 Gy bestrahlt. Da unbestrahlte Zellen von der Restimulation bis zum Eintritt in die S-Phase 23 h benötigten (Abb. 3.2, 0 Gy), sollte mit diesem Zeitfenster die gesamte G1-Phase abgedeckt werden.

Die Bestrahlung unmittelbar nach Restimulation führte zu einem Anteil G1-arretierter Zellen von 66 %, der bei späterer Bestrahlung innerhalb der nächsten 4 h zunehmend geringer ausfiel, um dann bis zu 12 h nach der Restimulation konstant 56 % zu betragen. Zögerte man die Bestrahlung weiter hinaus, so nahm der G1-Arrest weiter ab. Bei Bestrahlung 24 h nach der Restimulation hatte sich der Anteil G1-arretierter Zellen mit einem Wert von 30 % nahezu halbiert. Am Anfang der Kurve (bis 4 h nach Restimulation) fiel eine initiale Abnahme des G1-Arrests auf. Es ist zu vermerken, dass Zellen im Allgemeinen ein gleiches Zeitintervall benötigen, um sich nach Trypsinierung und Aussaat vollständig am Flaschenboden festzuheften. Bei Bestrahlung direkt nach der Restimulation betrug der Anteil G1-arretierter Zellen hier für die Linie NFHH 66 % und 4 h später 56 %. Ein vergleichbarer Abfall der Werte wurde bereits für die Linie HSF13 von 0 h nach 6 h mit 64 % nach 43 % gefunden (Abb. 3.3 B; Werte aus den Fitkurven errechnet).

Insgesamt ist festzustellen, dass es bei zunehmendem Hinauszögern der Bestrahlung nach der Restimulation zu keinem Zeitpunkt zu erhöhten Anteilen arretierter Zellen kam, sondern vielmehr zu einer zweistufigen Abnahme. Neben der initialen Abnahme kam es insbesondere zu einem starken Abfall der Induzierbarkeit des G1-Arrests, wenn zunehmend später als 12 h nach der Restimulation bestrahlt wurde. Letzteres deutet darauf hin, dass die Zellen ab einem bestimmten Zeitpunkt nach der Restimulation nicht mehr arretiert werden können. Dies entspricht der Funktion eines Zellzyklus-Kontrollpunkts als "Point of no return".

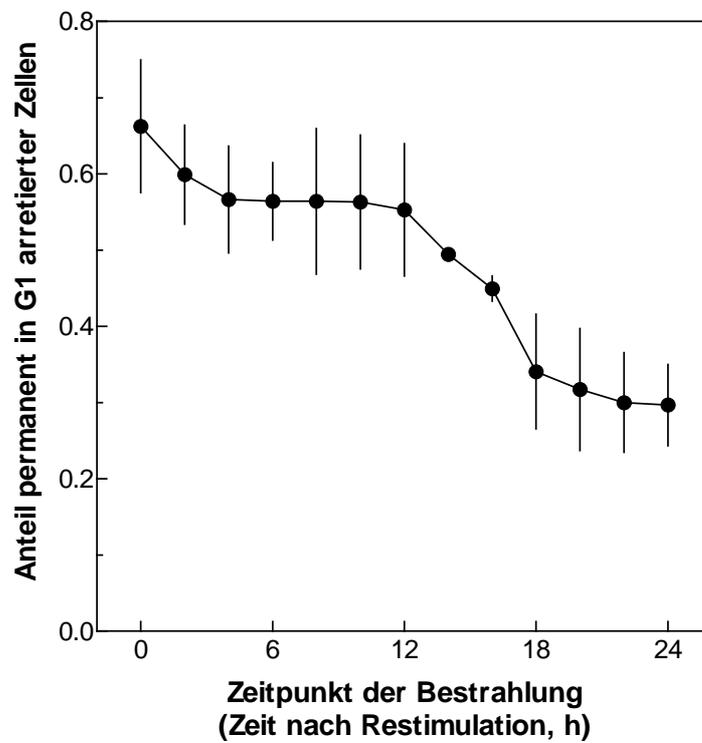


Abb. 3.4: Strahleninduzierter permanenter G1-Arrest in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung nach der Restimulation. Kontaktinhibierte Zellen (NFHH) wurden restimuliert, mit BrdU inkubiert, zu verschiedenen Zeiten nach Restimulation Röntgenstrahlen der Dosis 3,5 Gy ausgesetzt, nach 72 h fixiert, gefärbt und flusszytometrisch gemessen.

3.6 G1-Kontrollpunkt

In Abbildung 3.5 ist neben der Zeitabhängigkeit der Induzierbarkeit des G1-Arrests (geschlossene Kreise; Daten aus Abb. 3.4) zum Vergleich die Kinetik gezeigt, mit der unbestrahlte Fibroblasten nach Restimulation aus der G0-Phase heraus durch die G1- in die S-Phase einlaufen; dargestellt ist der Anteil von Zellen in der S-Phase, der aus dem Anteil BrdU-positiver Zellen durch Normierung auf den Maximalwert berechnet wurde (offene Kreise; Daten aus Abb. 3.2, 0 Gy). Während die G1-Arrest-Werte darstellen, wie viele Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt nach Restimulation durch Röntgenbestrahlung tatsächlich arretiert wurden, zeigt der S-Phase-Anteil, wie viele Zellen sich jeweils zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits in der S-Phase befanden und damit nicht mehr in der davor liegenden G1-Phase arretiert werden konnten.

Der zeitliche Verlauf der G1-Arrest-Werte wurde mit zwei theoretischen Kurvenverläufen verglichen, die auf zwei unterschiedlichen Annahmen basierten: Zuerst wurde angenommen, dass ein Zellzyklus-Kontrollpunkt direkt am G1/S-Übergang existiert und infolgedessen die Zellen zum Zeitpunkt des Eintritts in die S-Phase nicht mehr permanent G1-arretiert werden können. In diesem Fall hätte der Anteil in G1 arretierter Zellen, $f_{G1,max}$ (als Funktion der Zeit t nach Restimulation), bis zum Beginn der S-Phase konstant 56 % betragen und ab dem Eintritt der ersten Zellen in die S-Phase 16 h nach der Restimulation um den jeweiligen Anteil der Zellen in der S-Phase, f_s , abnehmen müssen; dies entspräche der folgenden Formel:

$$f_{G1,max}(t) = 56\% \times [1 - f_s(t)] \quad (\text{Gl. 3.4}).$$

Diese theoretische Funktion ist in Abbildung 3.5 durch Kurve B (gestrichelt) dargestellt. Da die ersten Zellen erst 16 h nach Restimulation in die S-Phase eintreten (Kurve A), weist die Kurve auch erst ab diesem Zeitpunkt abfallende G1-Arrest-Werte auf. An Hand der gemessenen Daten (geschlossene Kreise) wird jedoch deutlich, dass es bereits einige Stunden vorher (ab etwa 12 h nach Restimulation) zu einem Abfall des permanenten G1-Arrests kommt. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen bereits zu einem Zeitpunkt, der vor dem Beginn der S-Phase liegt, nicht mehr arretiert werden können.

Geht man daher von der zweiten Annahme aus, dass ein G1-Kontrollpunkt an einem bestimmten Zeitpunkt vor der S-Phase existiert, so müsste der Abfall der G1-Arrest-Werte analog in Form einer Kurve parallel zur eben beschriebenen verlaufen. Die zeitliche Differenz zwischen beiden Kurven entspräche dann der Zeitspanne Δt zwischen dem G1-Kontrollpunkt und dem Eintritt in die S-Phase. Gleichung 3.4 erhalte dann die Form:

$$f_{G1,max}(t) = 56\% \times [1 - f_s(t + \Delta t)] \quad (\text{Gl. 3.5}).$$

Die Anpassung der Funktion an die Daten ergab für das Zeitintervall Δt einen Wert von 4 h. Abbildung 3.5 zeigt, dass die angepasste Kurve C nunmehr den Abfall der gemessenen G1-Arrest-Werte widerspiegelt. Dadurch kann die Existenz eines G1-Kontrollpunkts vor der S-Phase bestätigt werden. Dieser "Point of no return" befindet sich 4 h vor Eintritt in die S-Phase, so dass Röntgenbestrahlung in den letzten 4 h der G1-Phase nicht mehr zu einer dauerhaften Arretierung der Zellen führt.

Die G1-Arrest-Werte, die später als 18 h nach Restimulation gemessen wurden, liegen zunehmend weiter oberhalb der theoretischen Kurve (Abb. 3.5, Kurve C). In diesem Zeitabschnitt haben die "schnelleren" ersten 50 % der restimulierten Zellen den G1-Kontrollpunkt (gemäß Definition bei 19 h nach der Restimulation) bereits passiert. Die später als 18 h nach Restimulation ermittelten G1-Arrest-Werte beziehen sich demnach auf die nachkommenden, zunehmend langsamer proliferierenden Zellen. Die erhöhten Werte deuten darauf hin, dass diese Zellen durch eine Bestrahlung leichter arretiert werden können und der in Gleichung 3.5 als konstant angenommene Wert von 56 % für den maximalen Anteil G1-arretierter Zellen dann nicht mehr zutrifft. Die Anzahl der Messwerte reicht aber nicht aus, um dies in der Gleichung noch zu berücksichtigen.

Zusammengefasst bleibt festzuhalten, dass unbestrahlte Fibroblasten 23 h nach der Restimulation in die S-Phase eintreten, nachdem sie 4 h vorher und somit 19 h nach der Restimulation den G1-Kontrollpunkt passiert haben. In der Abbildung passieren die ersten Fibroblasten 12 h nach der Restimulation den G1-Kontrollpunkt. Hierbei handelt es sich um schneller proliferierende Zellen, die auch als erste Zellen 16 h nach der Restimulation in die S-Phase eintreten, so dass auch in diesem Fall der G1-Kontrollpunkt 4 h vor der S-Phase liegt.

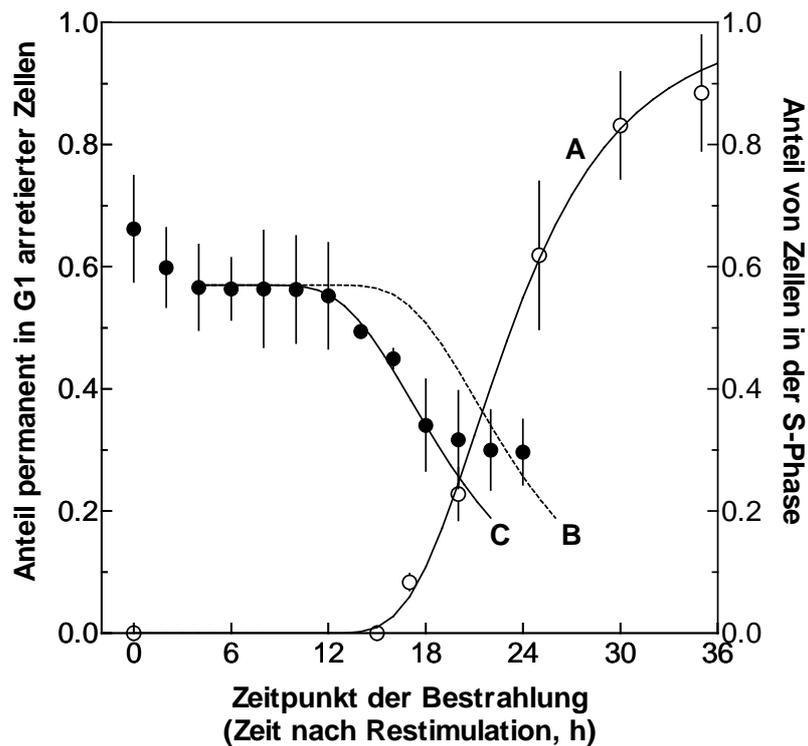


Abb. 3.5: Zeitliche Beziehung zwischen dem G1-Kontrollpunkt und dem Eintritt in die S-Phase normaler humaner Fibroblasten (NFHH). Dargestellt sind der Anteil permanent G1-arretierter Zellen nach Bestrahlung mit 3,5 Gy in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung nach Restimulation (geschlossene Kreise; Daten aus Abb. 3.4) sowie der Anteil von Zellen, der sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits in der S-Phase befand (offene Kreise und Kurve A: Anteil BrdU-markierter Zellen unbestrahlter Kulturen normiert auf den Maximalwert; Daten aus Abb. 3.2, 0 Gy). Kurve B: Verlauf der G1-Arrest-Werte unter der Annahme, dass ein Zellzyklus-Kontrollpunkt direkt am G1/S-Übergang existiert und infolgedessen die Zellen ab dem Zeitpunkt des Eintritts in die S-Phase nicht mehr permanent G1-arretiert werden können (Gl. 3.4). Kurve C: Verlauf der G1-Arrest-Werte unter der Annahme, dass ein G1-Kontrollpunkt 4 h vor der S-Phase lokalisiert ist und eine Bestrahlung in den letzten 4 h der G1-Phase dementsprechend nicht zu einer permanenten G1-Arretierung der bestrahlten Zellen führt (Gl. 3.5).

3.7 Permanenter G1-Arrest bei verschiedenen Fibroblastenlinien

Abbildung 3.6 zeigt den strahleninduzierten permanenten G1-Arrest unterschiedlicher humaner Fibroblastenlinien. Die Versuche wurden mit den Hautfibroblastenlinien von acht Brustkrebspatientinnen (AF) sowie einem gesunden Spender (NFHH) durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte in Konfluenz mit einer Dosis von jeweils 3,5 Gy. Die Fibroblasten wurden sowohl unmittelbar nach der Bestrahlung als auch um 16 h verzögert restimuliert und zur Bestimmung des Anteils permanent G1-arretierter Zellen für 72 h mit BrdU inkubiert.

Im Vergleich der einzelnen Zelllinien waren deutliche Unterschiede im Anteil G1-arretierter Zellen zu erkennen. Die Werte reichten bei unmittelbarer Restimulation von 25 % (AF06) bis 91 % (AF03) arretierter Zellen; sie variierten mit einem Variationskoeffizienten von 38 % um einen Mittelwert von 58 %. Bei verzögerter Restimulation lagen die Werte zwischen 14 % (AF06) und 62 % (AF12) arretierter Zellen und variierten mit einem vergleichbaren Koeffizienten von 41 % um einen Mittelwert von 40 % (Tab. 3.1).

Innerhalb jeder Zelllinie war damit der Anteil der in der G1-Phase arretierten Zellen bei verzögerter Restimulation geringer ausgeprägt als bei unmittelbarer Restimulation. Aus diesem Grund lagen auch die Mittelwerte mit 58 % und 40 % deutlich auseinander. Dies lässt den Schluss zu, dass ein Halten der Fibroblasten in Konfluenz, d. h. in der G0-Phase, zu einer Erholung der Zellen hinsichtlich der Ausbildung eines permanenten G1-Arrests führt.

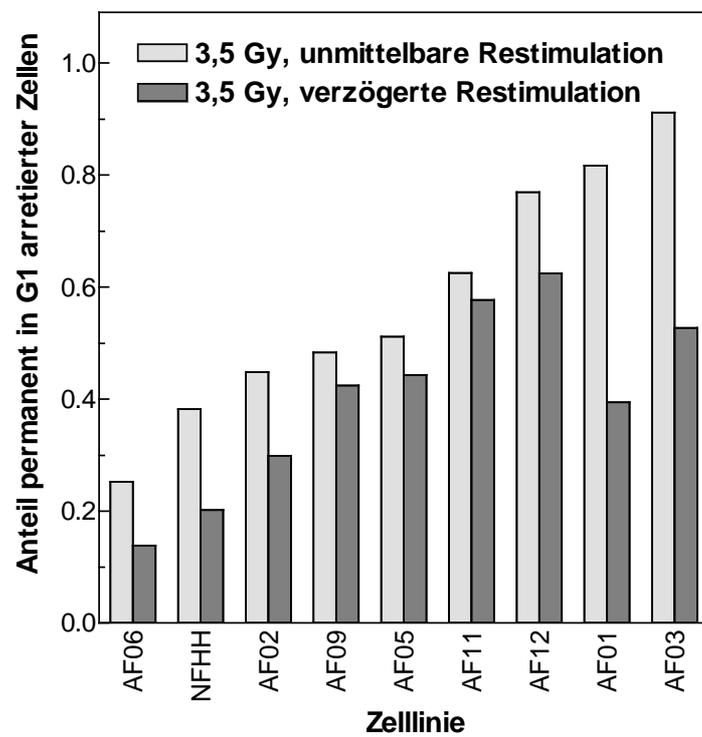


Abb. 3.6: Strahleninduzierter permanenter G1-Arrest von Hautfibroblasten von Brustkrebspatientinnen (AF01 bis AF12) und einem Normalspender (NFHH). Die Zellen wurden in Konfluenz mit 3,5 Gy bestrahlt, unmittelbar danach oder um 16 h verzögert restimuliert, mit BrdU inkubiert, nach 72 h fixiert, gefärbt und flusszytometrisch gemessen. Die Zelllinien wurden entsprechend dem Anteil permanent in G1 arretierter Zellen nach unmittelbarer Restimulation aufgereiht.

3.8 Zusammenhang zwischen dem permanenten G1-Arrest und der Anzahl initialer DNA-Doppelstrangbrüche bei verschiedenen Fibroblastenlinien

Die neun untersuchten Fibroblastenlinien, die hier ausgeprägte Unterschiede im Ausmaß des permanenten G1-Arrests zeigten, waren bereits von Dikomey et al. (2000) und Dikomey und Brammer (2000) auf ihre Fähigkeit hin untersucht worden, durch Bestrahlung erzeugte DNA-Schäden zu reparieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch Bestrahlung in allen Zelllinien eine vergleichbare Anzahl initialer Doppelstrangbrüche erzeugt wurde, welche anschließend jedoch in unterschiedlichem Ausmaß repariert wurden, so dass die 24 h nach Bestrahlung gemessene Anzahl residueller Doppelstrangbrüche deutliche Unterschiede aufwies (Tab. 3.1). Unter Verwendung dieser Daten wurde nun untersucht, ob zwischen der Anzahl der Doppelstrangbrüche und dem hier ermittelten permanenten G1-Arrest ein Zusammenhang besteht, der die zelllinienabhängigen Unterschiede im G1-Arrest erklären könnte.

Abbildung 3.7 zeigt die Gegenüberstellung der Daten des permanenten G1-Arrests und der initialen DNA-Doppelstrangbrüche. Die Werte für den Anteil in der G1-Phase arretierter Zellen (für beide Restimulationsbedingungen) entsprechen dabei den Werten aus Abbildung 3.6 bzw. Tabelle 3.1. Für die initialen Doppelstrangbrüche ist die Anzahl direkt nach Bestrahlung mit 20 Gy aufgetragen; als relatives Maß für die Anzahl von Brüchen ist der Anteil gewanderter DNA-Fragmente angegeben, wie er üblicherweise mit Hilfe der neutralen Gelelektrophorese gemessen wird. Für die Detektion von Doppelstrangbrüchen sind höhere Strahlendosen (hier: 20 Gy) erforderlich (Dikomey et al. 2000) als für die Bestimmung des G1-Arrests (hier: 3,5 Gy). Die Vergleichbarkeit der gemessenen Parameter nach Bestrahlung mit den unterschiedlichen Dosen wird für die folgenden Betrachtungen vorausgesetzt.

In der Abbildung ist der Anteil permanent in G1 arretierter Zellen sowohl nach unmittelbarer Restimulation (Abb. 3.7 A) als auch nach verzögerter Restimulation (B) gegen die Anzahl initialer Doppelstrangbrüche aufgetragen. In beiden Fällen wird deutlich, dass der Anteil G1-arretierter Zellen stark variiert, während die Anzahl initialer Doppelstrangbrüche nur geringe Unterschiede aufweist und innerhalb der geringen Variation auch keinerlei Zusammenhang mit den G1-Arrest-Werten erkennen lässt.

Die fehlende Korrelation verdeutlicht, dass die Anzahl initialer Doppelstrangbrüche für die zelllinienabhängigen Unterschiede im permanenten G1-Arrest nicht ausschlaggebend ist.

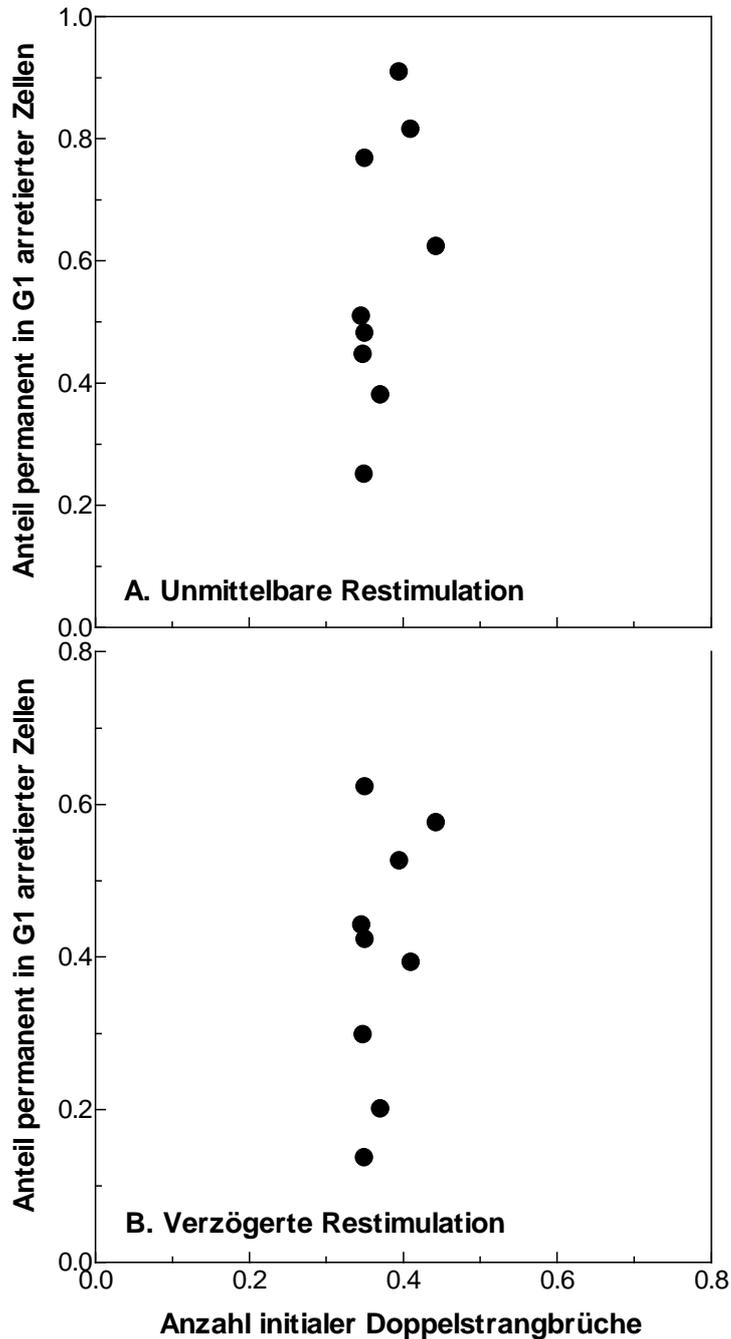


Abb. 3.7: Zusammenhang zwischen permanentem G1-Arrest und initialen DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung von Hautfibroblasten von Brustkrebspatientinnen und einem Normalspender (Zelllinien: s. Abb. 3.6). Der Anteil permanent in G1 arretierter Zellen wurde nach Bestrahlung der Zellen in Konfluenz mit 3,5 Gy und unmittelbarer (A) oder um 16 h verzögerter (B) Restimulation flusszytometrisch gemessen (Daten aus Abb. 3.6 bzw. Tab. 3.1). Die Anzahl initialer Doppelstrangbrüche wurde unmittelbar nach Bestrahlung mit 20 Gy durch neutrale Gelelektrophorese bestimmt (Daten von Dikomey et al. 2000 sowie Dikomey und Brammer 2000 bzw. aus Tab. 3.1); als Maß für die Anzahl von Doppelstrangbrüchen ist der Anteil gewanderter DNA-Fragmente angegeben.

3.9 Zusammenhang zwischen dem permanenten G1-Arrest und der Anzahl residueller DNA-Doppelstrangbrüche bei verschiedenen Fibroblastenlinien

Abbildung 3.8 zeigt die Gegenüberstellung der Daten des permanenten G1-Arrests und der residuellen Doppelstrangbrüche. Die Werte für den Anteil G1-arretierter Zellen wurden erneut Abbildung 3.6 bzw. Tabelle 3.1 entnommen. Für die residuellen Doppelstrangbrüche ist die 24 h nach Bestrahlung mit 100 Gy gemessene Anzahl aufgetragen. Um Unterschiede in der Anzahl residueller Doppelstrangbrüche deutlich zu machen, sind allgemein Strahlendosen von bis zu 150 Gy erforderlich (Dikomey et al. 2000).

In der Abbildung ist erneut der Anteil G1-arretierter Zellen sowohl nach unmittelbarer Restimulation (Abb. 3.8 A) als auch nach verzögerter Restimulation (B) aufgetragen. In Abbildung 3.8 A wird deutlich, dass sowohl der G1-Arrest nach unmittelbarer Restimulation (mit Werten zwischen 25 und 91 % arretierten Zellen) als auch die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche (mit Werten zwischen 0,034 und 0,085) eine deutliche Streuung aufweisen, dass jedoch keine Korrelation zwischen den beiden Parametern zu erkennen ist. Anders verhält es sich nach verzögerter Restimulation. In Abbildung 3.8 B ist erkennbar, dass der G1-Arrest (mit Werten zwischen 14 und 62 % arretierten Zellen) zu der Anzahl residueller Doppelstrangbrüche in Beziehung steht; für acht der neun Zelllinien ergab sich aus der linearen Regression eine signifikante Korrelation ($p < 0,005$). Zelllinie AF12 fällt durch eine extrem hohe Anzahl von Doppelstrangbrüchen auf und wurde bereits von Dikomey et al. (2000) als Ausnahme unter normalen Fibroblasten charakterisiert; die außergewöhnlich vielen residuellen Brüche (gemessen nach 24 h Reparatur) sind dabei nicht allein als nicht-reparierte Brüche zu werten, sondern sie beinhalten zusätzlich sekundäre Brüche, wie sie bei der DNA-Fragmentierung im Verlauf apoptotischer Prozesse gebildet werden.

Für die acht Fibroblastenlinien liegt keine direkte (positive), sondern vielmehr eine inverse (negative) Korrelation vor. Dementsprechend zeigte die Zelllinie, bei der die G1-Arretierung am stärksten ausgeprägt war (AF11: 58 % arretierte Zellen), gleichzeitig die geringste Anzahl residueller Doppelstrangbrüche (0,034), während die Zelllinie mit der geringsten G1-Arretierung (AF06: 14 % arretierte Zellen) die größte Anzahl residueller Doppelstrangbrüche (0,076) aufwies.

Das Fehlen einer positiven (direkten) Korrelation bedeutet, dass die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche nicht für das Ausmaß des G1-Arrests verantwortlich ist, auch wenn Doppelstrangbrüche grundsätzlich für die Auslösung des Arrests verantwortlich gemacht werden.

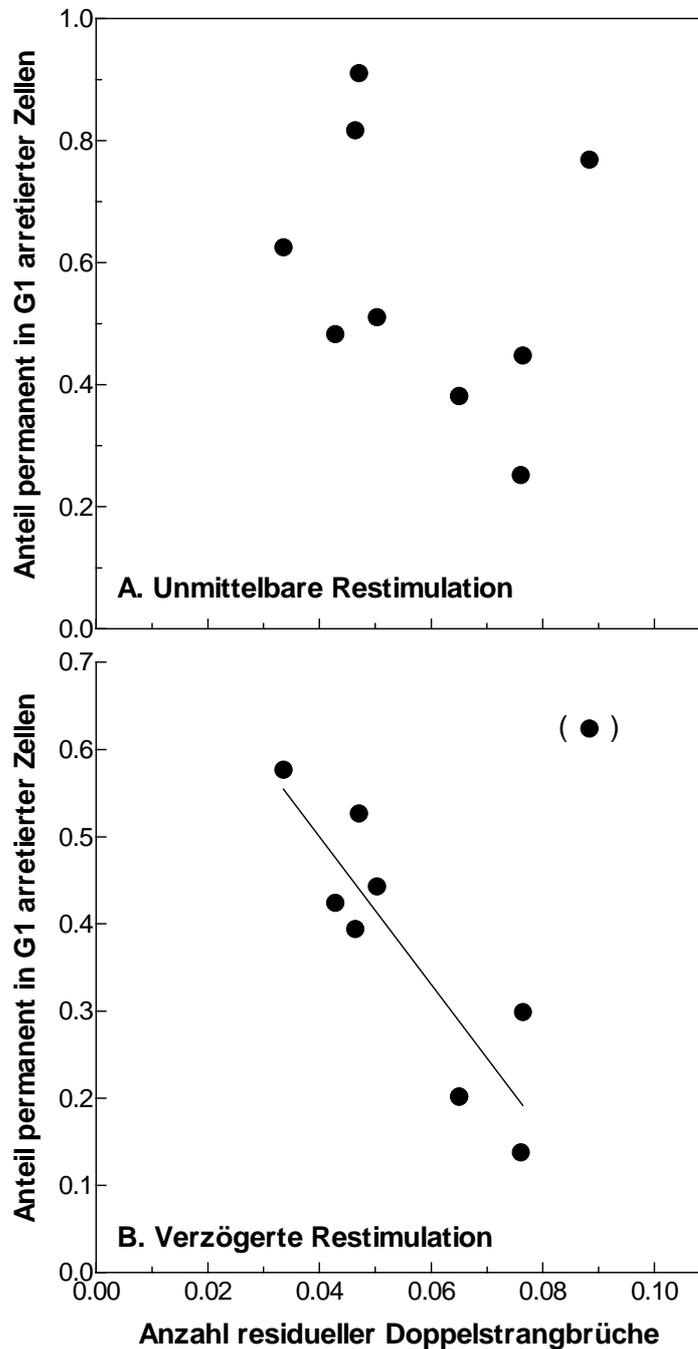


Abb. 3.8: Zusammenhang zwischen permanentem G1-Arrest und residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung von Hautfibroblasten von Brustkrebspatientinnen und einem Normalspender (Zelllinien: siehe Abb. 3.6). Der Anteil permanent in G1 arretierter Zellen wurde nach Bestrahlung der Zellen in Konfluenz mit 3,5 Gy und unmittelbarer (A) oder um 16 h verzögerter (B) Restimulation flusszytometrisch gemessen (Daten aus Abb. 3.6 bzw. Tab. 3.1). Die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche wurde 24 h nach Bestrahlung mit 100 Gy durch neutrale Gelelektrophorese bestimmt (Daten von Dikomey et al. 2000 sowie Dikomey und Brammer 2000 bzw. Tab. 3.1); als Maß für die Anzahl von Doppelstrangbrüchen ist der Anteil gewanderter DNA-Fragmente angegeben. Für acht Fibroblastenlinien wurde durch lineare Regression (Linie in B) eine inverse Korrelation zwischen den beiden Parametern nach verzögerter Restimulation bestätigt ($p < 0,005$).

3.10 Zeitliche Abfolge von Doppelstrangbruch-Reparatur und G1-Kontrollpunkt

Auf Grund der gefundenen inversen Korrelation stellte sich andererseits die Frage, ob das Ausmaß des G1-Arrests die Anzahl der residuellen Doppelstrangbrüche beeinflussen könnte.

In Abbildung 3.9 wurde deshalb der zeitliche Verlauf der Doppelstrangbruch-Reparatur der Kinetik gegenübergestellt, mit der verzögert restimulierte Zellen nach Durchlaufen der G1-Phase in die S-Phase eintreten bzw. 4 h zuvor den G1-Kontrollpunkt passieren. Die Daten für die Reparaturkinetik (Kurve A) entstammen Untersuchungen an der Fibroblastenlinie NFHH (Dikomey und Brammer 2000), bei denen konfluente Kulturen mit 40 Gy bestrahlt und die Anzahl der Doppelstrangbrüche zu verschiedenen Zeiten bis 24 h danach gemessen wurden. Die Zeitskala wurde so gewählt, dass die Verhältnisse bei verzögerter Restimulation dargestellt werden und der Zeitpunkt der Bestrahlung deshalb bei - 16 h liegt. Die Daten für den Eintritt der Zellen in die S-Phase wurden Abbildung 3.2 entnommen: Kurve C zeigt den Eintritt unbestrahlter Zellen in die S-Phase, während Kurve D den späteren S-Phase-Eintritt mit 3,5 Gy bestrahlter und verzögert restimulierter Zellen verdeutlicht. Kurve B stellt das Erreichen des G1-Kontrollpunkts dar, der 4 h vor dem Eintritt der Zellen in die S-Phase lokalisiert ist (Abb. 3.5 und Kap. 3.6) und einer zeitlichen Verschiebung der Kurve C um 4 h entspricht.

Die Darstellung zeigt, dass die Anzahl der Doppelstrangbrüche ab 12 h nach Bestrahlung (hier: 4 h vor der Restimulation) ein konstantes Endniveau erreicht. Die Anzahl der residuellen Brüche liegt damit bereits fest, und erst 12 h später erreichen die ersten restimulierten Zellen den G1-Kontrollpunkt (Kurve B). Auf Grund dieses großen zeitlichen Abstands ist es als unwahrscheinlich anzusehen, dass die Arretierung am G1-Kontrollpunkt die Reparatur der Doppelstrangbrüche beeinflusst.

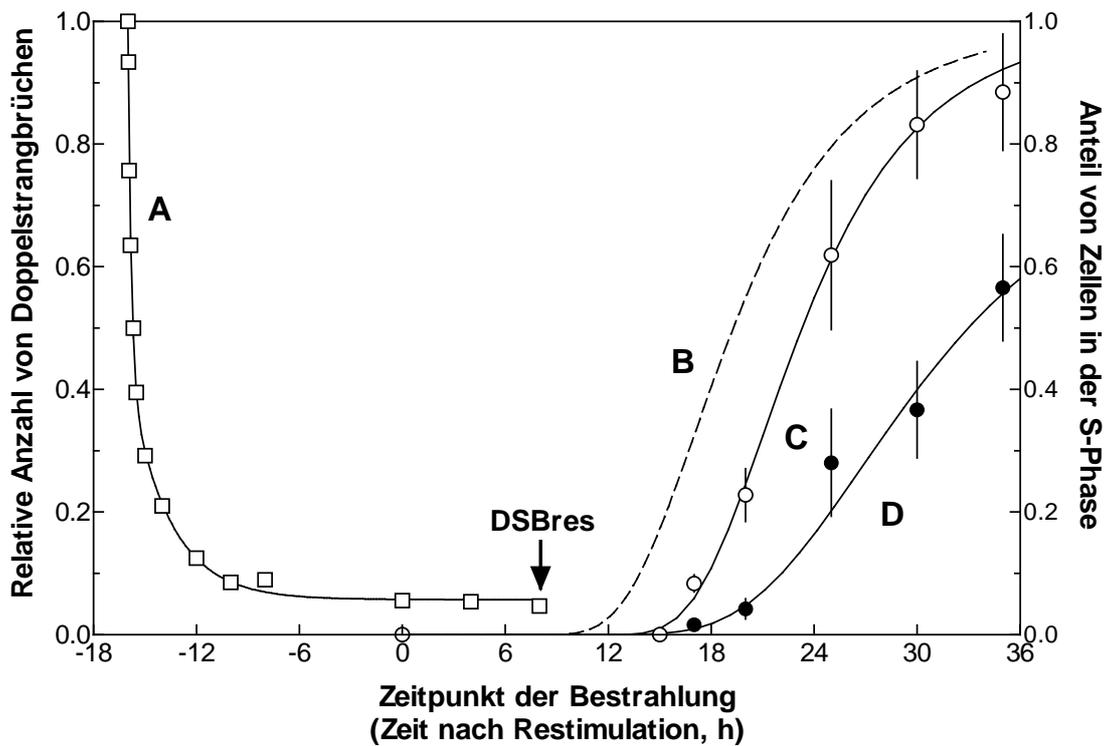


Abb. 3.9: Zeitliche Beziehung zwischen der Reparaturkinetik von DNA-Doppelstrangbrüchen, dem Erreichen des G1-Kontrollpunkts und dem Eintritt in die S-Phase von normalen humanen Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung mit (um 16 h) verzögerter Restimulation. Die Daten für die relative Anzahl von Doppelstrangbrüchen (Kurve A) stammen aus Dikomey und Brammer (2000), für den Anteil von Zellen in der S-Phase unbestrahlter (Kurve C) und bestrahlter (Kurve D) Zellen aus Abb. 3.2. Kurve B entspricht dem Passieren des G1-Kontrollpunkts, der 4 h vor dem Eintritt in die S-Phase (Kurve C) liegt. Der Pfeil deutet auf den Zeitpunkt von 24 h nach der Bestrahlung, an dem die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche (DSBres) gemessen wurde.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei humanen Fibroblasten, die Röntgenbestrahlung ausgesetzt werden, eine Wechselbeziehung zwischen dem permanenten G1-Arrest und DNA-Doppelstrangbrüchen besteht. Die Ergebnisse zeigen, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen dem Anteil permanent in der G1-Phase arretierter Zellen und der Anzahl von Doppelstrangbrüchen gibt. Die gängige These, dass die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche den Anteil permanent G1-arretierter Zellen determiniert, konnte damit nicht bestätigt werden. Vielmehr wurde erstmalig eine inverse Korrelation gefunden, derzufolge Fibroblastenlinien, die einen stark ausgeprägten permanenten G1-Arrest zeigten, gleichzeitig auch ein gutes Reparaturvermögen besaßen und damit eine geringe Anzahl residueller Doppelstrangbrüche aufwiesen, während schlechter reparierende Fibroblastenlinien mit weniger permanent in der G1-Phase arretierten Zellen reagierten. Zur Erklärung konnte die allgemeine Vorstellung, dass ein Zellzyklusarrest die Reparatur von DNA-Schäden begünstigt, allerdings nicht herangezogen werden. Es bleibt daher zu diskutieren, ob möglicherweise ein übergeordneter molekularer Mechanismus sowohl den G1-Arrest als auch die DNA-Reparatur beeinflusst und damit den gefundenen Zusammenhang erklären kann.

4.1 Messung des permanenten G1-Arrests (Definition, Möglichkeiten, Grenzen)

Der permanente G1-Arrest wurde über den Anteil der permanent in der G1-Phase arretierten Zellen einer Fibroblastenkultur quantifiziert. Dieser Anteil wurde durch kontinuierliche BrdU-Markierung und Flusszytometrie indirekt bestimmt, indem der Anteil von Zellen ermittelt wurde, welcher die G1-Phase durchlaufen hatte und sich in einer späteren Phase des Zellzyklus befand. Gemessen wurden also diejenigen Zellen, die aus einer konfluenten Kultur, d. h. aus der G0-Phase heraus, durch verdünnte Aussaat zu erneuter Proliferation angeregt wurden und anschließend nach Durchlaufen der G1-Phase während der S-Phase BrdU in ihre DNA eingebaut hatten; sie konnten demnach zuvor nicht permanent G1-arretiert worden sein. Dieselbe Methode wurde bereits in anderen Arbeiten benutzt (Di Leonardo et al. 1994, Linke et al. 1997, Gadbois et al. 1996). Alternativ wurde in früheren Arbeiten zur Markierung der Zellen in der S-Phase auch radioaktives ³H-Thymidin eingesetzt, welches mit

Hilfe von Autoradiographie nachgewiesen wurde (Little und Nagasawa 1985, Williams et al. 1997). Auch wenn bei der Autoradiographie im Gegensatz zur Flusszytometrie keine Korrektur der Zellzahlen auf Zellteilungen möglich ist, sind doch beide Verfahren als grundsätzlich gleichwertig anzusehen, so dass die gemessenen Werte miteinander verglichen werden können.

Die grundlegenden Daten bilden die kinetischen Messungen des Anteils der BrdU-markierten Zellen, die in der Lage gewesen waren, die S-Phase zu erreichen oder zu durchlaufen (Abb. 3.2). Vollständige Kurven beinhalten mehrere Parameter: (1) die Zeit, die unbehandelte Zellen benötigen, um nach Restimulation aus der G₀-Phase heraus durch die G₁- in die S-Phase zu gelangen (Kap. 4.1.1); (2) die zeitliche Verzögerung, mit der zuvor bestrahlte Zellen in die S-Phase eintreten, was als transienter G₁-Arrest bezeichnet wird (Kap. 4.1.2); (3) den Anteil unbehandelter Zellen, der selbst nach vier Tagen nicht in die S-Phase eintritt (Kap. 4.1.3) und (4) den Anteil von Zellen, der zusätzlich durch Röntgenbestrahlung am Eintritt in die S-Phase gehindert wird und somit als Anteil dauerhaft in der G₁-Phase angehaltener Zellen den permanenten G₁-Arrest repräsentiert (Kap. 4.1.4).

4.1.1 Dauer der Restimulations- und G₁-Phase

Die ersten Zellen einer unbestrahlten Fibroblastenkultur begannen 16 h nach der Restimulation, in die S-Phase einzutreten (Abb. 3.2). Um den Zeitpunkt des Eintritts für die gesamte Zellpopulation zu definieren, wurde der Zeitpunkt herangezogen, an dem die Hälfte der Zellen in die S-Phase eingetreten war (Williams et al. 1997). Unbestrahlte Fibroblasten der Linie NFHH traten demnach 23 h nach der Restimulation in die S-Phase ein (Abb. 3.2). Für die normalen Fibroblasten AG1522 und WS1neo wurden vergleichbare Zeiten von 22 und 26 h gemessen (Little und Nagasawa 1985, Linke et al. 1997). Diese Zeiten sind deutlich länger als die Werte von 12 bis 18 h, die für die G₁-Phase exponentiell wachsender Fibroblasten gemessen wurden (Tupper et al. 1980, Fine und Goldstein 1987); die Differenz wird als die Zeitspanne gedeutet, die die Zellen benötigen, um aus der G₀-Phase in die G₁-Phase zurückzukehren.

4.1.2 Transienter G1-Arrest

Bestrahlte Fibroblasten traten einige Stunden später als unbestrahlte in die S-Phase ein. Diese Verzögerung wird als transienter G1-Arrest bezeichnet. Der transiente G1-Arrest betrug nach unmittelbarer Restimulation bei der normalen Fibroblastenlinie NFHH 2,9 h/Gy (entsprechend 10 h nach 3,5 Gy; Abb. 3.2). Da die Messung des verzögerten Anstiegs des S-Phase-Anteils sehr aufwendig ist, gibt es nur wenige publizierte Daten. Die verfügbaren Daten deuten darauf hin, dass es große Unterschiede zwischen verschiedenen Fibroblastenlinien gibt. Während für die normale Linie AG1522 ein vergleichbarer Wert von 2,8 bis 3,0 h/Gy ermittelt wurde (Little und Nagasawa 1985), zeigten sich für sieben weitere Zelllinien niedrigere Werte zwischen 0,5 und 3,0 h/Gy (Williams et al. 1997), während die Daten für die Linie WS1neo auf einen sehr viel höheren Wert von größer 4 h/Gy hindeuteten (Linke et al. 1997).

Höhere Werte wurden auch für einige Fibroblastenlinien gemessen, die einen bekannten genetischen Defekt besitzen, der nachweislich auch die Strahlenempfindlichkeit der Zellen beeinflusst. Für zwei Zelllinien, die ein heterozygot mutiertes Retinoblastom- (Rb-) Gen besitzen, wurden Werte zwischen 4,0 und 7,8 h/Gy gemessen, während eine heterozygote Ataxia-Teleangiektasia- (AT-) Zelllinie Werte zwischen 3,8 und 6,0 h/Gy aufwies (Little und Nagasawa 1985). Andererseits war bei zwei homozygoten AT-Zelllinien überhaupt kein G1-Arrest zu beobachten (Little und Nagasawa 1985, Kröger 2002). Auch wenn die Befunde auf eine Verknüpfung von Signaltransduktion und Zellzykluskontrolle hindeuten, reicht die Menge der Daten derzeit nicht aus, um einen Rückschluss auf die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen zuzulassen.

Hinweise auf die Beteiligung des Proteins p53 am G1-Arrest lieferten die Daten für Fibroblasten von Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom (LFS), die zum Teil heterozygot mutiertes p53 aufwiesen und teils verringerte Werte zwischen 0,3 bis 3,0 h/Gy zeigten, während Patienten ohne mutiertes p53 normale Werte zwischen 2,8 und 3,3 h/Gy aufwiesen (Williams et al. 1997). Wurde p53 in Fibroblasten durch Transfektion mit dem E6-Virus komplett inaktiviert, dann verschwand wie bei den homozygoten AT-Zellen der G1-Arrest vollständig (Linke et al. 1997). Diese Befunde stimmen mit der derzeitigen Vorstellung überein, dass ein strahleninduzierter G1-Arrest primär über die Aktivierung von p53 und p21

ausgelöst wird (Di Leonardo et al. 1994) und dementsprechend eine Inaktivierung von p53 zu einer Reduktion des G1-Arrests führt.

Da dieses Modell sowohl für den transienten als auch permanenten G1-Arrest angewendet wird, würde eine reduzierte p53-Aktivität in logischer Konsequenz sowohl zu einer Abschwächung des transienten als auch des permanenten G1-Arrests führen. In den beiden einzigen derzeit publizierten Studien konnte bei gleichzeitiger Messung des transienten und des permanenten G1-Arrests innerhalb eines Kollektivs von zehn LFS-Fibroblastenlinien mit mutiertem p53 tatsächlich eine direkte Korrelation gefunden werden, während die Ergebnisse für zwölf normale Fibroblastenlinien mit intaktem p53 dahingehend interpretiert wurden, dass keine Korrelation existiert (Boyle et al. 1999, Williams et al. 1997). Bei der Bewertung der Daten muss bedacht werden, dass der transiente G1-Arrest von Boyle et al. (1999) nicht wie in dieser Arbeit als zeitliche Verzögerung des Eintritts restimulierter Zellen in die S-Phase gemessen wurde, sondern an Hand asynchroner Kulturen als verminderter Anteil derjenigen Zellen, die nach Bestrahlung innerhalb von 4 h noch in die S-Phase eintreten konnten. Während die LFS-Fibroblasten nach der gewählten Dosis von 4 Gy zu variablen Anteilen von 26 bis 94 % transient und von 25 bis 64 % permanent arretiert wurden, führte die gleiche Dosis bei den normalen Fibroblasten bereits zu Sättigungswerten, d. h. sie bewirkte eine nahezu vollständige transiente Blockade des G1/S-Übergangs mit Werten von 81 bis 97 % (bei ebenfalls hohem Anteil permanent G1-arretierter Zellen von 62 bis 91 %) und erlaubte damit keine graduelle Quantifizierung des transienten G1-Arrests.

4.1.3 Nicht-proliferierende Zellen

Werden Zellen einer unbehandelten konfluenten Fibroblastenkultur durch verdünnte Aussaat zu erneuter Proliferation angeregt, dann sind nicht alle Zellen in der Lage, wieder zu proliferieren und die S-Phase zu erreichen; so wurden bei der Linie NFHH nur maximal 61 % der Zellen BrdU-markiert (Abb. 3.2). Die übrigen 39 % der Zellen erreichten selbst nach vier Tagen nicht die S-Phase; der Anteil lag je nach untersuchter Zelllinie zwischen 27 und 56 % (Tab. 3.1). Ähnlich variierende Werte lassen sich aus bereits publizierten Kinetiken ablesen (Augenlicht und Baserga 1974, Little und Nagasawa 1985, Williams et al. 1997), die jedoch mit Hilfe von Autoradiographie ermittelt wurden und bei denen die gemessenen Werte

systematisch höher liegen, da der Anteil der markierten Zellen nicht auf Teilungen korrigiert werden kann.

Es gibt mehrere mögliche Gründe, warum Fibroblasten trotz optimaler Wachstumsbedingungen nicht proliferieren: (1) Fibroblastenkulturen bestehen grundsätzlich zu unterschiedlichen Anteilen aus verschiedenen Differenzierungsstufen von mitotischen (potentiell teilungsfähigen) Fibroblasten und postmitotischen (nicht mehr teilungsfähigen) Fibrozyten; so wurden bei verschiedenen Fibroblastenlinien Anteile von postmitotischen Fibrozyten von 25 bis 75 % (Herskind et al. 1998) bzw. von 9 bis 51 % (Brammer et al. 2004) gemessen. (2) Wenn sich zwei oder mehr Zellen bei der Aussaat nebeneinander auf dem Flaschenboden absetzen, kann dies bereits zur Kontaktinhibition führen. (3) Die Prozedur der Restimulation enthält sowohl biochemisch (z. B. Trypsin-Behandlung) als auch mechanisch (z. B. Verwirbelung zur Zellvereinzelnung) aggressive Schritte, die möglicherweise einen derartigen Zellstress darstellen oder sogar zur Zellschädigung führen, so dass als Folge ein G1-Arrest ausgelöst wird. Für die Berechnung des Anteils der durch Bestrahlung permanent in der G1-Phase arretierten Zellen wurde angenommen, dass die beschriebenen Einflüsse gleichermaßen auf behandelte wie unbehandelte Zellkulturen zutreffen und die jeweiligen Zellanteile gleich sind. Durch Normierung der Messungen auf die unbestrahlten Kontrollen wurden diese Zellen nicht weiter berücksichtigt.

4.1.4 Primärer permanenter G1-Arrest

Unabhängig von der zeitlichen Verschiebung des Anstiegs (Kap. 4.1.2) war bei den Kurven des S-Phase-Anteils nach Bestrahlung eine Erniedrigung des Maximalwerts zu beobachten (Abb. 3.2); dieser Wert konnte bei allen Kurven 72 bis 96 h nach der Restimulation als erreicht angesehen werden. Fibroblasten, die bis zu diesem Zeitpunkt kein BrdU in ihre DNA einbauen konnten, wurden als permanent in der G1-Phase arretiert angesehen. Aus dem nach Bestrahlung verminderten Anteil BrdU-markierter Zellen (im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen) wurde dementsprechend der Anteil permanent G1-arretierter Zellen ermittelt, wie bereits von Williams et al. (1997) vorgeschlagen. Abgesehen von den kinetischen Messungen in Abbildung 3.2 wurde bei den weiteren Messungen nur noch der Maximalwert nach 72-stündiger BrdU-Inkubation bestimmt.

Mit dem hier eingesetzten Messverfahren wird eine G1-Arretierung von Fibroblasten vor Erreichen der ersten S-Phase nach Restimulation aus der Konfluenz und somit auch vor Erreichen der ersten Mitose registriert, was als "primärer" oder "prämitotischer" permanenter G1-Arrest bezeichnet wird (Dikomey et al. 2003). Diese Spezifikation ist insofern wichtig, als primär nicht-arretierte Fibroblasten nach Durchlaufen der ersten Mitose auch in einer der nachfolgenden G1-Phasen "sekundär" bzw. "postmitotisch" arretiert werden können (Linke et al. 1997). Die Unterscheidung zwischen primärem und sekundärem G1-Arrest ist auch deshalb von Bedeutung, als die auslösenden Mechanismen unterschiedlich sein können (Dikomey et al. 2003): Während für die Auslösung des primären permanenten G1-Arrests Doppelstrangbrüche mit konsekutiver Aktivierung von p53 und p21 verantwortlich gemacht werden, sind bei der späteren sekundären Auslösung die erzeugten DNA-Schäden nach Durchlaufen der Chromosomenbildung in der Mitose bereits soweit prozessiert, dass mit anderen, p53-unabhängigen Signalwegen gerechnet werden muss. Der sekundäre permanente G1-Arrest ist als eine von mehreren Formen des mitotischen Zelltods zu werten, der durch die Bildung letaler Chromosomenaberrationen ausgelöst wird. Der primäre permanente G1-Arrest dagegen erfolgt bereits vor Erreichen der ersten Mitose und bildet damit eine alternative Form der Zellinaktivierung, bei der die Zelle zwar überlebt, ihre Zellteilungsfähigkeit aber dauerhaft blockiert wird.

4.2 Dosisabhängigkeit des permanenten G1-Arrests

Die derzeitigen Vorstellungen über die Bedeutung von Doppelstrangbrüchen für die Auslösung und das Ausmaß des G1-Arrests gründen sich maßgeblich auf Daten zur Dosisabhängigkeit des Anteils permanent G1-arretierter Zellen. Mit zunehmender Dosis werden zunehmend höhere Anteile an Zellen dauerhaft in der G1-Phase angehalten (Abb. 3.3). Eine solche dosisabhängige Zunahme der G1-Arretierung wurde bei unterschiedlichen Fibroblastenlinien gefunden (Di Leonardo et al. 1994, Linke et al. 1997, Williams et al. 1997); dargestellt wurde in diesen Arbeiten allerdings invers die Abnahme des Anteils BrdU-markierter S-Phasezellen. Von Linke et al. (1997) wurden diese Daten mit einer exponentiell abfallenden Funktion gefittet, die als Eintrefferkurve interpretiert wurde. Da Doppelstrangbrüche die spezifischen Läsionen für die Induktion von p53 darstellen (Nelson und Kastan 1994, Lu und Lane 1993), lag die Annahme nahe, dass Doppelstrangbrüche auch die entscheidenden DNA-Schäden für die Auslösung des permanenten G1-Arrests sind, dass

ein einziger Doppelstrangbruch für die Auslösung desselben ausreichend ist und die Dosisabhängigkeit des permanenten G1-Arrests durch die Anzahl von Doppelstrangbrüchen bestimmt wird (Di Leonardo et al. 1994, Linke et al. 1997, Huang et al. 1996).

4.3 Zeitabhängigkeit des permanenten G1-Arrests

Das Ausmaß der permanenten G1-Arretierung ist nicht allein von der Strahlendosis, sondern auch vom Zeitpunkt der Bestrahlung abhängig. Bei den vorliegenden Experimenten wurde der zeitliche Bezug zum Zeitpunkt der Restimulation vorgegeben, d. h. dem Moment der Rückkehr der Zellen aus dem konfluenten in den proliferativen Zustand. Wurden Fibroblasten unmittelbar vor oder nach der Restimulation bestrahlt, dann war der G1-Arrest deutlich stärker ausgeprägt als bei Bestrahlung um einige Stunden versetzt davor oder danach (Abb. 3.3). Die Restimulation ist möglicherweise deshalb von Bedeutung, weil sie einen drastischen Eingriff in den physiologischen Zustand der Zellen darstellt. Neben dem zeitlichen Bezug der Bestrahlung zur Restimulation (Kap. 4.3.1 und 4.3.2) bleibt darüber hinaus aber auch der zeitliche Abstand zum Eintritt der Zellen in die S-Phase und zum vermeintlich davor liegenden G1-Kontrollpunkt zu diskutieren (Kap. 4.3.3). Von Bedeutung ist auch die Klärung der Frage, welche Bedeutung der Anzahl von Doppelstrangbrüchen am G1-Kontrollpunkt zukommt (Kap. 4.3.4).

4.3.1 Bestrahlung vor der Restimulation

Wurden Fibroblasten unmittelbar vor der Restimulation bestrahlt, so war der G1-Arrest deutlich stärker ausgeprägt, als wenn die Bestrahlung am Tag zuvor erfolgte (Abb. 3.3 A und Abb. 3.6). Dieses Phänomen war bereits von Little und Nagasawa (1985) sowohl an einer normalen als auch an je einer Linie heterozygoter Rb- und AT-Fibroblasten beobachtet worden. Mit jeder Verkleinerung des Zeitintervalls rückte die Bestrahlung näher an den Zeitpunkt der Restimulation heran, was zu einer Zunahme des Anteils permanent G1-arretierter Zellen führte. Sollte die Restimulation eine einschneidende Bedeutung für den Arrest im Sinne einer "Fixierung" haben, dann konnten sich die tags zuvor bestrahlten Zellen von den Schäden und deren Auswirkungen erholen. Ein zeitlich parallel laufendes Phänomen ist bekannt als Erholung der Zellen von "potentiell letalen Schäden", welche sich in einer

verringerten Zellinaktivierung bei verzögerter Zellaussaat im Kolonietest widerspiegelt. Die geringe Menge der verfügbaren Daten erlaubt allerdings keine Aussagen über einen molekularen Zusammenhang zwischen diesen beiden Endpunkten.

4.3.2 Bestrahlung nach der Restimulation

Den ausgeprägtesten G1-Arrest zeigten die Fibroblasten, die direkt nach der Restimulation bestrahlt wurden (64 % arretierte Zellen nach 3,5 Gy, Abb. 3.3 B). Sie reagierten damit am empfindlichsten auf die Bestrahlung. Es ist mikroskopisch zu beobachten, dass sich frisch mit Trypsin abgelöste Zellen nach der Aussaat noch eine Zeit lang in Suspension befinden und etwa 4 h benötigen, um sich am Flaschenboden festzusetzen. Eine ebenfalls erhöhte Empfindlichkeit wurde auch hinsichtlich der Koloniebildungsrate gefunden, wenn die Bestrahlung unmittelbar auf die Zellvereinzelung erfolgte; dabei waren sowohl die unterschiedliche Morphologie der Zellen in Monolayer und Suspension als auch die Trypsin-Einwirkung von Einfluss (Reddy et al. 1989). Wurden Fibroblasten unmittelbar vor der Zellvereinzelung bestrahlt, dann war der G1-Arrest etwas geringer ausgeprägt (56 % arretierte Zellen nach 3,5 Gy, Abb. 3.3 A). Die Zellen unterlagen zwar der nachfolgenden Trypsinierung, befanden sich aber während der Bestrahlung noch im Monolayer. Wenn die Bestrahlung nach der Restimulation hinausgezögert wurde, dann nahm der Anteil permanent G1-arretierter Zellen innerhalb von 4 bis 6 h kontinuierlich ab (Abb. 3.4); diese Zeitspanne wird von Zellen im Allgemeinen benötigt, um sich nach einer Trypsin-Behandlung am Flaschenboden abzusetzen. Bei der Linie HSF13 näherte sich der Anteil permanent G1-arretierter Zellen bei um 6 h verzögerter Bestrahlung (43 % arretierte Zellen nach 3,5 Gy, Abb. 3.3 B) dem Wert an, den diejenigen Zellen aufwiesen, die 16 h vor der Restimulation bestrahlt wurden und die sich über Nacht erholen konnten (37 % arretierte Zellen nach 3,5 Gy, Abb. 3.3 A).

4.3.3 Bestrahlung vor dem G1-Kontrollpunkt

Neben dem zeitlichen Bezug der Bestrahlung zur Restimulation ist für die Auslösung des G1-Arrests darüber hinaus der zeitliche Abstand zum Eintritt der Zellen in die S-Phase und zum vermeintlich davor liegenden G1-Kontrollpunkt von Bedeutung. Wurden Fibroblasten (der

Linie NFHH) zwischen 6 und 12 h nach der Restimulation mit 3,5 Gy bestrahlt, lag der Anteil permanent G1-arretierter Zellen nahezu konstant bei 56 %; bei späterer Bestrahlung wurden hingegen zunehmend weniger Zellen arretiert (Abb. 3.4). Die durchgeführte Analyse der Daten zeigte, dass der Abfall der Werte in einem mittelbaren Zusammenhang mit dem Eintritt von Zellen in die S-Phase stand. Mit der gleichen Rate, mit der die Zellen in die S-Phase eintraten, verminderte sich auch der Anteil permanent G1-arretierter Zellen, wobei der Abfall allerdings zeitlich versetzt schon 4 h früher erfolgte (Abb. 3.5). Die einzigen direkt vergleichbaren Daten stammen von Di Leonardo et al. (1994), die für Fibroblasten der Linie WS1 ebenfalls zeigen konnten, dass bei Bestrahlung ab 12 h nach Restimulation die ersten Zellen nicht mehr in der G1-Phase arretiert werden konnten, während nicht-arretierte (unbestrahlte) Zellen bis zum Erreichen der S-Phase mindestens 16 h benötigten. Einen indirekten Hinweis lieferten Messungen von Gadbois und Lehnert (1997) mit Fibroblasten der Linie HLF. Dabei konnten bei asynchronen Kulturen durch Bestrahlung maximal 73 % derjenigen Zellen, die sich in der G1-Phase befanden, am Eintritt in die S-Phase gehindert, d. h. in der davor liegenden G1-Phase arretiert werden, während 27 % der G1-Phasezellen in der S-Phase markiert wurden. Unter der Annahme, dass das Zellkollektiv gleichmäßig auf die G1-Phase verteilt war und die G1-Phase bei proliferierenden Kulturen 12 bis 18 h dauert (Tupper et al. 1980, Fine und Goldstein 1987), konnten auch hier die Zellen der letzten 3 bis 5 h vor der S-Phase (entsprechend 27 % der Dauer der G1-Phase) nicht mehr arretiert werden.

Bei der Deutung dieser Befunde wird einheitlich von einem Zellzyklus-Kontrollpunkt, dem G1-Kontrollpunkt, ausgegangen (Di Leonardo et al. 1994, Gadbois et al. 1997, Dulic et al. 1994), der die Funktion eines "Point of no return" erfüllt. Diejenigen Zellen, die den G1-Kontrollpunkt überschritten haben, sind damit in der Lage, in die S-Phase einzutreten, auch wenn die DNA-Synthese erst 4 h später einsetzt. Entscheidend für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase ist die Cyclin-Cdk-abhängige Phosphorylierung des Rb-Proteins, die die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und damit die Expression S-Phase-relevanter Gene bewirkt. Die Kinaseaktivität des CyclinE/Cdk2-Komplexes wird dabei als entscheidender Motor des G1-Kontrollpunkts angesehen, der durch Cdk-Inhibitoren wie das Protein p21 gehemmt werden kann. Bei Zellen, die den G1-Kontrollpunkt bereits überschritten haben, kommt eine derartige Hemmung durch eine strahleninduzierte p53-vermittelte Aktivierung von p21 zu spät. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Untersuchungen von Gadbois et al. (1996), die zeigen konnten, dass 2 h nach erfolgter Bestrahlung die maximale

Akkumulation von p53 vorliegt, während die maximale Anreicherung von p21, welches in der Lage ist, die Kinaseaktivität zu hemmen, erst verzögert 4 h nach Bestrahlung nachweisbar ist.

4.3.4 DNA-Doppelstrangbrüche am G1-Kontrollpunkt

Doppelstrangbrüche stellen die spezifischen Läsionen für die Induktion von p53 dar (Nelson und Kastan 1994, Lu und Lane 1993) und werden für die Auslösung des p53-abhängigen G1-Arrests verantwortlich gemacht. Offen ist dabei die Frage, ob auch das Ausmaß des G1-Arrests durch die Anzahl von Doppelstrangbrüchen bestimmt wird, wie angesichts der Dosisabhängigkeit der permanenten G1-Arretierung bereits diskutiert wurde (Abb. 3.3, Kap. 4.2).

Die Experimente zur zeitlichen Annäherung der Bestrahlung an den G1-Kontrollpunkt (Kap. 4.3.3) dienen dem Zweck, die Anzahl von Doppelstrangbrüchen vor dem Kontrollpunkt zu erhöhen in der Erwartung, dass sich dadurch gleichzeitig der Anteil permanent G1-arretierter Zellen erhöht. In dem einzigen vergleichbaren publizierten Experiment wurden von Di Leonardo et al. (1994) Fibroblasten der Linie WS1 nach einem gleichen Zeitschema bestrahlt. Die Daten zeigen, dass auch bei dieser Zelllinie ab 12 h nach der Restimulation die ersten Zellen nicht mehr in der G1-Phase arretiert werden konnten. Die applizierte Dosis von 4 Gy war für diese Zelllinie jedoch derart hoch, dass zu allen Zeitpunkten davor der Anteil permanent G1-arretierter Zellen nahezu 100 % betrug. Dadurch konnte über eine mögliche Zunahme der G1-Arretierung mit zunehmender Annäherung der Bestrahlung an den G1-Kontrollpunkt nichts ausgesagt werden. Aus diesem Grund wurden die Experimente hier mit einer Dosis von 3,5 Gy durchgeführt, die bei diesen Zellen eine abgestufte Reaktion erlaubt hätte.

Die Daten zeigen allerdings mit zunehmender Annäherung der Bestrahlung an den G1-Kontrollpunkt zu keinem Zeitpunkt eine Erhöhung des Anteils permanent G1-arretierter Zellen. Zur Beschreibung des Kurvenverlaufs in Abbildung 3.5 war es deshalb auch nicht erforderlich, in Gleichung 3.4 eine Zeitvariable einzuführen, die einer zeitlichen Zunahme der den permanenten G1-Arrest auslösenden Anzahl von Doppelstrangbrüchen Rechnung getragen hätte. Es war vielmehr ausreichend, allein die zeitliche Progression der Zellen durch den G1-Kontrollpunkt und den Eintritt in die S-Phase zu betrachten. Für all diejenigen Zellen,

die sich noch vor dem G1-Kontrollpunkt befanden, wurde ein konstanter Wert von 56 % für den Anteil permanent G1-arretierter Zellen zu Grunde gelegt, wie er zwischen 6 und 12 h nach Restimulation gemessen wurde, als noch keine Zellen in die S-Phase eingetreten waren (Abb. 3.5).

4.4 Zelllinienabhängigkeit des permanenten G1-Arrests

Ein weiterer unabhängiger Ansatz, die Anzahl von Doppelstrangbrüchen zu variieren und die Auswirkung auf den permanenten G1-Arrest zu untersuchen, lag in der Auswahl der neun Fibroblastenlinien (AF, NFHH), die sich hinsichtlich ihrer Reparaturkapazität für strahleninduzierte Doppelstrangbrüche unterschieden. In zwei bereits publizierten Studien war gezeigt worden (Dikomey et al. 2000, Dikomey und Brammer 2000), dass in diesen Zelllinien durch Bestrahlung zwar eine vergleichbare Anzahl initialer Doppelstrangbrüche erzeugt wurde, welche anschließend aber in unterschiedlichem Ausmaß repariert wurden, so dass die 24 h nach Bestrahlung gemessene Anzahl residueller Doppelstrangbrüche in den einzelnen Zelllinien deutliche Unterschiede aufwies; die Messwerte variierten dabei von 0,034 (AF11) bis 0,085 (AF12) um den Faktor 2,5 (Tab. 3.1). Für diese Zelllinien konnte nun gezeigt werden, dass sie auch hinsichtlich des permanenten G1-Arrests große Unterschiede aufwiesen; nach Bestrahlung mit 3,5 Gy wurden nach unmittelbarer Restimulation zwischen 25 und 91 % und nach verzögerter Restimulation zwischen 15 und 65 % der Zellen arretiert (Abb. 3.6 und Tab. 3.1). Die durchgeführten Tests auf Korrelation zwischen der Anzahl sowohl initialer als auch residueller Doppelstrangbrüche und dem Anteil permanent G1-arretierter Zellen nach unmittelbarer und verzögerter Restimulation erbrachten in keiner der paarweisen Gegenüberstellungen (Abb. 3.7 und 3.8) Hinweise auf eine direkte (positive) Korrelation.

Ein Zusammenhang wurde allein für die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche und das Ausmaß des permanenten G1-Arrests nach verzögerter Restimulation (für acht der neun untersuchten Zelllinien) gefunden. Hier zeigte sich jedoch keine direkte (positive), sondern vielmehr eine inverse (negative) Korrelation (Abb. 3.8 B). Folglich zeigte die Zelllinie, bei der die G1-Arretierung am stärksten ausgeprägt war (AF11: 58 % arretierte Zellen nach 3,5 Gy, Tab. 3.1), gleichzeitig die geringste Anzahl residueller Doppelstrangbrüche (0,034), während die Zelllinie mit der geringsten G1-Arretierung (AF06: 14 % arretierte Zellen nach

3,5 Gy) die größte Anzahl residueller Doppelstrangbrüche (0,076) aufwies. Eine der untersuchten Zelllinien (AF12) wurde nicht mit in die Korrelation einbezogen; sie zeichnete sich durch eine große Anzahl von Doppelstrangbrüchen bei gleichzeitig ausgeprägtem permanentem G1-Arrest aus. Diese Linie wurde bereits von Dikomey et al. (2000) als Ausnahme unter den untersuchten normalen Fibroblasten charakterisiert; die vielen residuellen Doppelstrangbrüche wurden dabei nicht allein als nicht-reparierte strahleninduzierte Brüche gewertet, sondern als Summe aus nicht-reparierten und zusätzlich entstandenen Brüchen, wie sie bei der DNA-Fragmentierung im Verlauf apoptotischer Prozesse gebildet werden.

Die gefundene Korrelation lässt die Diskussion dreier möglicher kausaler Zusammenhänge zu: Ist die Anzahl von Doppelstrangbrüchen maßgeblich für das Ausmaß der permanenten G1-Arretierung, u. a. weil Doppelstrangbrüche grundsätzlich für die Auslösung des permanenten G1-Arrests verantwortlich gemacht werden (Kap. 4.4.1)? Oder wird umgekehrt durch den Anteil der permanent in der G1-Phase arretierten Zellen die Anzahl von Doppelstrangbrüchen beeinflusst entsprechend der allgemeinen Vorstellung, dass durch Zellzyklusarreste den Zellen mehr Zeit für Reparaturprozesse zur Verfügung gestellt wird (Kap. 4.4.2)? Oder handelt es sich um eine gemeinsame Abhängigkeit beider Parameter von einem dritten Prozess, der sowohl die Anzahl von Doppelstrangbrüchen als auch den permanenten G1-Arrest beeinflusst (Kap. 4.4.3)?

4.4.1 Einfluss residueller DNA-Doppelstrangbrüche auf den permanenten G1-Arrest

Doppelstrangbrüche werden grundsätzlich für die Auslösung des primären G1-Arrests verantwortlich gemacht, und auch die Dosisabhängigkeit der G1-Arretierung könnte mit der Hypothese erklärt werden, dass mit zunehmender Strahlendosis die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche ansteigt, die letztlich zu einem größeren Anteil permanent G1-arretierter Zellen führt (Kap. 4.2). Die hier durchgeführte experimentelle Untersuchung wäre geeignet gewesen, eine derartige Abhängigkeit aufzuzeigen, wurde den Zellen nach Bestrahlung doch durch die um 16 h verzögerte Restimulation genügend Zeit zur Verfügung gestellt, um (je nach Reparaturkapazität der Zelllinie) möglichst alle reparablen DNA-Schäden zu beseitigen, bevor sie aus der Konfluenz heraus durch verdünnte Aussaat zu erneuter Proliferation angeregt und nach weiteren 19 h in der G1-Phase arretiert (oder nicht arretiert) wurden (Abb.

3.9). Die hier präsentierten Daten verdeutlichen allerdings, dass eine hohe Anzahl residueller Doppelstrangbrüche nicht zu einem hohen, sondern vielmehr zu einem niedrigen Anteil permanent in der G1-Phase arretierter Zellen (und umgekehrt) führt. Der Nachweis dieser inversen Korrelation bedeutet, dass die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche nicht für das Ausmaß des permanenten G1-Arrests verantwortlich sein kann.

4.4.2 Einfluss des permanenten G1-Arrests auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Es stellt sich daher die Frage, ob umgekehrt der G1-Arrest die Anzahl von Doppelstrangbrüchen beeinflusst. Einem strahleninduzierten Zellzyklusarrest wird allgemein die biologische Bedeutung zugeschrieben, dass er den Zellen Zeit für Reparaturprozesse verschafft. Je länger ein Arrest dauert, desto mehr DNA-Schäden können repariert werden, bevor die Zelle den riskanten Übergang in die nächste Phase des Zellzyklus vollzieht. Aus zwei Gründen trifft dieser biologische Vorteil einer längeren Arretierung auf den hier untersuchten G1-Arrest nicht zu: (1) Gemessen wurde der permanente G1-Arrest, der die Zellen nicht wie der transiente Arrest nach einer Erholungsphase wieder in die proliferationsfähige Zellfraktion entlässt, sondern sie in einen (vitalen) Zustand mit Verlust der Teilungsfähigkeit überführt, was hinsichtlich der Klonogenität eine Zellinaktivierung darstellt. Sollten allerdings Zelllinien mit einem stark ausgeprägten permanenten G1-Arrest auch gleichzeitig einen intensiven transienten G1-Arrest (mit einer langen Arrestdauer) ausbilden, dann könnten diejenigen Zellen, die nur vorübergehend in der G1-Phase angehalten werden, davon profitieren. Es ist bereits in Kapitel 4.1.2 diskutiert worden, dass die derzeit verfügbaren Daten eine Aussage über einen derartigen Zusammenhang nicht erlauben. (2) Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist in der Regel 12 h nach einer Bestrahlung abgeschlossen und die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche ab diesem Zeitpunkt konstant (Dikomey und Brammer 2000). Da die Zellen erst 16 h nach Bestrahlung restimuliert wurden und dann mindestens 12 h benötigten, um den G1-Kontrollpunkt zu erreichen, kann die Arretierung am G1-Kontrollpunkt die Reparatur der Doppelstrangbrüche allein auf Grund der zeitlichen Abfolge nicht beeinflussen (Abb. 3.9).

4.4.3 Einfluss von p53 auf den permanenten G1-Arrest und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Da sich der permanente G1-Arrest und die Reparatur von Doppelstrangbrüchen offensichtlich gegenseitig nicht direkt beeinflussen, bleibt zu klären, ob es eine gemeinsame Abhängigkeit beider Vorgänge von einem übergeordneten molekularen Mechanismus gibt, der die beobachtete inverse Korrelation zwischen dem Ausmaß des permanenten G1-Arrests einerseits und der Anzahl residueller Doppelstrangbrüche andererseits erklären könnte. Vorrangig wird dabei die Beteiligung des Proteins p53 diskutiert, das bekanntermaßen am G1-Arrest beteiligt ist und möglicherweise auch auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen Einfluss nimmt (Dahm-Daphi 2000, Bristow et al. 1996, Janus et al. 1999, Willers et al. 2000). Die Bedeutung von p53 für die Auslösung und das Ausmaß des G1-Arrests wurde bereits in Kapitel 4.1.2 erörtert; die Untersuchungen an verschiedenen Fibroblastenlinien zeigten dabei eine deutliche Abhängigkeit des permanenten G1-Arrests vom funktionellen p53-Status (Williams et al. 1997, Linke et al. 1997). Weniger gut geklärt ist derzeit noch die Beteiligung von p53 an der DNA-Reparatur. Entsprechend den vielfältigen Funktionen von p53 werden dabei verschiedene Wege der Wirkung von p53 auf DNA-Reparaturvorgänge untersucht. Hinsichtlich der Reparatur von Doppelstrangbrüchen wird p53 eine Korrekturlese-Funktion ("Proof Reader") bei der homologen Reparatur (HR) zugesprochen; demzufolge erniedrigt p53 zwar die HR-Rate, verbessert aber gleichzeitig die Genauigkeit ("Fidelity") der Reparatur (Dudenhöffer et al. 1998). Daneben gibt es neueste Befunde darüber, dass p53 nach Bestrahlung mit zwei Enzymen, der AP-Endonuklease und der DNA-Polymerase β , direkt interagieren kann, welche maßgeblich an der Basenexzisionsreparatur (BER) beteiligt sind, so dass eine große endogene Menge an p53 mit einer hohen BER-Aktivität einhergeht (Zhou et al. 2001). Parallel dazu konnte gezeigt werden, dass Basenschäden während der Reparaturprozesse wiederum zu sekundären Doppelstrangbrüchen führen können (Sutherland et al. 2002). Sollte demnach p53 die DNA-Reparatur insgesamt positiv beeinflussen, dann könnte möglicherweise eine besonders ausgeprägte p53-Antwort sowohl für einen ausgeprägten permanenten G1-Arrest als auch für eine optimale DNA-Reparatur mit daraus resultierender geringerer Anzahl residueller Doppelstrangbrüche verantwortlich sein.

An Hand dieser Hypothese wurde in Abbildung 4.1 die schematische Darstellung der Inaktivierungswege normaler Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung (Abb. 1.2) erweitert. Die hinzugefügte Querverbindung (mit dem Symbol der Hemmung) soll die Verringerung der

Anzahl letaler Chromosomenaberrationen verdeutlichen, die aus der positiven Wirkung von p53 auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen resultiert. Die Wirkung von p53 verläuft damit in zwei unterschiedliche Richtungen: (1) Das p53-Protein verursacht den primären permanenten G1-Arrest. Dadurch werden geschädigte Fibroblasten – in erhaltenem vitalem Zustand – dem Proliferationspool entzogen, bevor das Schädigungsmuster in den späteren Phasen des Zellzyklus weiter prozessiert wird und möglicherweise ein proliferationsabhängiger Zelluntergang eintritt. (2) Das 53-Protein unterstützt die DNA-Reparatur, um der Bildung letaler Chromosomenaberrationen und dem nachfolgenden mitotischen Zelltod vorzubeugen. In einer kürzlich erschienenen Arbeit (Borgmann et al. 2004) konnte nach Röntgenbestrahlung normaler Fibroblasten die Hälfte der Gesamtzellinaktivierung auf letale Chromosomenaberrationen zurückgeführt werden, während die andere Hälfte dem permanenten G1-Arrest zugeschrieben wurde.

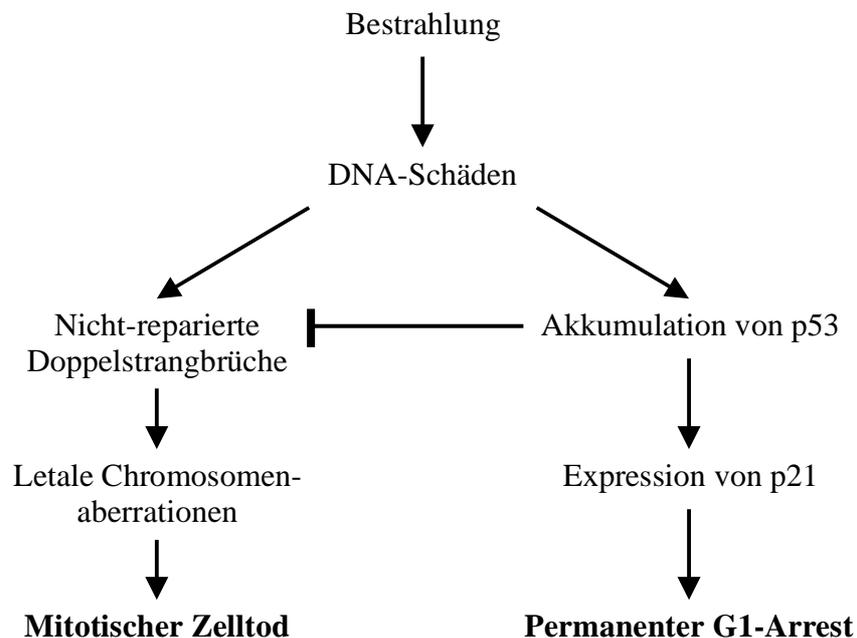


Abb. 4.1: Erweiterte schematische Darstellung der Inaktivierungswege von normalen humanen Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung. Das Schema von Abb. 1.2 ist ergänzt um eine Querverbindung, die eine mögliche positive Einflussnahme von p53 auf die DNA-Reparatur mit konsekutiver Abnahme letaler Chromosomenaberrationen darstellen soll. Mit dem Modell lässt sich die gefundene inverse Korrelation zwischen dem Anteil permanent G1-arretierter Zellen und der Anzahl nicht-reparierter Doppelstrangbrüche erklären (s. Text).

5 Zusammenfassung

Bei humanen Fibroblasten wird die Zellinaktivierung nach ionisierender Bestrahlung sowohl durch letale Chromosomenaberrationen als auch den permanenten G1-Arrest verursacht. Es wird generell angenommen, dass beide Prozesse durch DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöst werden. Während es hinsichtlich der Beteiligung von Doppelstrangbrüchen bei der Entstehung von letalen Chromosomenaberrationen detaillierte Vorstellungen gibt, ist über die Bedeutung dieser Schäden bei der Entstehung des permanenten G1-Arrests wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei Fibroblasten zwischen der Anzahl der Doppelstrangbrüche und dem Ausmaß des permanenten G1-Arrests ein Zusammenhang besteht.

Der Anteil permanent in der G1-Phase arretierter Zellen wurde mittels BrdU-Markierung gemessen. Dazu wurden konfluente Zellkulturen durch verdünnte Aussaat zur Proliferation restimuliert und der Anteil proliferierender Zellen über eine kontinuierliche Markierung mit BrdU flusszytometrisch bestimmt.

Es wurde gezeigt, dass unbestrahlte Fibroblasten 23 Stunden nach Restimulation in die S-Phase eintreten. Bei Bestrahlung wird ein Teil der Zellen am sogenannten G1-Kontrollpunkt permanent arretiert. Es wurde gemessen, dass der G1-Kontrollpunkt 19 Stunden nach der Restimulation erreicht wurde und damit 4 Stunden vor dem Eintritt in die S-Phase lag.

Es zeigte sich, dass der Anteil der arretierten Zellen vom Zeitintervall zwischen Bestrahlung und G1-Kontrollpunkt abhing. Wurden die Zellen nach Bestrahlung mit 3,5 Gy noch für 16 Stunden inkubiert, bevor eine Restimulation erfolgte, wurden 37 % der Zellen permanent in der G1-Phase arretiert. Wurden die Zellen dagegen unmittelbar nach der Bestrahlung restimuliert, stieg der Anteil auf 56 %. In weiteren Versuchen wurde das Zeitintervall zwischen Bestrahlung und G1-Kontrollpunkt verkürzt, indem die Zellen zunächst restimuliert und dann an verschiedenen Zeitpunkten bestrahlt wurden. Diese Verkürzung bewirkte keinen weiteren Anstieg in dem Anteil der G1-arretierten Zellen. Da eine Verkürzung des Zeitintervalls auch das Ausmaß der möglichen Doppelstrangbruch-Reparatur vermindert, macht dieses Ergebnis deutlich, dass das Ausmaß des permanenten G1-Arrests offensichtlich

nicht von der Anzahl der zum Zeitpunkt des G1-Kontrollpunkts vorhandenen Doppelstrangbrüche abhängt.

Für humane Fibroblasten wurde bereits gezeigt, dass die Zellinaktivierung bei Restimulation der Zellen 16 Stunden nach Bestrahlung umso höher ausfiel, je ineffektiver die Doppelstrangbruch-Reparatur, d. h. je höher die Anzahl nicht-reparierter Doppelstrangbrüche war. Für neun Fibroblastenlinien, die sich hinsichtlich ihrer Reparaturkapazität unterscheiden, wurde jetzt für identische Versuchsbedingungen gefunden, dass eine höhere Anzahl nicht-reparierter Doppelstrangbrüche nicht zu einem höheren G1-Arrest führte, sondern vielmehr mit einem geringeren Anteil arretierter Zellen korrelierte und dass umgekehrt Fibroblastenlinien, die ein gutes Reparaturvermögen und damit eine geringe Anzahl nicht-reparierter Doppelstrangbrüche aufwiesen, einen ausgeprägten G1-Arrest zeigten.

Eine kinetische Analyse der Doppelstrangbruch-Reparatur und des G1-Arrests machte deutlich, dass sich diese beiden Prozesse im zeitlichen Ablauf erheblich unterscheiden. Die Doppelstrangbruch-Reparatur ist bei Restimulation bereits vollständig abgeschlossen, während sich der G1-Arrest erst 19 Stunden nach der Restimulation ausbildet. Damit wird deutlich, dass sich entgegen der generellen Vorstellung ein G1-Arrest nicht auf die Doppelstrangbruch-Reparatur auswirken kann. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede in der Doppelstrangbruch-Reparatur, wie sie für die Fibroblastenlinien gefunden wurden, auf einen unterschiedlich ausgeprägten G1-Arrest zurückzuführen sind. Damit wird mit dieser Arbeit erstmalig gezeigt, dass das gleichzeitige Auftreten eines ausgeprägten G1-Arrests und einer effektiven Doppelstrangbruch-Reparatur nicht auf eine unmittelbare Interaktion beider Prozesse, sondern vielmehr auf eine gemeinsame "upstream" gelegene Regulation zurückzuführen ist.

6 Literaturverzeichnis

- Agarwal, M. L.; Agarwal, A.; Taylor, W. R.; Stark, G. R.: P53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (1995) 8493-8497
- Augenlicht, L. H.; Baserga, R.: Changes in the G0 state of WI-38 fibroblasts at different times after confluence. *Experimental Cell Research* 89 (1974) 255-262
- Azzam, E. I.; de Toledo, S. M.; Waker, A. J.; Little, J. B.: High and low fluences of α -particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts. *Cancer Research* 60 (2000) 2623-2631
- Barcellos-Hoff, M. H.: Latency and activation in the control of TGF-beta. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1 (1996) 353-63
- Bayreuther, K.; Rodemann, H. P.; Hommel, R.; Dittmann, K.; Albiez, M.; Francz, P. I.: Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (1988) 5112-5116
- Bayreuther, K.; Francz, P. I.; Gogol, J.; Hapke, C.; Maier, M.; Meinrath, H.-G.: Differentiation of primary and secondary fibroblasts in cell culture systems. *Mutation Research* 256 (1991) 233-242
- Bayreuther, K.; Francz, P. I.; Rodemann, H. P.: Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation. *Archives of Gerontology and Geriatrics, Supplement* 3 (1992) 47-74
- Bernhard, E. J.; Maity, A.; Muschel, R. J.; McKenna, W. G.: Effects of ionizing radiation on cell cycle progression. *Radiation Environmental Biophysics* 34 (1995) 79-83
- Borgmann, K.; Dede, M.; Wrona, A.; Brammer, I.; Overgaard, J.; Dikomey, E.: For X-irradiated normal human fibroblasts only half of cell inactivation results from chromosomal damage. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 58 (2004) 445-452
- Bouffler, S. D.; Kemp, C. J.; Balmain, A.; Cox, R.: Spontaneous and ionizing radiation-induced chromosomal abnormalities in p53-deficient mice. *Cancer Research* 55 (1995) 3883-3889
- Boyle, J. M.; Greaves, M. J.; Camplejohn, R. S.; Birch, J. M.; Roberts, S. A.; Varley, J. M.: Radiation-induced G1 arrest is not defective in fibroblasts from Li-fraumeni families without TP53 mutations. *British Journal of Cancer* 79 (1999) 1657-1664

- Brammer, I.; Jung, H.: Cell loss in irradiated tumours. In: H.-P. Beck-Bornholdt (ed.), *Medical Radiology. Current Topics in Clinical Radiobiology of Tumors*. Springer, Berlin (1993) 129-143
- Brammer, I.; Zoller, M.; Dikomey, E.: Relationship between cellular radiosensitivity and DNA damage measured by comet assay in human normal, NBS and AT fibroblasts. *International Journal of Radiation Biology* 77 (2001) 929-938
- Brammer, I.; Herskind, C.; Haase, O.; Rodemann, H. P.; Dikomey, E.: Induction and repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts are not affected by terminal differentiation. *DNA Repair* 3 (2004) 113-120
- Bristow, R. G.; Benchimol, S.; Hill, R. P.: The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 40 (1996) 197-223
- Brock, W. A.; Tucker, S. L.; Geara, F. B.; Turesson, I.; Wike, J.; Nyman, J.; Peters, L. J.: Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 32 (1995) 1371-1379
- Buchkovich, K.; Duffy, L. A.; Harlow, E.: The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58 (1989) 1097-1105
- Burnet, N. G.; Nyman, J.; Turesson, I.; Wurm, R.; Yarnold, J. R.; Peacock, J. H.: Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *The Lancet* 339 (1992) 1570-1571
- Burnet, N. G.; Johansen, J.; Turesson, I.; Nyman, J.; Peacock, J. H.: Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. *International Journal of Cancer* 79 (1998) 606-613
- Chen, J. H.; Stoeber, K.; Kingsbury, S.; Ozanne, S. E.; Williams, G. H.; Hales, C. N.: Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 49439-46
- Chen, P.-L.; Scully, P.; Shew, J.-Y.; Wang, J. Y. J.; Lee, W.-H.: Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 58 (1989) 1193-1198
- Chung, D. H.; Zhang, F.; Chen, F.; McLaughlin, W. P.; Ljungman, M.: Butyrate attenuates BclXL expression in human fibroblasts and acts in synergy with ionizing radiation to induce apoptosis. *Radiation Research* 149 (1998) 187-194

- Clarke, A. R.; Purdie, C. A.; Harrison, D. J.; Morris, R. G.; Bird, C. C.; Hooper, M. L.; Wyllie, A. H.: Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362 (1993) 849-852
- Comer, K. A.; Dennis, P. A.; Armstrong, L.; Catino, J. J.; Kastan, M. B.; Kuman, C. C.: Human smooth muscle α -Aktin is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *Oncogene* 16 (1998) 1299-1308
- Conlon, K. A.; Zharkov, D. O.; Berrios, M.: Immunofluorescent localization of the murine 8-oxoguanine DNA glycosylase (mOGG1) in cells growing under normal and nutrient deprivation conditions. *DNA Repair* 2 (2003) 1337-1352
- Dahm-Daphi, J.: p53: biology and role for cellular radiosensitivity. *Strahlentherapie und Onkologie* 176 (2000) 278-285
- DeCaprio, J. A.; Furukawa, Y.; Ajchenbaum, F.; Griffin, J. D.; Livingston, D. M.: The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (1992) 1795-1798
- Dede, M.: Beziehung zwischen letalen Chromosomenaberrationen und zellulärem Überleben in Fibroblastenlinien von 12 Brustkrebs-Patientinnen. Dissertation, FB Medizin, Universität Hamburg (in Vorbereitung)
- Di Leonardo, A.; Linke, S. P.; Clarkin, K.; Wahl, G. M.: DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes and Development* 8 (1994) 2540-2551
- Dikomey, E.; Dahm-Daphi, J.; Brammer, I.; Martensen, R.; Kaina, B.: Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International Journal of Radiation Biology* 73 (1998) 269-278
- Dikomey, E.; Brammer, I.: Relationship between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied for different growth states, dose rates and plating conditions in a normal human fibroblast line. *International Journal of Radiation Biology* 76 (2000) 773-781
- Dikomey, E.; Brammer, I.; Johansen, J.; Bentzen, S. M.; Overgaard, J.: Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 46 (2000) 481-490

- Dikomey, E.; Borgmann, K.; Brammer, I.; Kasten-Pisula, U.: Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology* 193 (2003) 125-135
- Dimitrijevic-Bussod, M.; Balzaretta-Maggi, V. S.; Gadbois, D. M.: Extracellular matrix and radiation G1 cell cycle arrest in human fibroblasts. *Cancer Research* 59 (1999) 4843-4847
- Dudenhöffer, C.; Rohaly, G.; Will, K.; Deppert, W.; Wiesmüller, L.: Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Molecular and Cellular Biology* 18 (1998) 5332-5342
- Dulic, V.; Lees, E.; Reed, S. I.: Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257 (1992) 1958-1961
- Dulic, V.; Kaufmann, W. K.; Wilson, S. J.; Tlsty, T. D.; Lees, E.; Harper, J. W.; Elledge, S. J.; Reed, S. I.: P53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76 (1994) 1013-1023
- Ehrhart, E. J.; Segarini, P.; Tsang, M. L.; Carroll, A. G.; Barcellos-Hoff, M. H.: Latent transforming growth factor beta1 activation in situ: quantitative and functional evidence after low-dose gamma-irradiation. *FASEB Journal* 11 (1997) 991-1002
- El-Awady, R. A.; Dikomey, E.; Dahm-Daphi, J.: Radiosensitivity of human tumour cells is associated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. *British Journal of Cancer* 89 (2003) 593-601
- El-Diery, W. S.; Harper, J. W.; O'Connor, P. M.; Velculescu, V. E.; Canman, C. E.; Jackman, J.; Pietenpol, J. A.; Burrell, M.; Hill, D. E.; Wang, Y.; Wiman, K. G.; Mercer, W. E.; Kastan, M. B.; Kohn, K. W.; Elledge, S. J.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research* 54 (1994) 1169-1174
- Elledge, S. J.: Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274 (1996) 1664-1668
- Farmer, G.; Bargonetti, J.; Zhu, H.; Friedman, P.; Prywes, R.; Prives, C.: Wild-type p53 activates p53 transcription in vitro. *Nature* 358 (1992) 83-86
- Fine, A.; Goldstein, R. H.: The effect of PGE2 on the activation of quiescent lung fibroblasts. *Prostaglandins* 33 (1987) 903-913

- Ford, J. M.; Hanawalt, P. C.: Li-fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 92 (1995) 8876-8880
- Forrester, H. B.; Radford, I. R.; Dewey, W. C.: Selection and sequencing of interchromosomal rearrangements from gamma-irradiated normal human fibroblasts. *International Journal of Radiation Biology* 75 (1999) 543-551
- Funk, W. D.; Pak, D. T.; Karas, R. H.; Wright, W. E.; Shay, J. W.: A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Molecular and Cellular Biology* 12 (1992) 2866-2871
- Gadbois, D. M.; Crissman, H. A.; Nastasi, A.; Habbersett, R.; Wang, S.; Chen, D.; Lehnert, B. E.: Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays. *Radiation Research* 146 (1996) 414-424
- Gadbois, D. M.; Lehnert, B. E.: Temporal position of G1 arrest in normal human fibroblasts after exposure to γ -rays. *Experimental Cell Research* 232 (1997) 161-166
- Gadbois, D. M.; Bradbury, E. M.; Lehnert, B. E.: Control of radiation-induced G1 arrest by cell-substratum interactions. *Cancer Research* 57 (1997) 1151-1156
- Geara, F. B.; Peters, L. J.; Kian Ang, K.; Wike, J. L.; Brock, W. A.: Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 27 (1993) 1173-1179
- Girard, F.; Strausfeld, U.; Fernandez, A.; Lamb, N.: Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67 (1991) 1169-1179
- Goodhead, D. T.: Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology* 65 (1994) 7-17
- Harper, J. W.; Adami, G. R.; Wei, N.; Keyomarsi, K.; Elledge, S. J.: The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 (1993) 805-816
- Hartwell, L. H.; Weinert, T. A.: Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246 (1989) 629-634
- Hayflick, L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cellular Research* 37 (1965) 614-636

- Hendry, J. H.; West, C. M. L.: Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. *International Journal of Radiation Biology* 71 (1997) 709-719
- Herrmann, T.; Baumann, M.: *Klinische Strahlenbiologie*. Fischer, Jena (1997)
- Herskind, C.; Bentzen, S. M.; Overgaard, J.; Overgaard, M.; Bamberg, M.; Rodemann, H. P.: Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 47 (1998) 263-269
- Herskind, C.; Johansen, J.; Bentzen, S. M.; Overgaard, M.; Overgaard, J.; Bamberg, M.; Rodemann, H. P.: Fibroblast differentiation in subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Acta Oncologica* 39 (2000) 383-388
- Huang, H.; Li, C.-Y.; Little, J. B.: Abrogation of p53 function by transfection of HPV16 E6 gene does not enhance resistance of human tumour cells to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology* 70 (1996) 151-160
- Janus, F.; Albrechtsen, N.; Dornreiter, I.; Wiesmuller, L.; Grosse, F.; Deppert, W.: The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55 (1999) 12-27
- Johansen, J.; Bentzen, S. M.; Overgaard, J.; Overgaard, M.: Evidence for a positive correlation between in vitro radiosensitivity of normal human skin fibroblasts and the occurrence of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology* 66 (1994) 407-412
- Johansen, J.; Bentzen, S. M.; Overgaard, J.; Overgaard, M.: Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia, and skin erythema after radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 40 (1996) 101-109
- Kanaar, R.; Hoeijmakers, J. H. J.; van Gent, D. C.: Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends in Cell Biology* 8 (1998) 483-489
- Karran, P.: DNA double strand break repair in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics and Development* 10 (2000) 144-150
- Kastan, M. B.; Onyekwere, O.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Craig, R. W.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research* 51 (1991) 6304-6311
- Kastan, M. B.; Zhan, Q.; El-Deiry, W. S.; Carrier, F.; Jacks, T.; Walsh, W. V.; Plunkett, B. S.; Vogelstein, B.; Fornace, A. J.: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71 (1992) 587-597

- Kasten, U.; Plottner, N.; Johansen, J.; Overgaard, J.; Dikomey, E.: Ku70/80 gene expression and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) activity do not correlate with double-strand break (dsb) repair capacity and cellular radiosensitivity in normal human fibroblasts. *British Journal of Cancer* 79 (1999) 1037-1041
- Kiltie, A. E.; Orton, C. J.; Ryan, A. J.; Roberts, S. A.; Marples, B.; Davidson, S. E.; Hunter, R. D.; Margison, G. P.; West, C. M. L.; Hendry, J. H.: A correlation between residual DNA double-strand breaks and clonogenic measurements of radiosensitivity in fibroblasts from preradiotherapy cervix cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 39 (1997) 1137-1144
- Koff, A.; Giordano, A.; Desai, D.; Yamashita, K.; Harper, J. W.; Elledge, S.; Nishimoto, T.; Morgan, D. O.; Franza, R. B.; Roberts, J. M.: Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257 (1992) 1689-1694
- Kröger, J.: Permanenter G1-Arrest nach Röntgenbestrahlung von normalen humanen Fibroblasten. Dissertation, FB Medizin, Universität Hamburg (2002)
- Kuerbitz, S. J.; Plunkett, B. S.; Walsh, W. V.; Kastan, M. B.: Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (1992) 7491-7495
- Lakin, N. D.; Jackson, S. P.: Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18 (1999) 7644-4655
- Lane, D. P.: p53, guardian of the genome. *Nature* 358 (1992) 15-16
- Lara, P. C.; Russell, N. S.; Smolders, I. J. H.; Bartelink, H.; Begg, A. C.; Coco-Martin, J. M.: Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production. *International Journal of Radiation Biology* 70 (1996) 683-692
- Larner, J. M.; Lee, H.; Hamlin, J. L.: S phase damage sensing checkpoints in mammalian cells. *Cancer Surveys* 29 (1997) 25-45
- Linke, S. P.; Clarkin, K. C.; Wahl, G. M.: P53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer Research* 57 (1997) 1171-1179
- Little, J. B.: Delayed initiation of DNA synthesis in irradiated human diploid cells. *Nature* 218 (1968) 1064-1065
- Little, J. B.; Nagasawa, H.: Effect of confluent holding on potentially lethal damage repair, cell cycle progression, and chromosomal aberrations in human normal and Ataxia-telangiectasis fibroblasts. *Radiation Research* 101 (1985) 81-93

- Little, J. B.: Changing views of cellular radiosensitivity. *Radiation Research* 140 (1994) 299-311
- Löbrich, M.; Kühne, M.; Wetzel, J.; Rothkamm, K.: Joining of correct and incorrect DNA double-strand break ends in normal human and Ataxia Telangiectasia fibroblasts. *Genes, Chromosomes & Cancer* 27 (2000) 59-68
- Lowe, S. W.; Ruxx, H. E.; Jacks, T.; Housman, D. E.: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74 (1993) 957-967
- Lu, X.; Lane, D. P.: Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes?. *Cell* 75 (1993) 765-78
- Nagasawa, H.; Little, J. B.: Comparison of kinetics of X-ray-induced cell killing in normal, ataxia teleangiectasia and hereditary retinoblastoma fibroblasts. *Mutation Research* 109 (1983) 297-308
- Nagasawa, H.; Robertson, J. B.; Arundel, C. S.; Little, J. B.: The effect of X-irradiation on the progression of mouse 10T1/2 cells released from density inhibited cultures. *Radiation Research* 97 (1984) 537-545
- Nelson, W. G.; Kastan, M. B.: DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Molecular and Cellular Biology* 14 (1994) 1815-23
- Nilsen, H.; Krokan, H. E.: Base excision repair in a network of defenses 8627e and tolerance. *Carcinogenesis* 2 (2001) 987-998
- O'Connor, P. M.; Jackman, J.; Bae, I.; Myers, T. G.; Fan, S.; Mutoh, M.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Sausville, E. A.; Weinstein, J. N.; Friend, S.; Fornace, A. J. Jr.; Kohn, K. W.: Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the national cancer institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitor potency of 123 anticancer agents. *Cancer Research* 57 (1997) 4285-4300
- Olsen, A.-K.; Duale, N.; Bjoras, M.; Larsen, C. T.; Wiger, R.; Holme, J. A.; Seeberg, E. C.; Brunborg, G.: Limited repair of 8-hydroxy-7,8-dihydroguanine residues in human testicular cells. *Nucleic Acids Research* 31 (2003) 1351-1363
- Pagano, M.; Pepperkok, R.; Verde, F.; Ansorge, W.; Draetta, G.: Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO Journal* 11 (1992) 961-971
- Pardee, A. B.: G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246 (1989) 603-608

- Peacock, J.; Ashton, A.; Bliss, J.; Bush, C.; Eady, J.; Jackson, C.; Owen, R.; Regan, J.; Yarnold, J.: Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 55 (2000) 173-178
- Puck, T. T.; Marcus, P. J.: Action of X-rays on mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine* 103 (1956) 653-666
- Ravitz, M. J.; Wenner, C. E.: Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Advances in Cancer Research* 71 (1997) 165-207
- Reddy, N. M., Stevenson, A. F., Lange, C. S.: Trypsinization and the radiosensitivity of mitotic and log phase Chinese hamster V79 cells exposed to 250 kVp X-rays. *International Journal of Radiation Biology* 55 (1989) 105-117
- Reddy, N. M. S.; Lange, C. S.: Similarities in the repair kinetics of sublethal and potentially lethal X-ray damage in log phase Chinese hamster V79 cells. *International Journal of Radiation Biology* 56 (1989) 239-252
- Riley, P. A.: Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology* 65 (1994) 27-33
- Rodemann, H. P.: Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC-) induced postmitotic differentiation states in vitro. *Differentiation* 42 (1989) 37-43
- Rodemann, H. P.; Bayreuther, K.; Francz, P. I.; Dittmann, K.; Albiez, M.: Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Experimental Cell Research* 180 (1989) 84-93
- Rodemann, H. P.; Peterson, H.-P.; Schwenke, K.; von Wangenheim, K.-H.: Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scanning Microscopy* 5 (1991) 1135-1143
- Rodemann, H. P.; Bamberg, M.: Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiotherapy and Oncology* 35 (1995) 83-90
- Rubin, H.: Cell aging in vivo and in vitro. *Mechanism of Aging and Development* 98 (1997) 1-35
- Rudat, V.; Dietz, A.; Conradt, C.; Weber, K.-J.; Flentje, M.: In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with acute radiation toxicity in patients with head and neck cancer. *Radiotherapy and Oncology* 43 (1997) 181-188

- Rudat, V.; Dietz, A.; Nollert, J.; Conradt, C.; Weber, K. J.; Flentje, M.; Wannemacher, M.: Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 53 (1999) 233-245
- Russell, N. S.; Grummels, A.; Hart, A. A. M.; Smolders, I. J. H.; Borger, J.; Bartelink, H.; Begg, A. C.: Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. *International Journal of Radiation Biology* 73 (1998) 661-670
- Sarkaria, J. N.; Bush, C.; Eady, J. J.; Peacock, J. H.; Steel, G. G.; Yarnold, J. R.: Comparison between pulsed-field gel electrophoresis and the comet assay as predictive assays for radiosensitivity in fibroblasts. *Radiation Research* 150 (1998) 17-22
- Serrano, M.; Blasco, M. A.: Putting the stress on senescence. *Current Opinion in Cell Biology* 13 (2001) 748-753
- Shinomiya, N.; Kuno, Y.; Yamamoto, F.; Fukasawa, M.; Okumuru, A.; Uefuji, M.; Rokutanda, M.: Different mechanisms between premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis in X-irradiated U937 cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 47 (2000) 767-777
- Stewart, N.; Hicks, G. G.; Paraskevas, F.; Mowat, M.: Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 10 (1995) 109-115
- Sutherland, B. M.; Bennett, P. V.; Sutherland, J. C.; Laval, J.: Clustered DNA damages induced by X-rays in human cells. *Radiation Research* 157 (2002) 611-616
- Tupper, J. T.; Kaufman, L.; Bodine, P. V.: Related effects of calcium and serum on the G1 phase of the human W138 fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 104 (1980) 97-103
- Wagener, C.: Einführung in die Molekulare Onkologie. Thieme, Stuttgart (1996)
- Ward, J. F.: DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 35 (1988) 95-125
- Weinberg, R. A.: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81 (1995) 323-330
- Weinert, T. A.; Hartwell, L. H.: The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241 (1988) 317-322
- Weintraub, S. J.; Prater, C. A.; Dean, D. C.: Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358 (1992) 259-261

- Willers, H.; McCarthy, E. E.; Wu, B.; Wunsch, H.; Tang, W.; Taghian, D. G.; Xia, F.; Powell, S. N.: Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control. *Oncogene* 19 (2000) 632-639
- Williams, K. J.; Heighway, J.; Birch, J. M.; Norton, J. D.; Scott, D.: No defect in G1/S cell cycle arrest in irradiated Li-fraumeni lymphoblastoid cell lines. *British Journal of Cancer* 74 (1996) 698-703
- Williams, K. J.; Boyle, J. M.; Birch, J. M.; Norton, J. D.; Scott, D.: Cell cycle arrest defect in Li-Fraumeni syndrome: a mechanism of cancer predisposition? *Oncogene* 14 (1997) 277-282
- Wurm, R.; Burnet, N. G.; Duggal, N.; Yarnold, J. R.; Peacock, J. H.: Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 30 (1994) 625-633
- Xiong, Y.; Hannon, G. J.; Zhang, H.; Casso, D.; Kobayashi, R.; Beach, D.: P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366 (1993) 701-704
- Zhou, P.-K.; Sproston, A. R. M.; Marples, B.; West, C. M. L.; Margison, G. P.; Hendry, J. H.: The radiosensitivity of human fibroblast cell lines correlates with residual levels of DNA double-strand breaks. *Radiotherapy and Oncology* 47 (1997) 271-276
- Zhou, J.; Ahn, J.; Wilson, S. H.; Prives, C.: A role for p53 in base excision repair. *The EMBO Journal* 20 (2001) 914-923

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Jung danke ich dafür, dass er mir an seinem Institut (ehemals Institut für Biophysik und Strahlenbiologie, heute Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie) einen Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Dikomey für die Überlassung des Themas und die freundliche und fördernde Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. I. Brammer bin ich in hohem Maße verpflichtet, weil seine intensive Betreuung von Beginn an bis zur Fertigstellung dieser Dissertation in fachlicher wie menschlicher Hinsicht nicht besser hätte sein können.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Frau B. Riepen und Frau J. Schäfer, die mir bei der Durchführung der Experimente kompetent zur Seite standen und durch persönlichen Zuspruch viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Strahlenbiologie danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.

Ich danke meinen Eltern, ohne die diese Arbeit nicht vorliegen würde.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Mirco Ahrens
Geburtsdatum: 27. August 1975
Geburtsort: Soltau (Niedersachsen)

Schulbildung

1982 – 1986 Grundschule Neuenkirchen
1986 – 1988 Orientierungsstufe Neuenkirchen
1988 – 1995 Gymnasium Soltau
05/1995 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst / Wehrrersatzdienst

10/1994 Befreiung vom Wehrdienst gemäß "Dritter-Sohn-Regelung"

Hochschulbildung

10/1995 – 03/2003 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
09/1997 Ärztliche Vorprüfung
08/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Tätigkeiten (Auswahl)

09/1999 – 10/1999 Famulatur in Innerer Medizin im Tynset Sykehus, Tynset, Norwegen
02/2002 – 06/2002 Praktisches Jahr in Anästhesie am Universitätsspital Zürich, Schweiz

Ärztliche Tätigkeiten

06/2003 – 02/2004 Arzt im Praktikum in der Inneren Abteilung des Klinikums Schwerin
seit 03/2004 Arzt im Praktikum / Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des Westküstenklinikums Heide

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 Werks 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.

Hamburg, 01. April 2005

Mirco Ahrens