

Aus dem Institut für Biophysik und Strahlenbiologie der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. H. Jung

**Nachweis der zellulären Strahlenempfindlichkeit
von humanen Fibroblasten
mit Hilfe der Kometentechnik**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Marc Robert Zoller

aus Johannesburg, Südafrika

Hamburg, 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 02.Okt. 2000

mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Priv. Doz. Dr. E. Dikomey

Korreferent: Prof. Dr. H. Jung

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	Wirkungen der Strahlentherapie	5
1.2	Zelluläre Strahlenempfindlichkeit und Bestrahlungsreaktionen	5
1.3	Testzellen zur Ermittlung der zellulären Strahlenempfindlichkeit	6
1.4	Verfahren zur Messung der zellulären Strahlenempfindlichkeit	6
1.5	Die Kometentechnik	7
1.6	Auswertung von Kometenbildern	8
1.7	Ziele der Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Zellkultur	11
2.2	Bestrahlung	11
2.3	Kolonietest	11
2.4	Kometentechnik	11
2.4.1	<i>Vorbeschichtung der Objektträger</i>	12
2.4.2	<i>Zellproben für Induktionsversuche</i>	12
2.4.3	<i>Zellproben für Reparaturversuche</i>	12
2.4.4	<i>Auftragen der Zellen</i>	13
2.4.5	<i>Lysis</i>	13
2.4.6	<i>Elektrophorese</i>	13
2.4.7	<i>Färbung</i>	13
2.5	Auswertung	13
2.5.1	<i>Aufnahme der Videobilder</i>	14
2.5.2	<i>Digitalisierung der Videobilder</i>	14
2.5.3	<i>Vorbereitung der digitalen Bilder zur Auswertung</i>	14
2.5.4	<i>Aufzeichnungen der Kometenbilder</i>	14
2.5.5	<i>Berechnung</i>	15
2.6	Statistische Auswertung	15
3	RESULTATE	16
3.1	Zelluläre Strahlenempfindlichkeit	16
3.2	Darstellung von DNA-Schäden mit der Kometentechnik	17
3.3	Nachweis von DNA-Schäden mit der Kometentechnik	18
3.4	Erzeugung von DNA-Schäden	21
3.5	Reparatur von DNA-Schäden	23
3.6	"Tail Moment" und zelluläre Strahlenempfindlichkeit	26
3.7	Methodenvergleich	27
4	DISKUSSION	29
4.1	Nachweis von DNA-Schäden	30

4.2	Natur der nachgewiesenen DNA-Schädigung	30
4.3	Initiale DNA-Schädigung	31
4.4	Reparatur der DNA-Schäden	32
4.5	Beziehung zwischen zellulärer Strahlenempfindlichkeit und DNA-Schädigung	33
4.6	Beziehung zwischen Fibroserisiko und DNA-Schädigung	34
4.7	Schlußfolgerung	35
5	LITERATUR	37
6	ZUSAMMENFASSUNG	44
7	DANKSAGUNG	45
8	LEBENS LAUF	47
9	ERKLÄRUNG	48

1 EINLEITUNG

1.1 Wirkungen der Strahlentherapie

Ziel der kurativen Strahlentherapie ist stets die vollständige Zerstörung des Tumors bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes. Die Radikalität des Vorgehens ist hierbei begrenzt durch die verschiedenen Reaktionen des Normalgewebes.

Grundsätzlich können diese Reaktionen eingeteilt werden in frühe und späte Normalgewebsreaktionen. Typische Beispiele einer frühen Reaktion sind das Strahlenerythem, Epithelschäden im Gastrointestinaltrakt, aber auch Knochenmarksnekrosen mit Zytopenien im peripheren Blut. Eine wichtige Spätreaktion und damit ein entscheidender dosislimitierender Faktor einer strahlentherapeutischen Behandlung ist die subkutane Fibrose. Sie kann noch Jahre nach der Bestrahlung auftreten und je nach Ausmaß für Patienten eine Einschränkung der Lebensqualität, aber auch eine lebensbedrohliche Komplikation darstellen. (Turesson 1990). Ein weiteres Beispiel ist das Auftreten schwerer Teleangiectasien in der Haut und den inneren Organen.

Die Art und das Ausmaß einer strahleninduzierten Normalgewebsreaktion kann erheblich von Patient zu Patient variieren (Bentzen und Overgaard 1994). Selbst bei Anwendung standardisierter Dosisschemata ergibt sich eine große Streuung der Reaktionen (Tucker *et al.* 1992, Johansen *et al.* 1996, Turesson *et al.* 1996). So bleiben einige Patienten praktisch beschwerdefrei, während bei anderen schwere Komplikationen auftreten. Dementsprechend werden Strahlentherapieschemata ständig dahingehend optimiert, daß der Prozentsatz schwerer Reaktionen möglichst klein bleibt, typischerweise unter 5 %.

Großes Interesse besteht an einer prädikativen Erkennung von Patienten mit schweren Normalgewebsreaktionen. Bei einer rechtzeitigen Erkennung solcher Patienten könnten die Dosisschemata entsprechend modifiziert werden. Somit wäre ein Schutz vor schweren Normalgewebsreaktionen einerseits und eine optimale Effektivität der Therapie andererseits leichter zu gewährleisten.

1.2 Zelluläre Strahlenempfindlichkeit und Bestrahlungsreaktionen

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die Normalgewebsreaktionen u.a. durch die zelluläre Strahlenempfindlichkeit bestimmt wird. (Burnet *et al.* 1992, Geara *et al.* 1993, Brock *et al.* 1995, Johansen *et al.* 1996). Johansen *et al.* (1996) fanden u.a. eine Korrelation zwischen dem Auftreten subkutaner Fibrose und der im Kolonietest ermittelten zellulären Strahlenempfindlichkeit. Für die Spätreaktion Teleangiectasie sowie die Akutreaktion Hauterythem wurde keine Korrelation mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit beobachtet (Johansen *et al.* 1996).

1.3 Testzellen zur Ermittlung der zellulären Strahlenempfindlichkeit

Zur Bestimmung der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit von Patienten wer-

den sowohl Fibroblasten als auch Lymphozyten genutzt. Beide Zellarten sind experimentell gut zugänglich. Während Lymphozyten leicht aus Vollblut zu isolieren sind, werden Fibroblasten als Hautfibroblasten aus Stanzbiopsien entnommen. In beiden Fällen ist die Belastung der Patienten durch die diagnostische Maßnahme gering. Sowohl Fibroblasten als auch Lymphozyten lassen sich einfach und somit kostengünstig kultivieren. Fibroblasten sind aufwendiger in Kultur zu halten, halten sich jedoch länger als Lymphozyten.

Es wurde gezeigt, daß Fibroblasten als Folge von Bestrahlung zu Fibrozyten ausdifferenzieren und so u.U. mittels gesteigerter Kollagenproduktion eine subkutane Fibrose verursachen können (Rodemann und Bamberg 1994). Insofern erscheinen Fibroblasten zur Untersuchung der Beziehung zwischen subkutaner Fibrose und zellulärer Strahlenempfindlichkeit besonders geeignet.

1.4 Verfahren zur Messung der zellulären Strahlenempfindlichkeit

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit kann zum einen direkt mittels Kolonietest bestimmt werden. Allerdings bringt der Kolonietest eine Reihe von Nachteilen mit sich. Erstens sind für die Durchführung eines solchen Tests viele Zellen vonnöten. Im Mittel rechnet man, daß pro Test etwa 2×10^7 Zellen erforderlich sind. Zweitens ist die Versuchsdauer von Biopsieentnahme bis zum Resultat mit bis zu acht Wochen sehr lang. Oftmals duldet die notwendige Behandlung der Patienten einen solchen Aufschub nicht. Und drittens wird das Ergebnis von einer Reihe von Störfaktoren beeinflusst, die schwer zu kontrollieren sind. Das gewählte Kulturmedium und die Serumkonzentration im Ansatz sind ebenso von Bedeutung wie das technische Können des Untersuchers.

Aus den oben aufgeführten Gründen sind indirekte Verfahren von besonderem Interesse, um die zelluläre Strahlenempfindlichkeit schnell, einfach und zuverlässig reproduzierbar messen zu können. Zur indirekten Messung wurden Chromosomen- (Schwartz 1992, Sasai *et al.* 1994, Borgmann und Dikomey 1997) oder DNA-Schäden (Schwartz *et al.* 1988, Dahm-Daphi *et al.* 1994, Ruiz de Almodovar *et al.* 1994, Wurm *et al.* 1994, Zaffaroni *et al.* 1994, Nunez *et al.* 1995, Kiltie *et al.* 1997, Dikomey *et al.* 1998, Marples *et al.* 1998, Sarkaria *et al.* 1998, Dikomey *et al.* 1999) nach Bestrahlung herangezogen.

Zur Messung von DNA-Schäden werden seit langem die Konstantfeldgelelektrophorese (CFGE) und die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) eingesetzt. Beide Techniken messen ausschließlich Doppelstrangbrüche (DSB). Entscheidender Nachteil ist auch hier die hohe Anzahl benötigter Zellen, in etwa $1-3 \times 10^7$ pro Test.

Abhilfe schafft als Meßverfahren die Kometentechnik. Sie stellt eine Variante der Einzelzellelektrophorese dar und kommt mit sehr geringen Zellzahlen aus. Im Mittel genügen schon etwa 1000 Zellen für einen Test.

Die indirekte Messung der zellulären Strahlenempfindlichkeit wurde bereits in einigen Ar-

Ein weiterer gebräuchlicher Parameter ist das "Tail Moment", welches zur Zeit von vielen Arbeitsgruppen als Maß für DNA-Schädigung verwandt wird. (Olive *et al.* 1990). Bei diesem Verfahren wird zunächst durch die Spiegelung der Kometenvorderkante eine Region als Kometenkopf festgelegt. Voraussetzung hierfür ist eine hypothetische Symmetrie der Kopfregion. Die verbleibende erfaßbare Fläche des Kometenbildes wird als Kometenschweif definiert. Anschließend werden für beide Flächen der jeweilige Punkt des größten Fluoreszenzsignals ermittelt (center of mass, *engl.*: Massenzentrum) und der Abstand dieser beiden Punkte gemessen. Als letzte Größe wird noch der Anteil der Fluoreszenz im Schweif an der Gesamtfluoreszenz des Kometen gemessen. Das Produkt aus dem Abstand der Massenzentren und der Schweiffluoreszenz wird als "Tail Moment" bezeichnet. Ein großer Vorteil dieser Methode gegenüber der bloßen Messung der Kometenlänge ist der wesentlich spätere Eintritt einer Sättigung. Zudem ist das Verfahren mit relativ geringem Aufwand als EDV-Programm zu implementieren. Bei kleinen Dosen bereitet jedoch gelegentlich die rechnerische Trennung von Kopf und Schweif Probleme, da in diesem Fall klare Massenzentren nicht zu erfassen sind.

Aus dieser Überlegung heraus entwickelten Kent *et al.* 1995 eine weitere Methode: das sogenannte "Comet Moment". Es ist bekannt, daß grundsätzlich nur ein Teil der im Zellkern enthaltenen DNA in der Lage ist, im elektrischen Feld zu wandern. Somit befindet sich die größte Menge DNA immer im Zellkern. Ermittelt man den Punkt der höchsten Fluoreszenz in einem Kometenbild, so erhält man die Position des Zellkernes. Diese Position wurde bei der Berechnung des "Comet Moment" zunächst markiert. Eine Feststellung der Kopf-Schweifgrenze wie beim "Tail Moment" war nicht erforderlich. Anschließend wurde in verschiedenen Abständen von dieser Position die Fluoreszenz im Kometenschweif gemessen und mit dem jeweiligen Abstand multipliziert. Die Summe dieser Werte geteilt durch die Gesamtfluoreszenz ergab das "Comet Moment" (Kent *et al.* 1995). Die Meßwerte nahmen linear mit der Dosis zu und zeigten keinerlei Sättigungstendenz im Bereich bis zu 80 Gy (Kent *et al.* 1995).

Trotz der Vorteile des "Comet Moment" hat dieser Parameter bisher wenig Verbreitung in der Literatur gefunden. Um Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen zu erleichtern, wird daher in der vorliegenden Arbeit das "Tail Moment" als Parameter zur Quantifizierung der Kometenbilder verwandt.

1.7 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die von Müller *et al.* (1994) etablierte Modifikation der Kometentechnik zum Nachweis von strahleninduzierten DNA-Schäden zu nutzen. Dabei sollte vor allem überprüft werden, inwieweit die Methode zur Messung der zellulären Strah-

lenempfindlichkeit herangezogen werden kann. Es wurden 5 Normalfibroblastenlinien sowie 2 Zelllinien von Patienten mit *Ataxia teleangiectasia* (AT-Zelllinien) mit der Kometentechnik untersucht.

Die Ziele waren im Einzelnen:

1. Etablierung der Kometentechnik
2. Standardisierung der Technik
3. Erzeugung und Reparatur von DNA-Schäden in 7 humanen Fibroblastenlinien
4. Vergleich der DNA-Schädigung mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit
5. Vergleich der DNA-Schädigung mit dem Risiko einer Normalgewebsreaktion

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellkultur

Die Versuche wurden mit humanen Fibroblasten durchgeführt. Dabei handelte es sich zum einen um Fibroblasten (NF 02, 06, 07, 12), die von Johansen *et al.* (Johansen *et al.* 1996) aus Gewebsbiopsien von Brustkrebspatientinnen gewonnen wurden. Zum anderen wurde eine Fibroblastenkultur eines gesunden Spenders (NFHH) sowie Fibroblastenlinien von Patienten mit dem genetischen Defekt *Ataxia teleangiectasia* (AT2BE, AT3) verwendet. Diese Linien wurden uns freundlicherweise von Dr. C. Lücke-Huhle (AT2BE) bzw. Dr. M. Digweed (AT3) zur Verfügung gestellt.

Die Stammkulturen wurden in 25 cm² Kulturflaschen (Fa. Greiner) unter Verwendung von DMEM-Medium (Fa. Gibco, U.K.) und 15% fetalem Kälberserum (FCS) gehalten. Die Atmosphäre im Brutschrank betrug ca. 5% CO₂ bei 37°C. Die Zellen wurden einmal pro Woche umgesetzt. Zum Abtrypsinieren diente standardisierte 0,25% Trypsinlösung (Fa. Difco, U.K.). Für die Versuche wurden Zellkulturen nach 3 bis 10 Passagen verwandt. Zum Zeitpunkt der Versuche befanden sich die Zellen in der Konfluenz mit mehr als 95% in der G₁-Phase.

2.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte für alle Versuche und Zelllinien an einer technischen Röntgenröhre der Fa. Seifert (Ahrensburg) unter Verwendung eines 0,5 mm Kupferfilters. Es wurde bei 200 kV konstant mit einer Dosisleistung von 2 Gy/min bestrahlt. Die Bestrahlung der Proben erfolgte auf Eis.

2.3 Kolonietest

Die Überlebensrate der Zellen wurde mit Hilfe des Kolonietestes bestimmt. Dazu wurden konfluente Zellen mit Röntgendosen bis 7 Gy bestrahlt und anschließend für 14 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abtrypsiniert, mit einem "Coulter Counter" (Coulter Electronics, Dunstable, UK) gezählt und soweit verdünnt, daß pro Eingabe in eine 60-mm-Petrischale etwa 50 Kolonien mit mehr als 50 Zellen zu erwarten waren. Die Petrischalen wurden bei 37°C 14 Tage im Brutschrank gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit Äthanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Mit Hilfe einer Projektionsvorrichtung (Jung 1978) wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt, die aus mindestens 50 Zellen bestanden. Die Überlebensrate ist das Verhältnis der Anzahl gezählter Kolonien zur Anzahl eingegebener Zellen, wobei jeweils um die Angehänge unbestrahlter Zellen zu korrigieren ist.

2.4 Kometentechnik

Der Nachweis der Strahlenschädigung erfolgte mit einem speziellen Einzelzellgelelektrophoreseverfahren, der sogenannten Kometentechnik. Dabei wurden Zellen in einem Gel der

Elektrophorese ausgesetzt und anschließend einzeln mikroskopisch analysiert.

Die Zellproben wurden in einem Agarosegel auf herkömmliche Objektträger aus Glas aufgebracht. Um ein Abrutschen der Gele im Zuge der folgenden Arbeitsschritte zu verhindern mußten die Objektträger zunächst vorbeschichtet werden.

Die zu untersuchenden Zellen wurden vom Boden der Kulturflasche durch Trypsin abgelöst und zu einer Suspension aufgeschwemmt. Diese Zellsuspension wurde mit flüssiger Agarose vermischt und die vorbereiteten Objektträger damit beschichtet.

Die Zellen wurden zunächst lysiert. Dazu wurden die Präparate als Ganzes in ein Tauchbad mit Lyselösung gestellt. Nach einer anschließenden Spülung wurden die Präparate der Elektrophorese unterzogen. Nach nochmaliger Spülung wurden die Präparate dann in einem Tauchbad gefärbt und ausgewertet.

2.4.1 Vorbeschichtung der Objektträger

Für die Präparation der Objektträger wurden zunächst Lösungen von 0,75% bzw. 0,1% "Low-melting-point"-Agarose (Fa. Bio-Rad, U.S.A.) in calcium- und magnesiumfreiem PBS hergestellt, welche kurz aufgeköcht und anschließend bei 45°C gelagert wurde. Die klaren ("non-frosted") und fettfreien Objektträger erhielten eine Beschichtung mit 0,5 ml 0,1% Agaroselösung. Zum Trocknen der Gelschicht wurden die Objektträger auf eine Wärmeplatte von 45°C gelegt.

2.4.2 Zellproben für Induktionsversuche

Für Versuche zur Induktion von Strahlenschäden wurden die Zellen zunächst vom Flaschenboden abtrypsiniert (s. 2.1 "Zellkultur") und mittels eiskaltem Kulturmedium (ohne Zusatz von fetalem Kälberserum) zu einer Stammsuspension aufgeschwemmt. Ihre Konzentration betrug 30.000/ml Medium. Von dieser Stammlösung wurden je 0,5 ml in sterile Reagenzgläser verbracht und bestrahlt.

2.4.3 Zellproben für Reparaturversuche

Für Reparaturversuche wurden die betreffenden Zellen in der Kulturflasche bestrahlt und anschließend für die vorgesehene Reparaturdauer bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden aus dem Monolayer abtrypsiniert (s. „Zellkulturen,“) und in Portionen zu 0,5 ml in sterile Reagenzgläser verbracht. Zur Vermeidung einer weiteren Reparatur wurden die Reagenzgläser auf Eis gekühlt.

2.4.4 *Auftragen der Zellen*

Von den eisgekühlten Zellproben wurden je 0,1 ml mit 0,5 ml der auf 45°C vorgewärmten 0,75% Agaroselösung vermischt. Hierbei wurde auf grobe mechanische Manipulation verzichtet, um eine Zellschädigung durch auftretende Scherkräfte zu vermeiden. Anschließend erhielten die Objektträger eine gleichmäßige Beschichtung mit diesem Gemisch, welches auf Eis zum Gelieren gebracht wurde.

2.4.5 *Lysis*

Für die Lysis wurden die Objektträger aufrechtstehend in eine Lysislösung eingebracht. Die verwendete Lysislösung enthielt 87 mM Natrium-dodecyl-sulfat (SDS, Cat.-Nr. L4509, Fa. Sigma, U.S.A.), 34 mM Lauroyl-sarcosin (NLS, Cat.-Nr. L5125, Fa. Sigma, U.S.A.) und 25 mM EDTA je Liter sterilem Aqua bidest.. Die Lösung wurde nach der Herstellung autoklaviert. Der pH der Lyselösung betrug 9,5. Dort verblieben die Zellen bei 18°C für 15 Minuten. Sofort im Anschluß erfolgte eine Spülung der Träger bei ebenfalls 18°C in sterilem Aqua bidest. für mindestens 10 Minuten.

2.4.6 *Elektrophorese*

Die Elektrophorese wurde für alle Objektträger eines Versuches gleichzeitig im Konstantfeld durchgeführt (Kammer: Horizon 20-25®, Fa. BRL, U.S.A.). Die angelegte Spannung betrug 2,5 V/cm, die Stromstärke 16 mA. Die Spannung wurde für eine Dauer von 4 min angelegt. Die verwendete Pufferlösung bestand aus 117 mM Tris-borat-EDTA (Tris, Cat.-Nr. T7527, Fa. Sigma, U.S.A.), 91 mM Borat und 2,5 mM EDTA je Liter sterilem Aqua bidest.. Nach der Herstellung wurde die Lösung autoklaviert. Der pH betrug 8,4, die Temperatur 10°C.

Um eine weitere Reaktion der Lysislösung mit den Zellen im Gel zu verhindern, wurden die Objektträger noch einmal in sterilem Aqua bidest. bei 4°C gespült.

2.4.7 *Färbung*

Die Färbung wurde im Färbegrad mittels Propidiumjodidlösung (25 µM) für 30 Minuten bei 6°C durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer unter Lichtabschluß bei 6°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag.

2.5 *Auswertung*

Zur Auswertung wurden die gefärbten Präparate zunächst unter dem Mikroskop betrachtet. Der verwendete Farbstoff Propidiumjodid emittiert bei Anregung mit Strahlung im UV-Bereich sichtbares Licht. Nach Anregung wurde mittels eines Filters das vom Farbstoff emittierte Licht isoliert und mit einer Videokamera aufgenommen.

Anschließend wurden die so gewonnenen Videobilder im Computer digitalisiert. Mehrere Störgrößen machten jedoch eine Vorbereitung der Videobilder erforderlich. Darüberhinaus mußte eine immer vorhandene Eigenfluoreszenz des Gels ermittelt und von den aufzunehmenden Kometenbildern abgezogen werden. Zum anderen mußten Ungleichmäßigkeiten in der Beleuchtung der Präparate ausgeglichen werden.

Nach erfolgter Voreinstellung konnten nun die eigentlichen Kometen aufgenommen werden. Vereinzelt auftretende Apoptosen und andere atypische Zellbilder wurden nicht aufgenommen. Die fertigen Kometenbilder wurden gespeichert und von spezieller Software auf verschiedene Parameter hin vermessen.

2.5.1 Aufnahme der Videobilder

Für die Aufnahme der Einzelzellbilder (Kometen) wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Photomikroskop III®, Fa. Zeiss, Oberkochen) im Auflichtverfahren eingesetzt. Beleuchtet wurde mit UV-Licht zwischen 510 und 560 nm Wellenlänge aus einer Quecksilberdampf Lampe HBO 100 W/2® (Fa. Zeiss, Oberkochen). Weiter kamen in der optischen Apparatur ein Farbteiler mit einer Trennwellenlänge von 580 nm und ein Sperrfilter von 590 nm Sperrwellenlänge zur Anwendung. Für die Aufnahme der Proben wurde eine CCD-Kamera Kappa CF 15-4 MC® (Fa. Kappa Meßtechnik, Gleichen) verwendet.

2.5.2 Digitalisierung der Videobilder

Mittels eines Framegrabbers wurden die Kometenbilder digitalisiert. Anschließend konnten sie von einem bildanalytischen Auswerteprogramm (Fa. OPTIMAS, U.S.A.) berechnet werden.

2.5.3 Vorbereitung der digitalen Bilder zur Auswertung

Die endgültige Bildaufarbeitung und -auswertung wurde mit einem OPTIMAS®-Makroprogramm (Comet Macro, Charles Kent, Fa. OPTIMAS, U.S.A.) durchgeführt. Zunächst wurde ein Leerbild ohne Beleuchtung und eines mit Beleuchtung aufgenommen. Mittels dieser Aufnahmen konnte die Hintergrundfluoreszenz berechnet und von den Kometenbildern abgezogen, sowie Beleuchtungsunregelmäßigkeiten kompensiert werden ("Shading Korrektur"). Bei lokaler Schwankung des Untergrundes innerhalb der Präparate wurde der Untergrundabzug ggf. manuell nachkorrigiert.

2.5.4 Aufzeichnungen der Kometenbilder

Je Dosis wurden bis zu zehn Kometen willkürlich ausgewählt. Sie wurden mit einer Belichtungszeit von 20 Sekunden aufgenommen. Nach dem automatischen Abzug der Hintergrundfluoreszenz wurde die Helligkeit ggf. noch einmal manuell nachkorrigiert, um den auf-

genommenen Umriß auf den mit dem bloßen Auge sichtbaren Kometen zu begrenzen.

2.5.5 Berechnung

Die aufgenommenen Kometenbilder wurden zunächst gespeichert. Die oben genannte Software berechnete für jedes Bild den Parameter "Tail Moment" sowie die Gesamtfluoreszenz. Die Berechnung des "Tail Moment" erfolgte anhand eines gängigen Schemas: Mittels einer Intensitätsschwelle wurde der Bereich der höchsten Signalintensität des gesamten Kometenbildes eingegrenzt (Center of Mass_{Head}). Dieser Bereich lag immer im Zellkern, so daß der Kometenkopf sicher erkannt wurde. Unter Annahme der Symmetrie dieses Bezirkes wurde so ein rechnerisches Kopfareal festgelegt. Über die Begrenzung dieses Areals hinausgewanderte DNA wird als Kometenschweif definiert. Innerhalb dieses Schweifes wurde ebenfalls der Bereich mit der höchsten Signalintensität festgelegt (Center of Mass_{Tail}). "Tail Moment" ist definiert als das Produkt aus dem Anteil der Schweiffluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz und der Distanz zwischen den beiden Centers of Mass. Kometen mit einem "Tail Moment" < 0 sowie solche mit einem "Tail Moment" > 60 wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Im Falle eines negativen "Tail Moment" handelt es sich um Bildasymmetrien, die von der Software nicht erkannt wurden.

2.6 Statistische Auswertung

Für jeden Versuch wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Aus den Einzelwerten wurde der Mittelwert berechnet und als Fehler der Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die Regressionsanalyse erfolgte mit dem Rechenprogramm "GraphPad Prisma" der Firma GraphPad Software (U.S.A.)

3 RESULTATE

3.1 Zelluläre Strahlenempfindlichkeit

Abb.1 zeigt die zelluläre Strahlenempfindlichkeit der sieben untersuchten Zelllinien. Die Zellen wurden in Konfluenz bestrahlt, 14 Stunden später abtrypsiniert und dann für den Kolonietest ausplattiert ("delayed plating"). Die Linie NFHH sowie die Hautfibroblasten aus Patientenbiopsien (NF02, NF06, NF07 und NF12) zeigten ein typisches Spektrum zellulärer Strahlenempfindlichkeiten für normale humane Fibroblasten. Auffallend niedrig waren die Überlebensraten der Zelllinien AT3 und AT2BE. Diese Zellen stammten von Patienten mit Ataxia teleangiectasia und zeichneten sich durch eine genetisch bedingte hohe Strahlenempfindlichkeit aus. Die Kurven wurden jeweils mit der Gleichung $-\ln S = \alpha D + \beta D^2$ gefittet, wobei S die Überlebensrate bezeichnet und D die Bestrahlungsdosis. Aus dem Fit wurde die Überlebensrate nach 2 Gy berechnet, wie sie in Tab. 1 aufgeführt ist (Kurven nicht gezeigt).

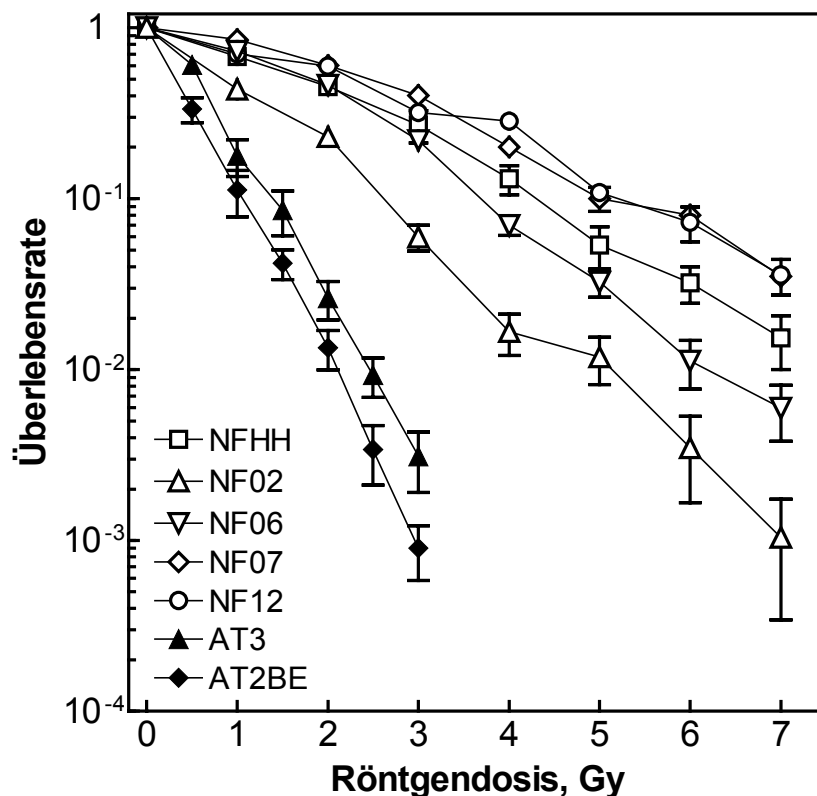


Abb. 1: Zelluläre Strahlenempfindlichkeit von humanen Fibroblasten. Konfluente Kulturen wurden bei 0°C mit Dosen bis zu 7 Gy bestrahlt, anschließend für weitere 14 h bei 37°C inkubiert und dann für den Kolonietest abtrypsiniert und ausplattiert. NF02, NF06, NF07, NF12: Fibroblasten von Brustkrebspatientinnen; NFHH: Fibroblasten eines gesunden Spenders; AT3, AT2BE: Fibroblasten von Ataxia-teleangiectasia-Patienten.

Tabelle 1: Parameter der zellulären Strahlenempfindlichkeit und der DNA-Schädigung

Zelllinie	Angehrate ^a	SF2 ^b	ID5 ^c	RD2 (AUC) ^d
NFHH	0.12	0.408 ±0.021	3.48 ±0.32	54.5
NF02	0.07	0.154 ±0.026	3.58 ±0.70	31.9
NF06	0.09	0.352 ±0.016	2.89 ±0.13	54.7
NF07	0.23	0.530 ±0.017	2.65 ±0.31	51.3
NF12	0.16	0.527 ±0.036	2.86 ±0.23	36.5
AT3	0.06	0.026 ±0.007	4.54 ±0.55	66.1
AT2BE	0.08	0.013 ±0.004	4.56 ±0.39	57.2

^a Angehrate der Zellen.

^b Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy.

^c Initiale Schädigung nach Bestrahlung mit 5 Gy berechnet aus dem mittleren "Tail Moment" nach 5 Gy und Normierung auf das mittlere "Tail Moment" der unbestrahlten Zellen.

^d Reparatur nach Bestrahlung mit 2 Gy ausgedrückt als Fläche unter der Reparaturkurve.

3.2 Darstellung von DNA-Schäden mit der Kometentechnik

Abb.2 zeigt Kometen, wie sie für eine unbestrahlte Zelle sowie nach Bestrahlung mit Dosen von 0, 1, 2, und 5 Gy gemessen wurden. Im Falle der unbestrahlten Zelle (0 Gy) imponierte ein kleiner heller Zentralbezirk, umgeben von einem schmalen, annähernd symmetrischen Hof. Da kein Strahlenschaden vorlag, trat in der Elektrophorese nahezu keine DNA aus dem Kern aus. Folglich war eine Formveränderung des Zellumrisses durch das elektrische Feld kaum gegeben.

Nach Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy waren bereits aus dem Zellkern ausgetretene Teile der DNA erkennbar. Diese DNA ordnete sich im elektrischen Feld in der Form eines Kometenschweifes an, die der Methode ihren Namen gab.

Bei Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy war eine weitere Zunahme des Schweifbezirkes zu erkennen. Seine Länge entsprach in etwa dem eineinhalbfachen Durchmesser des Zellkerns. Zudem war eine höhere Signalintensität im Bereich des Schweifes zu erkennen, was einem weiteren Austritt von DNA aus dem Zellkern entsprach.

Bei einer Röntgendosis von 5 Gy stellte sich keine weitere Längenzunahme des Kometenschweifes ein. Die Menge der DNA im Schweifbereich war geringfügig größer als nach einer Dosis von 2 Gy, was der helle Zentralbezirk im Schweif deutlich machte. In keinem Fall beobachtete man eine Trennung des Kometenschweifes vom Zellkern.

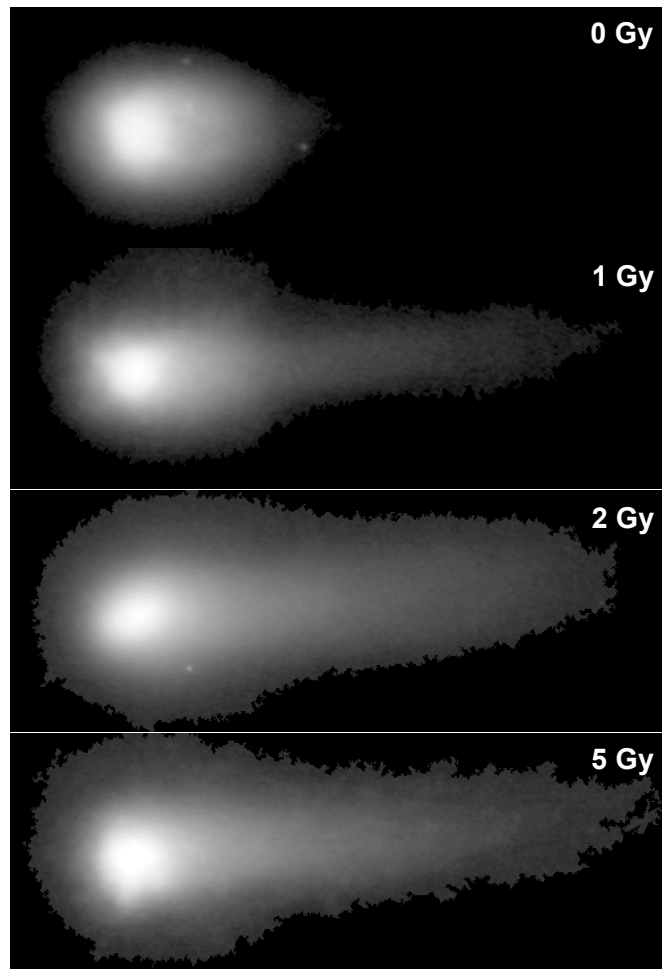


Abb. 2: Kometen von unbestrahlten Fibroblasten sowie nach Bestrahlung mit Dosen von 1, 2 und 5 Gy

3.3 Nachweis von DNA-Schäden mit der Kometentechnik

Abb.3 zeigt den Nachweis von DNA-Schäden für die Linie NFHH. Unbestrahlte sowie mit Dosen zwischen 0,5 und 5 Gy bestrahlte Zellen wurden entsprechend dem Versuchsprotokoll für die Erzeugung von DNA-Schäden aufgearbeitet (s. Kap. 2).

Die Wanderungstrecke sowie die Intensität der aus den Zellkernen ausgetretenen DNA wurde als "Tail Moment" (s. Kap. 2) quantifiziert und gegen die Bestrahlungsdosis aufgetragen. In Abb.3A ist die Streuung der Einzelwerte dargestellt, wo bei jeder Punkt das "Tail Moment" eines gemessenen Kometen darstellt. In der Regel wurden in jedem versuch zehn Kometen pro Dosis ausgewertet, von denen jene verworfen wurden, die bestimmte Ausschlußkriterien erfüllten (s. Kap. 2). Das "Tail Moment" zeigte selbst bei gleicher Dosis eine beachtliche Streuung. So lagen die Werte bei 0 Gy zwischen 8 und 18, bei 2 Gy etwa zwischen 30 und 55.

Abb.3B zeigt die Mittelwerte des gemessenen "Tail Moment" als Funktion der Strahlendosis. In einem Dosisbereich von 0 bis 2 Gy zeigte sich eine deutliche Zunahme der Werte. Zwischen 2 und 5 Gy fielen die Werte wieder leicht ab.

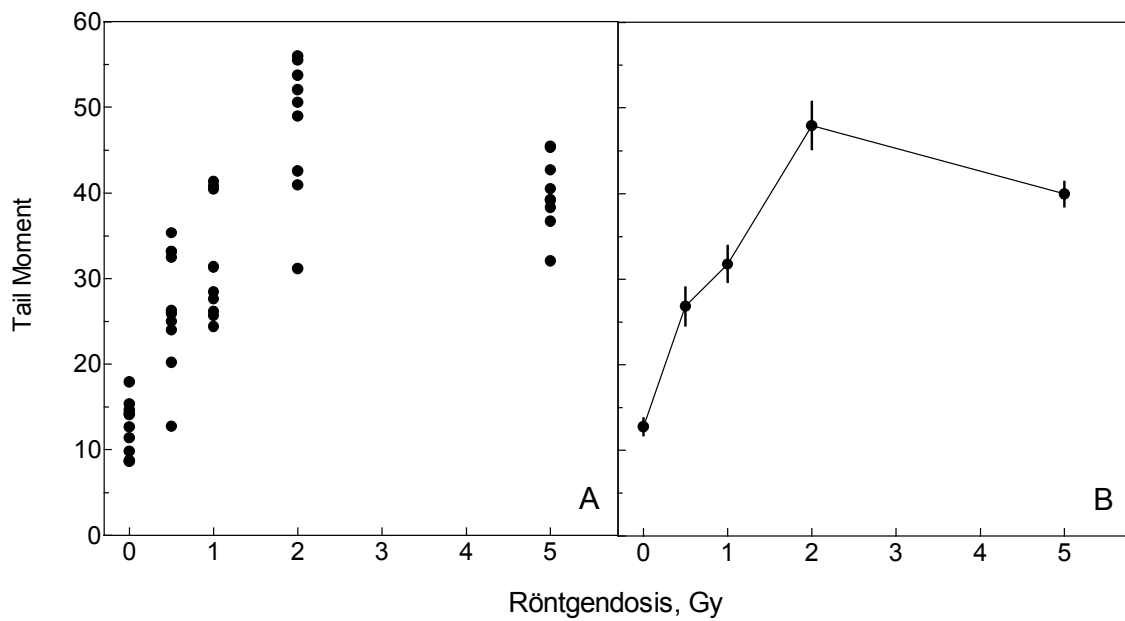


Abb.3: Initiales "Tail Moment" für die Fibroblastenlinie NFHH nach Bestrahlung mit Dosen bis zu 5 Gy für einen Versuch. A, Einzelwerte; B, Mittelwerte mit Standardfehler. Zellen wurden in der Plateauphase bestrahlt und unmittelbar danach für die Kometentechnik präpariert.

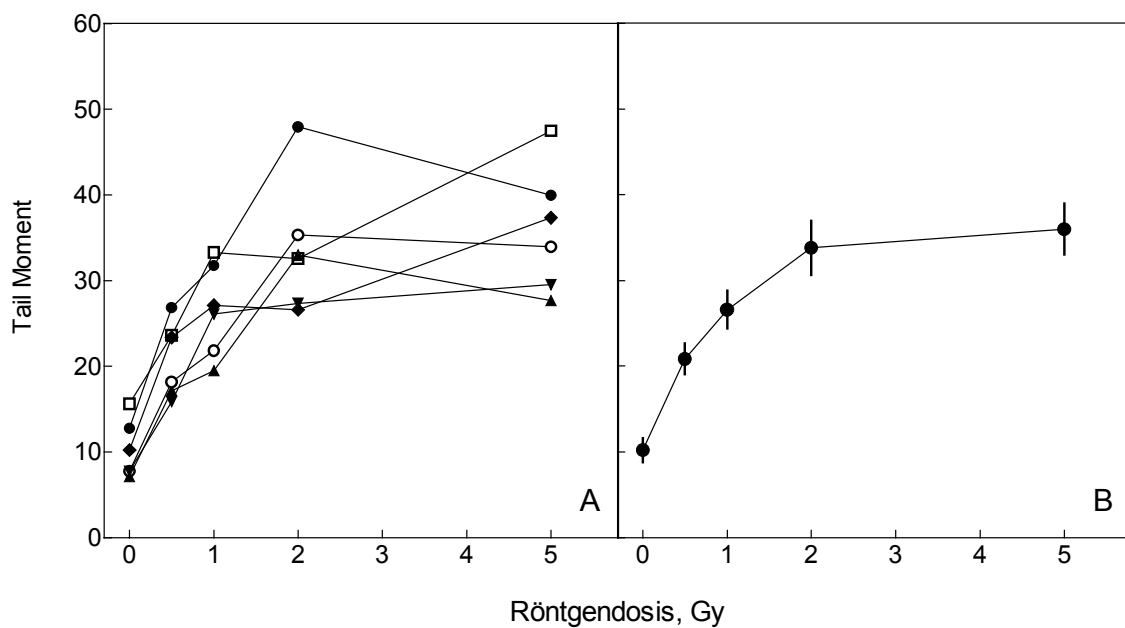


Abb.4: Initiales "Tail Moment" für die Fibroblastenlinie NFHH nach Bestrahlung mit Dosen bis zu 5 Gy. A, Mittelwerte für unabhängige Versuche; B, Mittelwerte mit Standardfehler für alle Versuche. Zellen wurden in der Plateauphase bestrahlt und unmittelbar danach für die Kometentechnik präpariert.

Abb.4A zeigt die Variation der Erzeugungskurven für 6 verschiedene Versuche mit HHNF. Die einzelnen Versuche wurden an verschiedenen Tagen durchgeführt. Bei unbestrahlten Zellen lagen die Mittelwerte zwischen 8 und 15. Für mit 2 Gy bestrahlte Zellen streuten die Werte in etwa zwischen 25 und 50. Die einzelnen Kurven entsprachen in ihrer Dynamik der in Abb.3B gezeigten. Wie oben bereits beschrieben entsprach ein Meßpunkt in der Regel zehn ausgewerteten Einzelkometen. Die Streuung war auch hier so hoch, daß sich zwischen den einzelnen Messungen beachtliche Unterschiede ergaben. Eine Messung mit nur zehn Einzelkometen pro Meßpunkt war also im Hinblick auf eine Beurteilung der Strahlenempfindlichkeit nicht aussagekräftig.

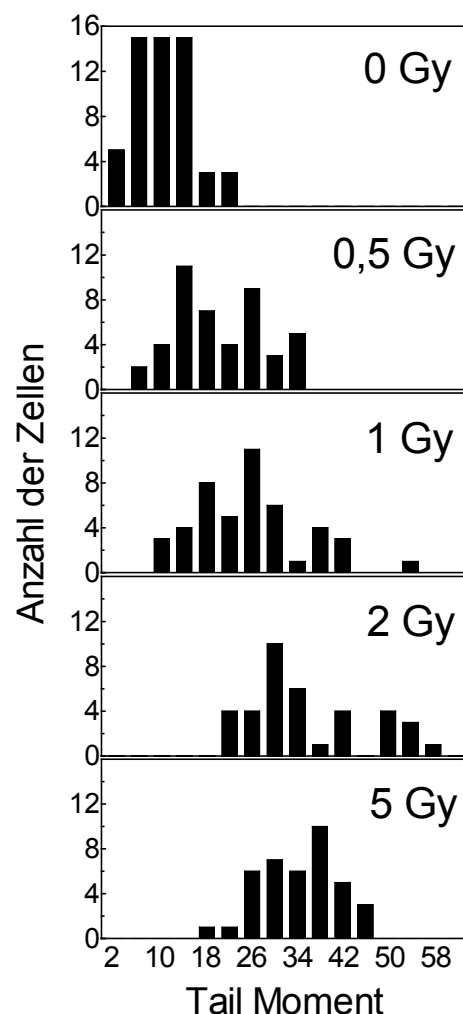


Abb.5: Häufigkeitsverteilungen der initialen "Tail Moment"-Werte. Für unbestrahlte Zellen sowie für die Bestrahlungsdosen 0,5, 1, 2 und 5 Gy ist die Häufigkeit der "Tail Moment"-Werte als Balkendiagramm aufgetragen.

Abb.5 zeigt die Häufigkeitsverteilung der einzelnen "Tail Moment"-Werte aller sechs Messungen. Aufgetragen ist die Anzahl der Zellen pro "Tail Moment"-Wert. Es ergab sich eine grobe Normalverteilung der Meßwerte für jede Bestrahlungsdosis. Somit war bei einer Messung von mehr als 60 Zellen pro Dosis eine zuverlässige Wiedergabe der biologischen

Streuung gegeben. Der Mittelwert dieser Normalverteilung ist ein effektives Maß für das "Tail Moment" einer Zelllinie in der Kometentechnik. Daher wurden im folgenden für alle Zelllinien zwischen 60 und 80 Zellen pro Meßpunkt untersucht.

Während der Mittelwert bei unbestrahlten Zellen bei 10 lag, betrug er nach einer Dosis von 2 Gy 32 und nach einer Dosis von 5 Gy 35. Somit ergab sich insgesamt mit steigender Dosis ein deutlich zunehmendes "Tail Moment".

Abb.4B zeigt diese Mittelwerte als Funktion der Dosis. Hier ist noch deutlicher als bei den Einzelmessungen die Kinetik der Meßwerte erkennbar: Während bis zu einer Dosis von 2 Gy das "Tail Moment" zunahm, war bei einer Dosis von 5 Gy keine weitere Steigerung zu beobachten. Somit ergab sich ein effektiver Meßbereich von in etwa dem dreieinhalbfachen des Wertes unbestrahlter Zellen.

3.4 Erzeugung von DNA-Schäden

Abb.6 zeigt den Nachweis von DNA-Schäden mit der Kometentechnik für die sieben

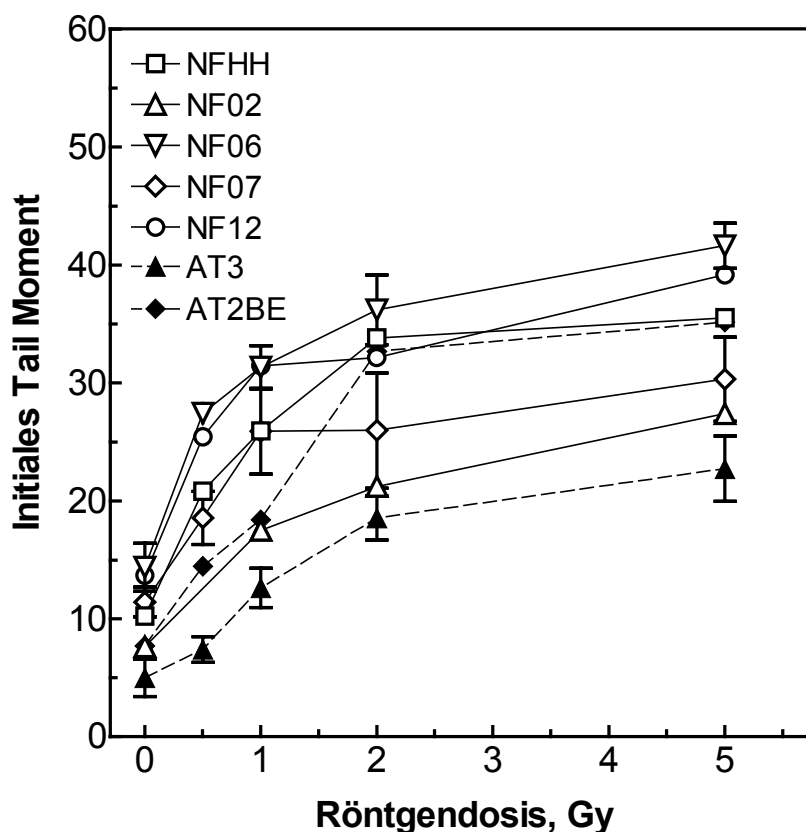


Abb.6: Initiales "Tail Moment" nach Bestrahlung mit Dosen bis zu 5 Gy für humane Fibroblastenlinien. Zellen wurden in der Plateauphase bestrahlt und unmittelbar danach für die Kometentechnik präpariert. NF02, NF06, NF07, NF12: Fibroblasten von Brustkrebspatientinnen; NFHH: Fibroblasten eines gesunden Spenders; AT3, AT2BE: Fibroblasten von Ataxia-Teleangiectasia-Patienten.

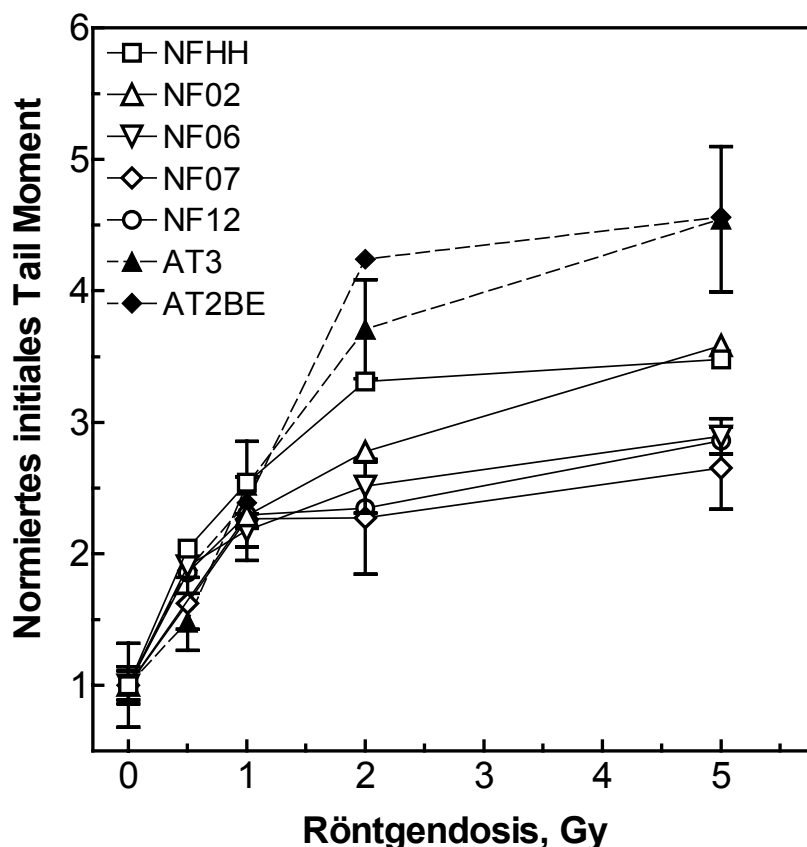
ausgewählten Zelllinien. Für jede Zelllinie wurden pro Dosis 60 bis 80 Einzelmessungen

durchgeführt. Diese Einzelmessungen wurden an verschiedenen Tagen durchgeführt (s. Kap. 2). Der Verlauf der Kurven für die einzelnen Zelllinien entsprach im wesentlichen dem in Abb.4B für die Linie NFHH dargestellten Verlauf: Von einem Grundniveau der unbestrahlten Zellen stiegen mit Zunahme der Dosis die Meßwerte an, um sich jenseits von 2 Gy einem Sättigungswert anzunähern.

Wie die für einige Zelllinien beispielhaft gezeigten Fehlerbalken deutlich machen, waren die intraindividuellen Schwankungen des "Tail Moment" auch hier beachtlich. Die abgebildeten deutlichen interindividuellen Unterschiede sind als biologisch begründet zu werten.

Auffällig war das stark variierende Niveau der Werte unbestrahlter Zellen. Im Falle der Linie AT3 ergab sich für unbestrahlte Zellen ein Wert von 5, für NFHH lag er bei 10. NF02 erreichten sogar einen Wert von fast 15. Die dosisabhängige Zunahme der Meßwerte nach Bestrahlung zeigte ebenfalls Unterschiede: Bei der Zelllinie AT3 stiegen die Meßwerte bis zu

Abb.7: Relatives initiales "Tail Moment" nach Bestrahlung mit Dosen bis zu 5 Gy für humane Fi-



broblastenlinien. "Tail-Moment"-Werte aus Abb.5 nach Normierung auf das jeweilige "Tail-Moment" der unbestrahlten Zellen. NF02, NF06, NF07, NF12: Fibroblasten von Brustkrebspatientinnen; NFHH: Fibroblasten eines gesunden Spenders; AT3, AT2BE: Fibroblasten von Ataxia-Teleangiectasia-Patienten. Fehlerbalken sind nur exemplarisch gezeigt.

eine Dosis von 5 Gy um den Faktor 4,54, bei NFHH um den Faktor 3,48 und schließlich bei NF02 um den Faktor 3,58 (s.a. Tab. 1).

Da somit die Zunahme der Meßwerte mit der Dosis für die einzelnen Zelllinien sehr verschieden war, die Variation der Ausgangsniveaus aber eine Beurteilung dieser Unterschiede erschwerte, wurden die Meßwerte auf den Anfangswert normiert.

Abb.7 zeigt den relativen Anstieg des initialen DNA-Schadens als Funktion der Dosis. Die Meßwerte für unbestrahlte Zellen wurden dabei auf 1 gesetzt. Bis zu einer Dosis von 1 Gy zeigten die Meßwerte der einzelnen Zelllinien sehr ähnliche Verläufe. Nach Bestrahlung mit 1 Gy ergab sich z.B. ein Anstieg um das 2,2-fache des Ausgangswertes für NF02 und um das 2,5-fache für AT3.

Ab einer Dosis von 2 Gy wurden jedoch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien sichtbar. Nach einer Dosis von 2 Gy erreichten die beiden AT-Zelllinien eine relative Zunahme von 3,71 bzw. 4,24.

NF06 zeigten eine relative Zunahme von 2,51. Die Werte der anderen Zelllinien lagen zwischen 2,27 (NF07) und 2,78 (NF02). Nach einer Dosis von 5 Gy waren die Unterschiede noch deutlicher. Die Linien AT3 und AT2BE erreichten einen Wert von 4,6. Deutlich niedriger lagen die Meßwerte für NF02 mit 3,58 und NFHH mit 3,48. Die übrigen Zelllinien lagen zwischen 2,7 und 2,9. In Tabelle 1 sind die Werte, wie sie für die Dosis von 5 Gy errechnet wurden, zusammengetragen

3.5 Reparatur von DNA-Schäden

Die Reparatur der DNA-Schäden wurde nach 2 Gy untersucht (s. Kap. 2.4). Abb 8B zeigt eine mit der Kometentechnik erstellte Reparaturkinetik. Aufgetragen ist das "Tail Moment" zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung. Unmittelbar nach Bestrahlung waren die Werte am größten. Mit zunehmender Zeit gingen sie stetig zurück. Nach 120 min näherten sich die Werte den Untergrundwerten unbestrahlter Zellen.

Um zu standardisierten Reparaturkinetiken zu gelangen, wurde das gemessene "Tail Moment" in Dosis-Äquivalente (Gy_{eq}) umgewandelt. Hierzu diente die korrespondierende Erzeugungskinetik der jeweiligen Zelllinie (Abb.8A). Ein im Reparaturversuch nach 15 min gemessenes "Tail Moment" von 25 ergab z.B., wie in der Abbildung beschrieben, ein Dosis-Äquivalent von 1,15 Gy_{eq} . Damit wurden zum einen Abweichungen von der Linearität berücksichtigt. Zum anderen wurde der Untergrund abgezogen und systematische Unterschiede im Endniveau korrigiert, die sich von Versuch zu Versuch zeigten. Abb.8C zeigt die resultierende Reparaturkinetik. Die Kurve begann *per definitionem* mit einem Wert von 2 Gy_{eq} und fiel stetig bis auf annähernd 0 Gy_{eq} nach 120 min ab.

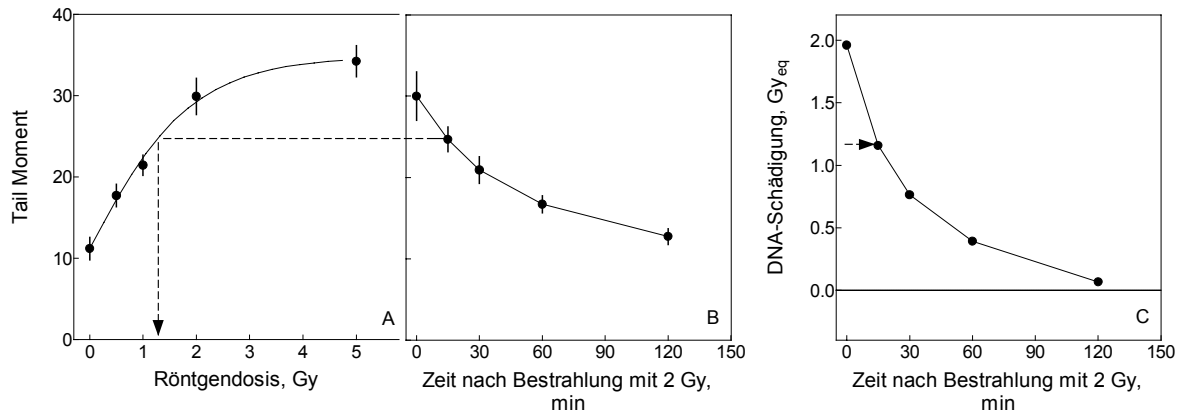


Abb 8: Berechnung von Gy-Äquivalenten zur Standardisierung der Reparaturkurven am Beispiel der Zelllinie NFHH. Zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung mit 2 Gy wurden die Zellen für die Kometentechnik präpariert. Das "Tail Moment" nach Reparatur wurde mittels des initialen "Tail Moment" in Gy-Äquivalentwerte umgerechnet. A, Initiales "Tail Moment"; B, "Tail Moment" nach Reparatur; C, Gy-Äquivalentwerte nach Umrechnung.

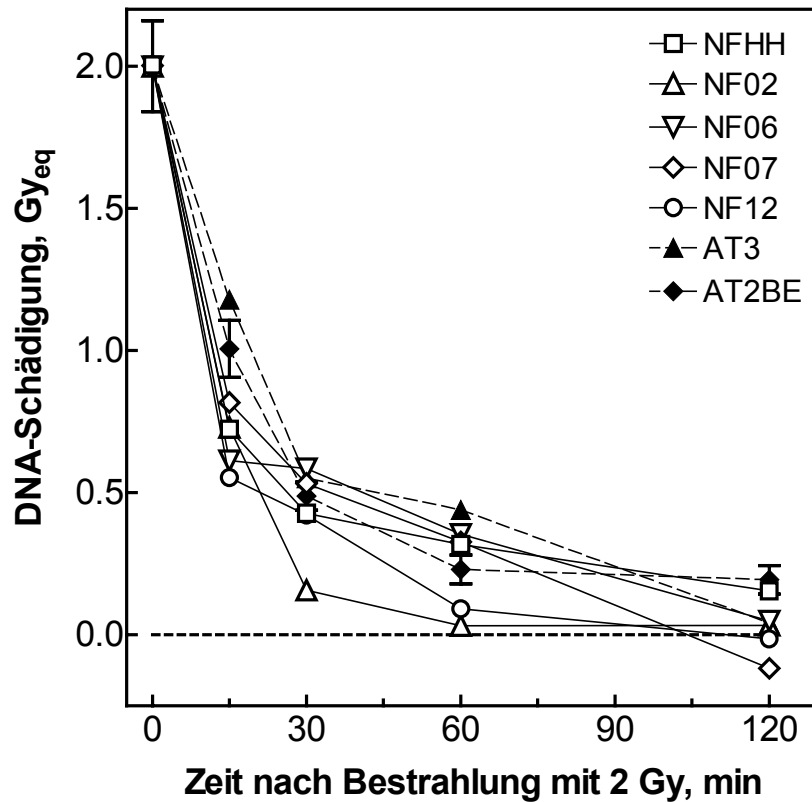


Abb.9: Reparatur nach Bestrahlung mit 2 Gy in humanen Fibroblastenlinien. Zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung mit 2 Gy wurden die Zellen für die Kometentechnik präpariert; das "Tail Moment" nach Reparatur wurde umgewandelt in Gy-Äquivalentwerte mittels der entsprechenden initialen "Tail Moment"-Werte (siehe Abb.8). NF02, NF06, NF07, NF12: Fibroblasten von Brustkrebspatientinnen; NFHH: Fibroblasten eines gesunden Spenders; AT3, AT2BE: Fibroblasten von Ataxia-teleangiectasia-Patienten.

Abb.9 zeigt die Reparaturkinetiken für alle untersuchten Normalfibroblasten sowie für die untersuchten AT-Linien. Alle Kurven zeigten einen ähnlichen Verlauf. Beginnend mit einem DNA-Schaden von 2 Gy sank dieser Schaden mit zunehmender Zeit ab. Er erreichte nach 30 min in etwa ein Viertel des Initialschadens. Nach 120 min war in der Regel das Niveau unbestrahlter Zellen erreicht. Für NF07 und NF12 lagen die Meßwerte geringfügig unter den in der Erzeugung ermittelten Werten für unbestrahlte Zellen. Daher lagen die Werte unter 0 Gy_{eq}. Angesichts der starken Streuung der Einzelwerte ließen sich Unterschiede im Endniveau nicht sicher nachweisen.

Hinsichtlich der Kinetik deutete sich für NF02 im Bereich ab 15 min nach Bestrahlung eine schnellere Reparatur als für die anderen Linien an. Die AT-Linien lagen bei 15 min etwas höher als die Normalfibroblasten. Ab einer Reparaturdauer von mehr als 30 min ließen sich jedoch keine Unterschiede mehr feststellen.

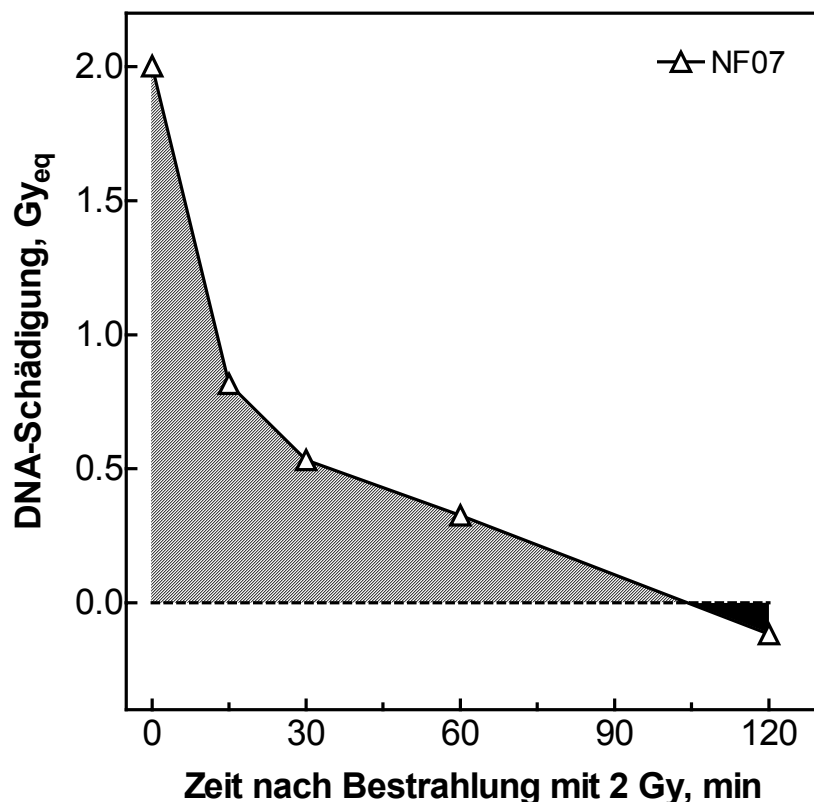


Abb.10: Berechnung der Reparaturkapazität einer Fibroblastenlinie mittels der Fläche unter der Reparaturkurve (engl. "Area Under the Curve", AUC). Fläche oberhalb der Kontrolllinie wurde addiert, Fläche darunter subtrahiert.

Zur Quantifizierung der Reparaturkinetiken wurde aus den Werten die Fläche unter der Kurve (engl. Area under the Curve, AUC) bestimmt, wie sie in Tab.1 (letzte Spalte) aufgelistet wird. Abb.10 zeigt am Beispiel der Reparaturkinetik der Linie NF07 die Berechnung der Fläche unter der Kurve. Die AUC diente hier als Maß für die Effektivität der zellulären Repa-

ratur. Sowohl die Reparaturgeschwindigkeit als auch das erreichte Endniveau fanden hier Berücksichtigung. Reparaturendwerte von unter 0 Gy_{eq} wie im Beispiel ergaben negative Flächenwerte, die von der ermittelten Gesamt-AUC abzuziehen waren.

Man findet, daß die beiden AT-Zelllinien mit 66,1 bzw. 57,2 (AT3 bzw. AT2BE) deutlich höhere Werte lieferten als die im Vergleich gemessenen NF mit 54,5. Unter den Normalfibroblastenlinien war eine breite Streuung der AUC erkennbar: Während NF02 mit 31,9 die niedrigsten Werte ergab, lieferte z.B. die Linie NF06 mit 54,7 deutlich höhere Werte.

3.6 "Tail Moment" und zelluläre Strahlenempfindlichkeit

Abb.11 zeigt den Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung und der zellulären Strahlenempfindlichkeit. Zum einen wurde der initiale Schaden, ID₅, (Abb.11A) und zum anderen die Reparaturfähigkeit der Zellen, AUC, (Abb.11B) gegen die Überlebensrate nach 2 Gy, (SF_{2Gy}), aufgetragen. Für die initiale Schädigung fand sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem zellulären Überleben ($r^2 = 0,86$, $p = 0,0024$). Zelllinien, die im Kolonietest eine hohe zelluläre Strahlenempfindlichkeit zeigten, lieferten auch in Messungen mit der Kometentechnik hohe Meßwerte. Umgekehrt galt, daß Zellen mit einer niedrigen zellulären Strahlenempfindlichkeit auch in der Kometentechnik niedrige Werte aufwiesen.

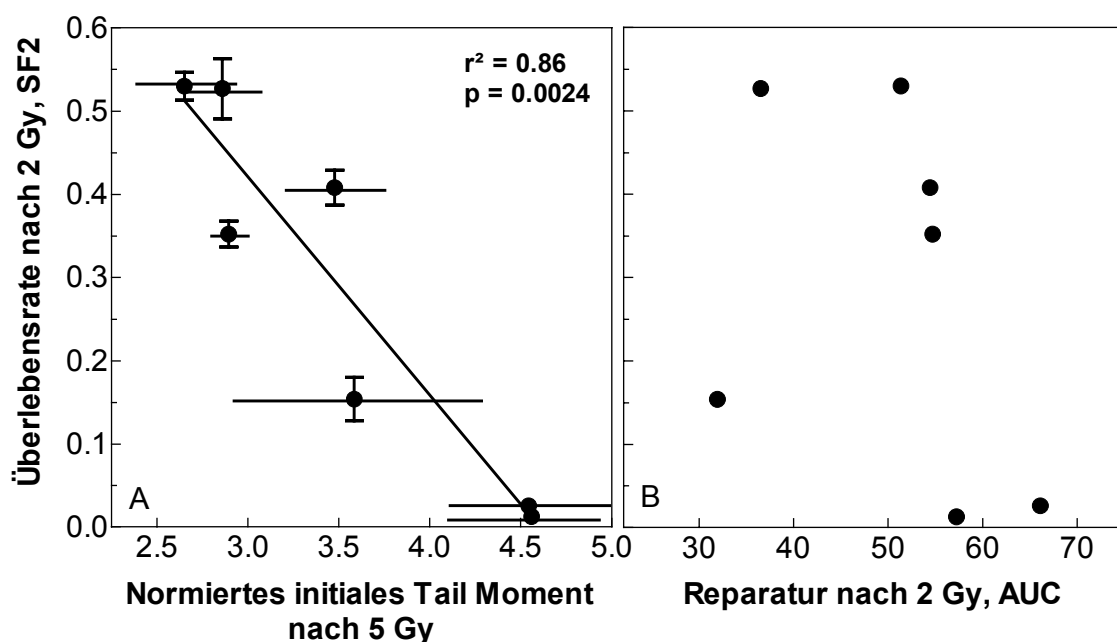


Abb.11: Beziehung zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit und der DNA-Schädigung bei Nachweis mittels der Kometentechnik für humane Fibroblasten. Die Überlebensrate nach 2 Gy, SF₂, aus Abb.1/Tab.1 wurde aufgetragen zum einen (A) gegen das relative initiale "Tail Moment" nach 5 Gy, ID₅, aus Abb.7/Tab.1 bzw. (B) gegen die Reparaturkapazität nach Bestrahlung mit 2 Gy, AUC, aus Abb.9/Tab.1.

3.7 Methodenvergleich

Um das zelluläre Schadenskorrelat der mit der Kometentechnik gemessenen Werte zu ermitteln, wurden die Meßergebnisse mit denen bereits etablierter Methoden verglichen. Abb.12 zeigt verschieden erfaßte Reparaturkinetiken für NFHH im Vergleich. Der Logarithmus des relativen DNA-Schadens ist gegen die Reparaturdauer aufgetragen. Der initiale DNA-Schaden wurde jeweils auf eins normiert. Die drei Kurven zeigen Messungen mit der Kometentechnik, Doppelstrangbrüche (DSB, gemessen mit der Konstantfeldgelelektrophorese) und Einzelstrangbrüche (ESB) zusammen mit alkali-labilen Schäden (*engl.* Alkali labile Sites, ALS), gemessen mit der alkalischen Entwindungstechnik.

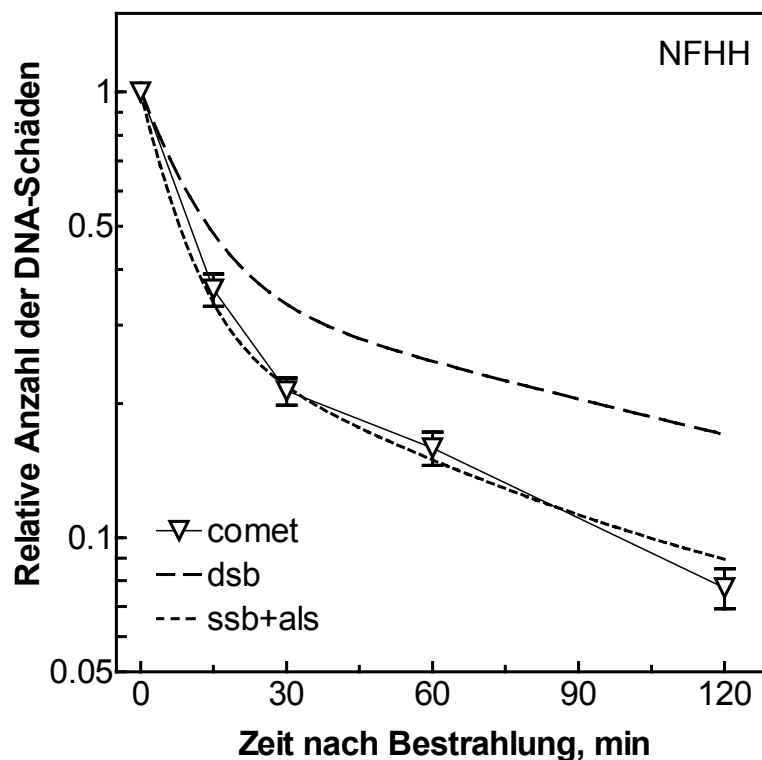


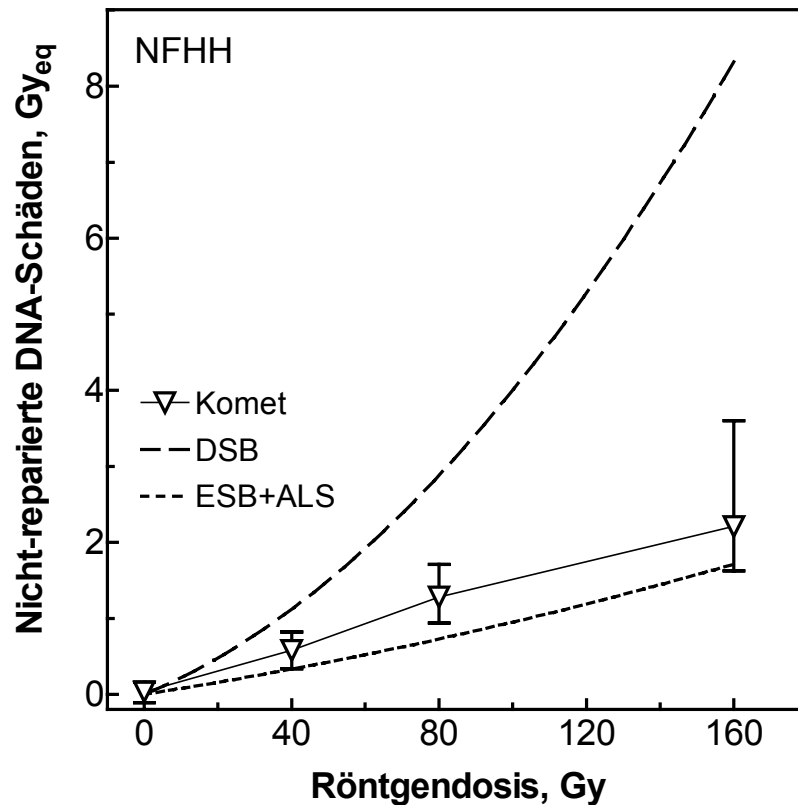
Abb. 12: Vergleich der DNA-Reparaturkinetiken in NFHH bei Nachweis mit verschiedenen Methoden. Konfluente Zellen wurden bei 0°C bestrahlt und anschließend bei 37°C inkubiert. Nachweis der DNA-Schäden nach Bestrahlung mit 2 Gy mittels der Kometentechnik (▽, aus Abb.9); nach Bestrahlung mit 9 Gy mittels der alkalischen Entwindungstechnik (···, von Dikomey *et al.* unveröffentlicht) und nach Bestrahlung mit 10 Gy mittels der Konstantfeldgelelektrophorese (---, aus Dikomey und Brammer 1999).

Der Kurvenverlauf war weitgehend gleich: In den ersten 15 min wurden bei DSB etwa 50% repariert, bei Kometen und ALS 65%. Nach Ablauf von 30 min folgte eine langsamere Reparaturphase, die nach 120 min noch andauerte. Die Reparaturkinetik der Messungen mit der Kometentechnik waren etwa deckungsgleich mit der Reparaturkinetik für Einzelstrangbrüche. Deutlich verschieden verhielt sich die Reparatur von Doppelstrangbrüchen, die langsamer erfolgte und nach 120 min unvollständiger blieb. Es zeigte sich somit, daß das "Tail

Moment" in der Kometentechnik wesentlich von der Anzahl der Einzelstrangbrüche abhängig war.

Für die Messung von residualen DNA-Schäden wurden die Zellen mit Röntgendosen von bis zu 160 Gy bestrahlt und anschließend für 24 h bei 37°C inkubiert. Abb.13 zeigt die verschiedenen Schadensarten bzw. Meßmethoden für NFHH im Vergleich. Die Werte wurden,

Abb.13: Vergleich der nicht-reparierten DNA-Schäden in NFHH bei Nachweis mit verschiede-



nen Methoden. Konfluente Zellen wurden bei 0°C bestrahlt und anschließend bei 37°C für 24 h inkubiert. Nachweis der DNA-Schäden mittels der Kometentechnik (∇); mittels der alkalischen Entwindungstechnik (\cdots , aus Dikomey *et al.* 1998) und mittels der Konstantfeldgelelektrophorese ($---$, aus Dikomey *et al.* 1999).

wie unter 3.3.2 erläutert, als Dosisäquivalente standardisiert und gegen die Röntgendosis aufgetragen. Bei allen drei Schadensarten nahm der residuale DNA-Schaden mit steigender Dosis stetig zu. Der flachste Anstieg war bei den ESB und ALS zu verzeichnen. Der Kurvenverlauf der Kometentechnik glich im wesentlichen dem von ESB/ALS. Die residualen Doppelstrangbrüche verhielten sich jedoch hiervon abweichend. Ihre Anzahl stieg mit zunehmender Dosis wesentlich steiler an und lag schon bei 40 Gy deutlich über dem Niveau von Kometentechnik und ESB/ALS.

4 DISKUSSION

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Messung der Erzeugungs- und Reparaturkinetiken von DNA-Schäden in Fibroblasten mit einer von Müller *et al.* (Müller *et al.* 1994) entwickelten Modifikation der Kometentechnik.

Die Kometentechnik als Variante der Einzelzellgelelektrophorese (SCGE) wurde bereits 1984 von Östling und Johanson eingeführt. Seitdem steht das Verfahren in einer stetig wachsenden Fülle von Modifikationen zur Verfügung. Mit der Weiterentwicklung des Originalassays erfolgte auch eine zunehmende Spezialisierung auf unterschiedlichste Aufgabenbereiche. Das morphologische Korrelat der erhaltenen Meßwerte ist heute ebenfalls klarer als noch vor 15 Jahren. Einen guten Überblick über die verbreitetsten Verfahren gibt eine Arbeit von Fairbairn *et al.* (1995).

Neutrale Kometentechnik: Die neutrale Kometentechnik in ihrer gebräuchlichsten Form wurde 1991 von Olive *et al.* eingeführt. Die Lyse der Zellen wird hier bei pH-Werten um 8,3 für bis zu 4 h durchgeführt. Die untere Nachweisgrenze für strahleninduzierte DNA-Schäden lag relativ hoch. Häufig begann der gemessene Dosisbereich um 20 Gy. Einzelne Autoren berichteten auch über Nachweisgrenzen ab 5 Gy (Olive *et al.* 1991).

Alkalische Kometentechnik: Die alkalische Kometentechnik ist ebenfalls eine weitverbreitete Methode. Singh *et al.* führten sie 1988 ein, mit dem Ziel, eine gegenüber dem Östling'schen Assay (Östling and Johanson 1984) höhere Sensitivität zu erzielen. Tatsächlich ließen sich bereits nach Dosen von 0,05 Gy und weniger DNA-Schäden nachweisen (Singh *et al.* 1994, Ikushima *et al.* 1996, Malyapa *et al.* 1998). Wesentlicher Eckpunkt des Verfahrens war die zeitlich ausgedehnte Lyse (bis zu 60 min (Singh *et al.* 1988)) bei pH-Werten über 10, die zu einer weitgehenden DNA-Denaturierung führte. Der pH-Wert des Elektrophoresepuffers lag in der Regel um 8,3. Die Dauer der Elektrophorese variierte zwischen 20 min (Singh *et al.* 1988) und 25 min (Olive *et al.* 1991), die angelegte Spannung war gering (z.B. 0,66V/cm; Olive *et al.* 1991).

Kometentechnik nach Müller et al. (Müller *et al.* 1994): Die in dieser Arbeit benutzte Variante der Kometentechnik wurde 1994 von Müller *et al.* eingeführt. Sie zeichnete sich durch eine Reihe deutlicher Änderungen gegenüber den bereits genannten Protokollen aus: Zum einen erfolgte die Lyse der Zellen in einem annähernd neutralen Medium (pH 9,5) mit Detergenzien. Die Lysezeit betrug nur 15 min. Zum anderen wurde die Elektrophorese bei hoher Spannung (2,5 V/cm) und sehr kurz (4 min) durchgeführt.

4.1 Nachweis von DNA-Schäden

Abb.4B zeigt, daß ein Nachweis der initialen DNA-Schädigung mit der Technik nach Müller *et al.* (1994) zuverlässig möglich war. Im Dosisbereich zwischen 0 und 2 Gy stieg das gemessene "Tail Moment" zunächst mit der Dosis an. Zwischen 2 und 5 Gy kam es nur noch zu einer kleinen Zunahme der Meßwerte. Somit ergab sich eine besonders hohe Sensitivität dieser Technik im Dosisbereich von 0 bis 2 Gy.

Im Gegensatz hierzu zeigten sowohl die alkalische als auch die neutrale Kometentechnik grundsätzlich andere Dosisabhängigkeiten. Für beide Protokolle nahm das Tail-Moment linear (Olive *et al.* 1994, Olive *et al.* 1991, Mariya *et al.* 1997, Banath *et al.* 1998).

Abb.5 zeigt, daß bei einer bestimmten Dosis die Einzelwerte eine starke Streuung aufwiesen. Es wurden daher pro Zelllinie und Meßpunkt mindestens 60 Einzelmessungen durchgeführt, um repräsentative Mittelwerte zu erhalten. Eine ebenso große Streuung wurde auch von Müller *et al.* (1994) beobachtet.

Für die alkalische Kometentechnik ist die Problematik ähnlich ausgeprägt. Starke Streuungen der Meßwerte nach einer definierten Dosis wurden von einer Fülle von Autoren beobachtet: Alapetite *et al.* (1996) zeigten dies für Normalfibroblasten; Malcolmson *et al.* (1995), Malyapa *et al.* (1998) und Leprat *et al.* (1998) für Lymphozyten sowie Banath *et al.* (1998) für Blutleukozyten. Die Streuung der Einzelwertewerte bei Messung mit der neutralen Kometentechnik ist ebenfalls auffällig, aber oft geringer als bei der alkalischen Technik (Banath *et al.* 1998).

4.2 Natur der nachgewiesenen DNA-Schädigung

Sowohl bei der alkalischen als auch bei der neutralen Kometentechnik besteht weitgehend Klarheit darüber, welcher DNA-Schaden durch diese Techniken nachgewiesen wird. Mit der neutralen Kometentechnik wurden überwiegend DSB erfaßt (Klaude *et al.* 1996). Bei Dosen um 10 Gy ließen überwiegend relaxierte DNA-Schleifen, welche noch am Zellkern befestigt waren, die Kometenbilder entstehen. Erst bei Dosen um 200 Gy entstanden doppelsträngige DNA-Fragmente, die sich frei im elektrischen Feld bewegen konnten. Hierdurch wurde eine Trennung des Kometenschweifens vom Kopf möglich.

Mit der alkalischen Kometentechnik wurden vor allem ESB und ALS nachgewiesen (Klaude *et al.* 1996). Bei den alkalischen Varianten der Kometentechnik kam es aufgrund des hohen pH zu einer Trennung der DNA-Stränge. Die so zwischen ESB entstandenen Fragmente waren im elektrischen Feld sehr beweglich (Klaude *et al.* 1996). Eine Trennung des Kometenschweifens vom Kopf wurde somit leichter möglich.

Bei der von Müller *et al.* (1994) etablierten Kometentechnik gab es bisher noch keine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Schadenstyp. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Resultate deuten darauf hin, daß mit dieser Technik ähnlich wie mit der alkalischen Entwindungstechnik vor allem ESB und ALS erfaßt werden. So zeigte sich eine große

Übereinstimmung zwischen dieser Kometentechnik und der alkalischen Entwindungstechnik sowohl hinsichtlich der Reparaturkinetik der DNA-Schäden als auch hinsichtlich der Dosisabhängigkeit nicht-reparierter DNA-Schäden (Abb.12 und 13). Dagegen zeigte sich keine Übereinstimmung mit den Meßergebnissen, wie sie mittels der CFGE erzielt wurden, mit der ausschließlich DSB nachgewiesen werden (Dahm-Daphi und Dikomey 1995).

4.3 Initiale DNA-Schädigung

Das Ausmaß der initialen DNA-Schädigung wurde für die ausgewählten Zelllinien nach Dosen zwischen 0 und 5 Gy gemessen. Wie die Abb.6 und 7 verdeutlichen, waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien beträchtlich. Einerseits wichen die Erzeugungskurven in ihrer Steigung voneinander ab; andererseits war aber auch bei unbestrahlten Zellen eine deutliche Variation der Meßwerte erkennbar. Einige der Zelllinien, die unbestrahlt ein geringes "Tail Moment" aufwiesen, zeigten auch nach Bestrahlung nur eine geringe Zunahme dieses Wertes (z.B. AT3). Andere Zellen zeigten unbestrahlt hohe "Tail Moment"-Werte, wiesen aber auch unter Bestrahlung mit 5 Gy sehr hohe "Tail Moment"-Werte auf. Um allein den relativen Anstieg der "Tail Moment"-Werte mit der Dosis zu erfassen, wurden die Ergebnisse auf den jeweiligen Wert für unbestrahlte Zellen normiert.

Bei Betrachtung des normierten DNA-Schadens zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Während für bestimmte Zelllinien, wie z.B. NF07 bei Bestrahlung mit 5 Gy die "Tail Moment"-Werte lediglich um den Faktor 2,65 anstiegen, wurde für die AT-Zelllinien ein Anstieg im Durchschnitt um den Faktor 4,55 gefunden.

Auch in den bisher publizierten Arbeiten fanden sich Beispiele für Unterschiede in der Erzeugung von DNA-Schäden. So konnten mit der alkalischen Kometentechnik Unterschiede zwischen bestimmten Tumorzellen und humanen Keratinozyten nach Bestrahlung mit Dosen bis zu 30 Gy nachgewiesen werden (Daza *et al.* 1997). Mit der neutralen Kometentechnik wurden für 7 Tumorzelllinien nach einer Bestrahlung mit 6 Gy ebenfalls Unterschiede in der Erzeugung von DNA-Schäden gefunden (Marples *et al.* 1998).

Bisher gab es noch kein klares Bild darüber, welche Faktoren zu dem beobachteten Unterschied in den initialen "Tail Moment"-Werten führen könnten. Es wurden zwei alternative Vorstellungen diskutiert. Einerseits könnten den Unterschieden im "Tail Moment" eine unterschiedliche Anzahl von ESB zugrunde liegen. Von Dikomey *et al.* (1998) wurde jedoch gezeigt, daß für die in dieser Arbeit verwendeten AT- und NFHH-Linien die Anzahl der erzeugten ESB jeweils übereinstimmten. Ein Unterschied in der Anzahl der erzeugten ESB schied somit als Erklärung für die Variation in der Erzeugung von DNA-Schäden aus.

Verschiedene Versuche von anderen Autoren zeigten, daß das "Tail Moment" auch von der Chromatinstruktur der Zelle abhing (Klaude *et al.* 1996). Die Wanderungseigenschaften der DNA verbesserten sich, wenn lockere oder offene Strukturen die Herauslösung begün-

stigten. Einen deutlichen Hinweis hierauf lieferten Untersuchungen mittels Autoradiographie. Gerade replizierte DNA verblieb trotz angelegter Spannung weitgehend im Zellkern. Nicht replizierende DNA konnte dagegen im elektrischen Feld wandern (Klaude *et al.* 1996). Da die DNA-Replikation an Strukturen der Kernmatrix stattfindet, kann vermutet werden, daß an ihr fixierte DNA im elektrischen Feld schlechte Wanderungseigenschaften zeigt.

Es ist anzunehmen, daß Unterschiede in den Kernmatrixstrukturen auch für die in dieser Arbeit festgestellten Unterschiede im initialen "Tail Moment" verantwortlich sind. Danach sollten Zellen mit großem initialem "Tail Moment" über eine offene Kernmatrix verfügen, die demzufolge eine leichteres Herauslösen der DNA im elektrischen Feld ermöglicht. Dies sollte dann insbesondere für AT-Zellen gelten, was in weiteren Untersuchungen aufzuklären wäre.

4.4 Reparatur der DNA-Schäden

Die Reparatur von DNA-Schäden wurde mit der Kometentechnik nach Bestrahlung mit 2 Gy gemessen (Abb.9). Die Reparatur erfolgte zunächst sehr schnell, so daß nach 30 min mindestens 75% des initialen DNA-Schadens repariert waren (Reparaturhalbwertszeit $\tau = 10-18$ min). Danach nahmen die Meßwerte langsamer ab. Nach 120 min scheint die Reparatur zum größten Teil abgeschlossen zu sein. Da die gemessenen Werte nahezu die Werte der unbestrahlten Kontrollen erreichten, ist der weitere Verlauf der Reparaturkinetik mit der Kometentechnik in der vorliegenden Form nicht mehr darstellbar.

Mit dem gleichen Assay wurden von Müller *et al.* (1994) Reparaturmessungen an zwei Tumorzelllinien nach Bestrahlung mit 2 Gy durchgeführt. Für eine der zwei untersuchten Zelllinien wurde ebenfalls nach 120 min eine nahezu vollständige Reparatur gefunden ($\tau \approx 17$ min), während für die andere noch ein Restschaden von 20% gemessen wurde. Alapetite *et al.* (1996) fanden in Fibroblasten mit der alkalischen Kometentechnik bereits nach 60 min eine nahezu vollständige Reparatur ($\tau = 6$ bzw. 7 min). Von Malcolmson *et al.* (1995) wurden mit dem gleichen Verfahren Reparaturkinetiken für Lymphozyten nach Bestrahlung mit 2 Gy gemessen. Für Lymphozyten von gesunden Spendern wurden auch hier nach 60 min eine fast vollständige Reparatur gefunden. Leprat *et al.* (1998) führten Versuche mit der alkalischen Kometentechnik an Lymphozyten durch. Allerdings lag hier bei einer Bestrahlung mit 2 Gy nach 60 min noch zwischen 10 und 25% des initialen DNA-Schadens vor ($\tau \approx 10-15$ min). Banath *et al.* (1998) fanden in Leukozyten nach 8 Gy und 120 min Reparaturdauer Meßwerte von 6 - 10 % des initialen DNA-Schadens. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bei Reparaturmessungen mit der Kometentechnik die Halbwertszeit τ in etwa zwischen 6 und 18 min lag. Nach 120 min Reparaturzeit lagen die "Tail Moment"-Werte in der Regel in der Größenordnung unbestrahlter Kontrollen.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben der Reparatur von 7 Normalfibroblastenlinien

auch die Reparatur von 2 AT-Zelllinien untersucht. Als Maß für die Reparatur wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) herangezogen. In die AUC fließen sowohl die Geschwindigkeit des Reparaturprozesses als auch das Ausmaß der verbliebenen DNA-Schädigung ein. Es fanden sich nur sehr geringe Unterschiede (s. Abb. 9). Der geringste Wert unter den Normalfibroblasten lag bei 31,9 für NF02, der größte bei 54,7 für NF06. Die AUC der AT-Zelllinien lag mit 57,2 (AT2BE) bzw. 66,1 (AT3) geringfügig darüber. Dieser Unterschied war auf den in den AT-Zelllinien anfänglich (bis zu einer Reparaturdauer von etwa 15 min) etwas langsamere Reparatur zurückzuführen. Im Endniveau nach 120 min Reparaturdauer zeigte sich jedoch zwischen Normalfibroblasten und AT-Zelllinien kein Unterschied. Somit wurden in der vorliegenden Arbeit für die untersuchten Zelllinien nur Unterschiede in der Erzeugung, nicht jedoch in der Reparatur der DNA-Schäden gefunden.

Nocentini *et al.* (1995) verglichen mit der alkalischen Kometentechnik die DNA-Reparatur von normalen humanen Fibroblasten mit der von Fibroblasten, die einen Defekt in der DNA-Ligase aufwiesen. Nach Bestrahlung mit 10 bzw. 30 Gy und einer Reparaturinkubation bis 120 min wurde kein Unterschied in der Reparatur gefunden. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Alapetite *et al.* (1996). Auch Olive *et al.* (1994) fanden bei Nachweis mit der neutralen Kometentechnik keine Unterschiede in der Reparaturkinetiken von 6 Tumorzelllinien.

Allein von Müller *et al.* (1994) und Leprat *et al.* (1998) wurde von deutlichen Unterschieden in der DNA-Reparatur berichtet. Müller *et al.* (1994) fanden für zwei Tumorzelllinien nach Bestrahlung mit 5 Gy deutliche Unterschiede in der Reparaturkinetik und Leprat *et al.* (1998) für Lymphozyten nach Bestrahlung mit 2 bzw. 5 Gy.

Abgesehen von diesen beiden Beobachtungen wurden somit, ähnlich wie in dieser Arbeit, keine Unterschiede in der Reparaturkinetik der DNA-Schäden bei Nachweis mit der Kometentechnik gefunden.

4.5 Beziehung zwischen zellulärer Strahlenempfindlichkeit und DNA-Schädigung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Korrelation besteht zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit und dem initialen Strahlenschaden bei Nachweis mit der Kometentechnik nach Müller *et al.* (1994). Das mit der Kometentechnik gemessene relative "Tail Moment" nahm mit steigender zellulärer Strahlenempfindlichkeit deutlich zu (Abb.11A). Zellen mit geringer Strahlenempfindlichkeit zeigten bei Untersuchung mit der Kometentechnik nach Bestrahlung mit 5 Gy lediglich ein geringes "Tail Moment". Zellen mit großer Strahlenempfindlichkeit wie z.B. AT-Zellen zeigten in der Kometentechnik entsprechend hohe Werte.

Eine Korrelation zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit und der DNA-Schädigung bei Nachweis mit der Kometentechnik wurde auch von Marples *et al.* (1998) für 6 Tumorzelllinien beobachtet; allerdings nicht wie in dieser Arbeit für die initiale DNA-

Schädigung, sondern für den residualen Schaden 24 h nach Bestrahlung. Olive *et al.* (1994) sowie Sarkaria *et al.* (1998) fanden hingegen keine Korrelation zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit und dem residualen DNA-Schaden bei Nachweis mittels der neutralen Kometentechnik.

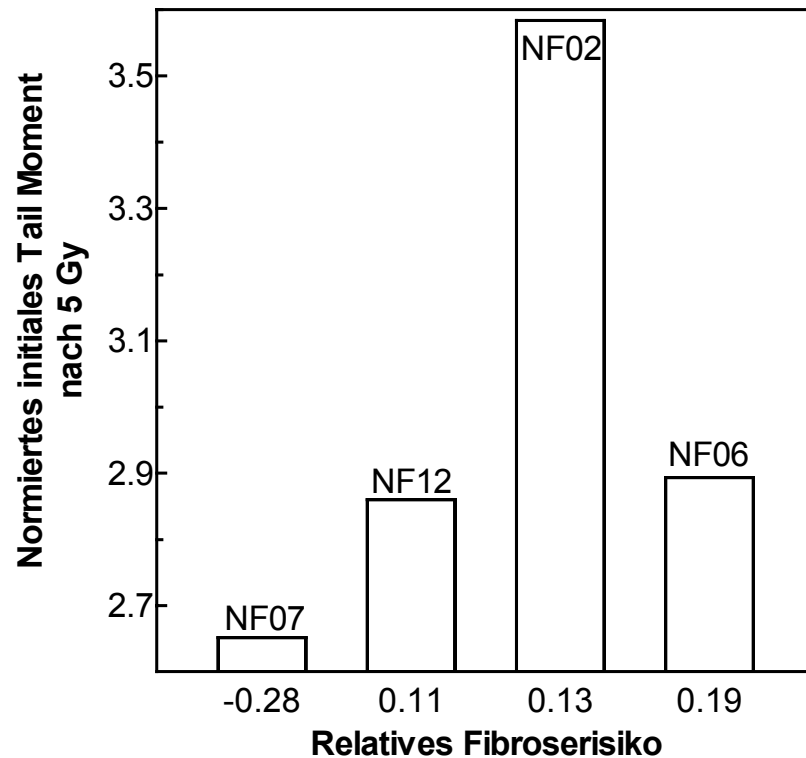
Wie oben bereits diskutiert, liegt die Vermutung nahe, daß Unterschiede im initialen "Tail Moment" zwischen den Zelllinien nicht auf die Anzahl der erzeugten ESB, sondern auf Unterschiede in der Chromatinstruktur zurückzuführen sind. Damit deutet die vorliegende Arbeit an, daß Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit letztlich durch Unterschiede in der Chromatinstruktur verursacht werden. Damit bestätigt diese Arbeit Vermutungen von anderen Autoren (Lehnert 1998, Malyapa *et al.* 1994, Malyapa *et al.* 1996, Schwartz *et al.* 1995, Malyapa *et al.* 1996), die Variationen in der Chromatinstruktur als eine wesentliche Ursache für Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit sahen.

4.6 Beziehung zwischen Fibroserisiko und DNA-Schädigung

Eine mögliche Reaktion von Fibroblasten auf Bestrahlung ist die Differenzierung zu Fibrozyten mit nachfolgender gesteigerter Kollagenproduktion (Rodemann und Bamberg 1994). Das klinische Korrelat dieser Reaktion kann eine Strahlenfibrose sein. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits untersucht, ob die individuelle zelluläre Strahlenempfindlichkeit mit dem Ausmaß oder dem Risiko einer strahleninduzierten Fibrose korreliert, wobei die zelluläre Strahlenempfindlichkeit mittels Kolonietest nachgewiesen wurde (Johansen *et al.* 1994, Johansen *et al.* 1996).

Ein solcher Zusammenhang konnte auch im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, da ein Teil der untersuchten Fibroblastenlinien (NF02, 06, 07, 12), von Brustkrebspatientinnen stammten, für die zuvor in einer retrospektiven Studie das Fibroserisiko bestimmt wurde (Johansen *et al.* 1994, Johansen *et al.* 1996). In Abb.14 wurde das klinisch ermittelte Fibroserisiko der Spenderinnen dem relativen initialen DNA-Schaden nach 5 Gy (ID_5) der entsprechenden Zelllinien gegenüber gestellt, da für diesen Parameter eine Korrelation mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit gefunden wurde (Abb.11A). Für zwei Patientinnen (NF 12 und NF 02) lag mit den Werten 0,11 und 0,13 ein annähernd gleiches Fibroserisiko vor. Die zugehörigen ID_5 -Werte differierten mit 2,86 bzw. 3,58 jedoch weit. Eine Korrelation zwischen dem Fibroserisiko und der so bestimmten zellulären Strahlenempfindlichkeit erscheint somit unwahrscheinlich. Damit entsprechen diese Ergebnisse den zuvor von Dikomey *et al.* (1999) beschriebenen Beobachtungen. Bei der geringen Anzahl der analysierten Datensätze ist eine abschließende Beurteilung des Sachverhalts jedoch nicht möglich.

Abb. 14: Vergleich der Strahlenempfindlichkeit der Fibroblasten bei Nachweis mittels der Kometentechnik mit dem relativen Fibroserisiko. Aufgetragen wurde das relative initiale "Tail Moment" nach 5 Gy, ID5, aus Tab.1 gegen das relative Fibroserisiko der entsprechenden Brustkrebspatientinnen (weitere Details siehe Text).



4.7 Schlußfolgerung

Die in dieser Arbeit untersuchte Modifikation der Kometentechnik ist eine Methode, die zur Messung der zellulären Strahlenempfindlichkeit eingesetzt werden kann. Nach Bestrahlung mit 5 Gy fanden sich deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien, die mit der Überlebensrate der Zellen nach 2 Gy im Kolonietest (SF_{2Gy}) korrelierten. Dies sollte Anlaß zur weiteren Entwicklung der Methode sein.

5 LITERATUR

- Alapetite C., Wachter T., Sage E., und Moustacchi E., 1996, Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and gamma-rays. *International Journal of Radiation Biology*, **69**, 359-369.
- Banath J. P., Fushiki M., und Olive P. L., 1998, Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, **73**, 649-660.
- Bentzen S. M., und Overgaard J., 1994, Patient-to-patient variability in the expression of radiation-induced normal tissue injury. *Seminars of Radiation Oncology*, **4**, 68-80.
- Borgmann K., und Dikomey E., 1997, Relationship between PCC-fragments and cell killing studied in X-irradiated CHO, CHO K1 cells and two radiosensitive mutants xrs1 and xrs5. *International Journal of Radiation Biology*, **72**, 667-674.
- Brock W. A., Tucker S. L., Geara F. B., Turesson I., Wike J., Nyman J., und Peters L. J., 1995, Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *International Journal of Radiation, Oncology, Biology, Physics*, **32**, 1371-1379.
- Burnet N. G., Nyman J., Turesson I., Wurm R., Yarnold J. R., und Peacock J. H., 1992, Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *The Lancet*, **339**, 1570-1571.
- Dahm-Daphi J., und Dikomey E., 1995, Separation of DNA fragments induced by ionizing irradiation using a graded-field gel electrophoresis. *International Journal of Radiation Biology*, **67**, 161-168.
- Dahm-Daphi J., Dikomey E., und Pytlik C., 1994, Relationship between non-reparable strand breaks und cell survival studied in CHO, CHO K1 und the radiosensitive mutants xrs1 und xrs5. *International Journal of Radiation Biology*, **65**, 657-663.
- Daza P., Schüßler H., McMillan T. J., Girod S. C., und Pfeiffer P., 1997, Radiosensitivity und double-strand break rejoining in tumorigenic und non-tumorigenic human epithelial cell lines. *International Journal of Radiation Biology*, **72**, 91-100.
- Dikomey E., Dahm-Daphi J., Brammer I., Martensen R., und Kaina B., 1998, Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International Journal of Radiation Biology*, **73**, 269-278.
- Dikomey E., Brammer I., Johansen j., Bentzen S. M., und Overgaard J., 1999, Relationship between residual DNA double-strand breaks, cell killing und fibrosis studied in conflu-

ent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology, Physics and Biology*, im Druck.

Fairbairn D. W., Olive P. L., und O'Neill K. L., 1995, The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, **339**, 37-59.

Geara F. B., Peters L. J., Kian Ang K., Wike J. L., und Brock W. A., 1993, Prospective comparison of in vitro normal cell radioensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **27**, 1173-1179.

Ikushima T., Aritomi H., und Morisita J., 1996, Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutation Research*, **358**, 193-198.

Johansen J., Bentzen S. M., Overgaard J., und Overgaard M., 1994, Evidence for a positive correlation between in vitro radiosensitivity of normal human skin fibroblasts and the occurrence of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology*, **66**, 407-412.

Johansen J., Bentzen S. M., Overgaard J., und Overgaard M., 1996, Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia, und skin erythema after radiotherapy. *Radiotherapy und Oncology*, **40**, 101-109.

Jones L. A., Scott D., Cowan R., und Roberts S. A., 1995, Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after radiotherapy: chromosome aberrations after low dose-rate irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, **67**, 519-528.

Jung. H., 1978, Eine einfache Anordnung zum Auszählen von Zellkulturen. *Leitz-Mitteilungen aus Wissenschaft und Technik*, **VII**, 102-103.

Kent C. R. H., Eady J., Ross G. M., und Steel G. G., 1995, The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. *International Journal of Radiation Biology*, **67**, 655-660.

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., und Hendry J. H., 1997, 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**, 1137-1144.

Kiltie A. E., Ryan A. J., Swindell R., Barber J. B. P., West C. M. L., Magee B., und Hendry J. H., 1999a, A correlation between residual radiation-induced DNA double-strand breaks

- in cultured fibroblasts and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. *Radiotherapy and Oncology*, **51**, 55-65.
- Kiltie A. E., Barber J. B. P., Swindell R., Ryan A. J., West C. M. L., Hendry J. H., und Magee B., 1999b, Lack of correlation between residual radiation-induced DNA damage, in keratinocytes assayed directly from skin, and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. *International Journal of Oncology, Biology, Physics*, **43** (3), 481-487.
- Klaude M., Eriksson S., Nygren J., und Ahnström G., 1996, The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, **363**, 89-96.
- Lehnert S., 1998, From DNA damage to cell death: the role of nuclear structure in the response to cancer therapy. *Radiation Research*, **149**, 317-318.
- Leprat F., Alapetite C., Rosselli F., Ridet A., Schlumberger S. A., Suarez H. G., und Moustacchi E., 1998, Impaired DNA repair as assessed by the "Comet" assay in patients with thyroid tumors after a history of radiation therapy: a preliminary study. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, **40**, 1019-1026.
- Malcolmson A. M., Davies G., Hanson J. A., Deeley J. O. T., Gaffney C. C., McGregor A. D., und Kerby I. J., 1995, Determination of radiation-induced damage in lymphocytes using the micronucleus and microgel electrophoresis 'comet' assays. *European Journal of Cancer*, **31A**, 2320-2323.
- Malyapa R. S., Wright W. D., und Roti Roti J. L., 1994, Radiation sensitivity correlates with changes in DNA supercoiling and nucleoid protein content in cells of three chinese hamster cell lines. *Radiation Research*, **140**, 312-320.
- Malyapa R. S., Wright W. D., und Roti Roti J. L., 1996, DNA supercoiling changes and nucleoid protein composition in a group of L5178Y cells of varying radiosensitivity. *Radiation Research*, **145**, 239-242.
- Malyapa R. S., Wright W. D., Taylor Y. C., und Roti Roti J. L., 1996, DNA supercoiling changes and nuclear matrix-associated proteins: possible role in oncogene-mediated radioresistance. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, **35**, 963-973.
- Malyapa R. S., Bi C., Ahern E. W., und Roti Roti J. L., 1998, Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation. *Radiation Research*, **149**, 396-400.
- Mariya Y., Streffer C., Fuhrmann C., und Wojcik A., 1997, Correlation of radiation-induced micronucleus frequency with clonogenic survival in cells of one diploid and two tetraploid murine tumor cell lines of the same origin. *Radiation Research*, **147**, 29-34.

- Marples B., Longhurst D., Eastham A. M., und West C. M. L., 1998, The ratio of initial / residual DNA damage predicts intrinsic radiosensitivity in seven cervix carcinoma cell lines. *British Journal of Cancer*, **77**, 1108-1114.
- Müller W.-U., Bauch T., Streffer C., Niedereichholz F., und Böcker W., 1994, Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumour cell lines. *International Journal of Radiation Biology*, **65**, 315-319.
- Nachtrab U., Oppitz U., Flentje M., und Stopper H., 1998, Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology*, **73**, 279-287.
- Neubauer S., Gebhart E., Schmitt G., Birkenhake S., und Dunst J., 1996, Is chromosome in situ suppression (CISS) hybridization suited as predictive test for intrinsic radiosensitivity in cancer patients?. *International Journal of Oncology*, **8**, 707-712.
- Nocentini S., 1995, Comet assay analysis of repair of DNA strand breaks in normal and deficient human exposed to radiations and chemicals. Evidence for a repair pathway specificity of DNA ligation. *Radiation Research*, **144**, 170-180.
- Nunez M. I., Villalobos M., Olea N., Valenzuela M. T., Pedraza V., McMillan T. J., und Ruiz de Almodovar J. M., 1995, Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumour cells. *British Journal of Cancer*, **71**, 311-316.
- Olive P. L., Banath J. P., und Durand R. E., 1990, Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation Research*, **122**, 86-94.
- Olive P. L., Wlodek D., und Banath J. P., 1991, DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research*, **51**, 4671-4676.
- Olive P. L., Wlodek D., Durand R. E., und Banath J. P., 1992, Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research*, **198**, 259-267.
- Olive P. L., Banath J. P., und MacPhail H. S., 1994, Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Research*, **54**, 3939-3946.
- Östling O., und Johanson K. J., 1984, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **123**, 291-298.
- Rodemann H. P., und Bamberg M., 1994, Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Ra-*

diotherapy and Oncology, **35**, 83-90.

- Ruiz de Almodovar J. M., Nunez M. I., McMillan T. J., Olea N., Mort C., Villalobos M., Pedraza V., und Steel G. G., 1994, Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *British Journal of Cancer*, **69**, 457-62.
- Sarkaria J. N., Bush C., Eady J. J., Peacock J. H., Steel G. G., und Yarnold J. R., 1998, Comparison between pulsed-field gel electrophoresis and the comet assay as predictive assays for radiosensitivity in fibroblasts. *Radiation Research*, **150**, 17-22.
- Sasai K., Evans J. W., Kovacs M. S., und Brown J. M., 1994, Prediction of human cell radiosensitivity: Comparison of clonogenic assay with chromosome aberrations scored using premature chromosome condensation with fluorescence in situ hybridisation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, **30**, 1127-1132.
- Schwartz J. L., 1992, The radiosensitivity of the chromosomes of the cells of human squamous cell carcinoma cell lines. *Radiation Research*, **129**, 96-101.
- Schwartz J. L., Rotmensch J., Giovanazzi S., Cohen M. B., und Weichselbaum R. R., 1988, Faster repair of DNA double-strand breaks in radioresistant human tumor cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **15**, 907-912.
- Schwartz J. L., Brinkman W. J., Kasten L., Miller D. W., Moan E. I., Murphy Y. T., Stella D., und Sedita B. A., 1995, Altered metaphase chromosome structure in xrs-5 cells is not related to its radiation sensitivity or defective DNA break rejoining. *Mutation Research*, **328**, 119-126.
- Singh N. P., Stephens R. E., und Schneider E. L., 1994, Technical report Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *International Journal of Radiation Biology*, **66**, 23-28.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., und Schneider E. L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175**, 184-191.
- Tucker S. L., Turesson I., und Thames H. D., 1992, Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *European Journal of Cancer*, **28A**, 1783-1791.
- Turesson I., 1990, Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia. *International Journal of Radiation, Oncology, Biology, Physics*, **19**, 1569-1574.
- Turesson I., Nyman J., Holmberg E., und Oden A., 1996, Prognostic factors for acute and

late skin reactions in radiotherapy patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **36**, 1065-1075.

Wurm R., Burnet N. G., Duggal N., Yarnold J. R., und Peacock J. H., 1994, Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, **30**, 625-633.

Zaffaroni N., Orland L., Villa R., Bearzatto A., Rofstad E. K., und Silvestrini R., 1994, DNA double-strand break repair and radiation response in human tumour primary cultures. *International Journal of Radiation Biology*, **66**, 279-285.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden strahleninduzierte DNA-Schäden mittels der Kometentechnik nachgewiesen. Fünf Normalfibroblastenlinien sowie zwei Zelllinien von Patienten mit *Ataxia teleangiectasia* wurden gemessen. Diese Methode zeichnet sich durch eine relativ kurze Lysezeit (20 min) bei schwach alkalischem pH (9,5) sowie eine sehr kurze Elektrophoresedauer (4 min) bei hoher Spannung (4 V/cm) aus. Es konnte gezeigt werden, daß die verwendete Methode überwiegend Einzelstrangbrüche (ESB) erfaßt, da die gemessenen Reparaturkinetiken weitestgehend den mit der alkalischen Entwindungstechnik gemessenen entsprachen.

Es wurde die Erzeugung von DNA-Schäden durch Röntgenbestrahlung mit Dosen bis zu 5 Gy gemessen. Bis zu einer Dosis von 2 Gy stiegen die Meßwerte zunächst steil an, um dann zwischen 2 und 5 Gy ein Plateau zu erreichen. Bereits Dosen von 0,5 Gy ließen sich gut nachweisen. Damit ist das Verfahren besonders sensitiv im Bereich zwischen 0 und 2 Gy.

Es zeigt sich eine große biologische Variation der einzelnen Meßwerte. Für eine ausreichend genaue Bestimmung der Mittelwerte mußten daher mindestens 60 Einzelzellen gemessen werden

. Beim Vergleich der Zelllinien untereinander fanden sich große Unterschiede. Die nähere Betrachtung zeigte, daß diese Variation nicht nur für bestrahlte, sondern auch für unbestrahlte Zellen gefunden wurde. Somit ist zur korrekten Darstellung des Strahlenschadens eine Normierung auf den 0-Gy-Wert einer jeden Zelllinie erforderlich. Während normale humane Fibroblasten einen Anstieg der Werte im Durchschnitt um den Faktor 2,9 gegenüber unbestrahlten Zellen lieferten, lag dieser Anstieg bei den untersuchten AT-Zelllinien mit ca. 4,5 wesentlich höher. Es ist anzunehmen, daß hierbei die Anzahl der erzeugten ESB bei allen Zelllinien in etwa gleich ist. Wahrscheinlich sind die beobachteten Unterschiede eher auf Unterschiede in der Konformation der DNA und somit unterschiedliche Fähigkeit zur Herauslösung aus dem Zellkern zurückzuführen.

Nach Bestrahlung mit 2 Gy konnten für alle Zelllinien Reparaturkinetiken mit einer Halbwertszeit von ca. 15 min festgestellt werden. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Erzeugungsversuchen, konnten in der Reparatur von DNA-Schäden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien festgestellt werden.

Reparaturkinetiken und Erzeugungsversuche aus der Kometentechnik wurden mit der mittels Kolonietest bestimmten zellulären Strahlenempfindlichkeit verglichen. Für die normierten Werte nach Bestrahlung mit 5 Gy findet sich eine signifikante Korrelation mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit ($r^2 = 0,86$, $p = 0,0024$). Strahlenempfindliche Zelllinien lieferten in der Kometentechnik höhere Meßwerte als strahlenresistente. Eine Korrelation der Reparaturkinetiken mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit findet sich nicht.

Eine Korrelation der Werte von 4 der 7 gemessenen Zelllinien mit dem klinisch ermittelten Strahlenfibrosiserisiko der Spenderpatientinnen ließ sich nicht nachweisen

7 DANKSAGUNG

Es sei an dieser Stele all Jenen herzlich gedankt, die die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben. Sie haben mir durchgehend zur Seite gestanden, sei es durch Hilfe in Rat und Tat oder ihre bloße Anwesenheit und ein offenes Ohr.

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Jung für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes
- PD Dr. Dikomey für schnelle Hilfe, guten Rat und die viele Geduld
- Dr. Brammer für die freundliche Einarbeitung und Begleitung im Labor
- Frau Kölling für die Messung der Kolonietests
- Frau Riepen und Frau Schäfer für eine Menge technischer Hilfe und viel Spaß beim Arbeiten
- Meinen Eltern sowie Fidy und Kim fürs Zuhören

8 LEBENSLAUF

Marc Robert Zoller

geb.:08.10.1971 in Johannesburg, Republik Südafrika

Eltern: Ursula Zoller, geb. Oelschlegel, geb.:10.05.1943, Studienrätin
Prof. Dr. Klaus Zoller, geb: 27.2.44, Dozent an der Universität der Bundeswehr in
Hamburg

- 9/78 – 5/82 Besuch der Grundschule Breitenfelder Straße in Hamburg
- 9/82 – 6/91 Besuch des zweisprachigen Zuges am Helene-Lange-Gymnasium in
Hamburg; Abschluß Abitur sowie Certificate of Proficiency in English der Uni-
versität Cambridge (schulbegleitendes Programm)
- 9/91 –11/92 Ableistung des Wehersatzdienstes im Rettungsdienst in Hamburg und
Goslar, Abschluß Staatsprüfung zum Rettungssanitäter
- 4/93 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
- 4/95 Ablegen der ärztlichen Vorprüfung
- 6/95--8/95 Gastaufenthalt an der Pavlov-Universität für Medizin in St. Petersburg
- 9/96 Ablegen des I. Abschnittes der ärztlichen Prüfung
- 3/99 Ablegen des II. Abschnittes der ärztlichen Prüfung
- 4/99 – 3/00 Ableistung des praktischen Jahres in der I. Abt. für Innere Medizin des
Allgemeinen Krankenhauses Altona, der Abteilung für Neurologie des All-
gemeinen Krankenhauses Altona sowie den Abteilungen für Chirurgie des All-
gemeinen Krankenhauses St. Georg, alle in Hamburg
- 05/00 Ablegen des III. und letzten Abschnittes der ärztlichen Prüfung

9 ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.