

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Nuklearmedizinische Klinik

**Evaluation des Comet Assays bei neutralem pH zur Detektion von α - Partikel
induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen**

Daniela Hofbauer

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.**

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

- 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke**
- 2. Priv.-Doz. Dr. A. K. Buck**
- 3. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff**

**Die Dissertation wurde am 11.03.2010 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 20.10.2010 angenommen.**

Verwendete Abkürzungen:

Abb. = Abbildung

Ak = Antikörper

BfS = Bundesamt für Strahlenschutz, Neuherberg

DSBs = Doppelstrangbrüche

Gy = Gray

h = Stunde

H₂O_{dd} = doppelt destilliertes Wasser

IQR = interquartile range = Interquartilsabstand

LET = Linearer Energietransfer

min = Minuten

SSBs = Einzelstrangbrüche

TOM = Tail Moment Olive

V = Volt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	05
2	Zielsetzung	12
3	Material	13
3.1	Zellen	13
3.1.1	Magenkarzinomzellen	13
3.1.2	Humane Lymphozyten	13
3.2	Medien und Lösungen	13
3.3	Chemikalien	14
3.4	Verbrauchsmaterialien	14
3.5	Geräte und Computerprogramme	14
4	Methoden	16
4.1	Kultivierung der HSC45-M2 Zellen	16
4.2	Gewinnung der humanen Lymphozyten	16
4.3	Bestrahlung der Zellen	17
4.3.1	Kultivierung von HSC45-M2 Zellen und Lymphozyten auf Mylarfolie (2 µm) zur Vorbereitung der α-Bestrahlung	17
4.3.2	Vorbereitung der Lymphozyten	18
4.3.3	α-Bestrahlung der Zellen mit Americium-241	18
4.3.4	γ-Bestrahlung der Zellen mit Caesium-137	20
4.4	Comet Assay	21
4.4.1	Aufbringen der Zellen auf Objektträger	21
4.4.2	Elektrophorese der DNA-Fragmente bei alkalischem pH	22
4.4.3	Elektrophorese der DNA-Fragmente bei neutralem pH	23
4.4.4	Färbung der DNA	23
4.4.5	Bewertung der Qualität und Quantität der DNA-Schäden	24
5	Ergebnisse	28
5.1	Bestrahlung der HSC45-M2 Zellen mit dem α-Emitter Americium-241	28
5.1.1	Versuch 1	28
5.1.2	Versuch 2	32
5.1.3	Versuch 3	36
5.1.4	Zusammenfassung Ergebnisse Versuch 1-3	40

5.2	γ-Bestrahlung der HSC45-M2 Zellen mit Caesium-137	45
5.3	Bestrahlung von humanen Lymphozyten mit dem α-Emitter Americium-241	51
5.4	γ- Bestrahlung von Lymphozyten mit Caesium-137	56
6	Diskussion	61
6.1	Streuung der Ergebnisse	63
6.1.1	Probleme bei der Adhäsion der HSC45-M2 Zellen auf der Mylarfolie	65
6.1.2	Einfluss der Zellzyklusstadien auf die Schadensantwort	65
6.1.3	Einfluss von Schäden die während der Präparation induziert werden auf die Schadenswerte	69
6.1.4	Einfluss des Zeitpunktes der DNA-Anfärbung auf die ermittelten Schadenswerte	69
6.2	Mögliche Ursachen für relativ hohe Werte der Schadensparameter des Comet Assays bei neutralem pH	71
6.2.1	Durch den neutralen Comet Assay möglicherweise erfasste DNA-Schäden	72
6.2.2	Einfluss von RNA und Chromatinproteinen auf die Schadenswerte im Comet Assay	75
6.2.3	Einfluss der mikroskopischen Auswertung auf die Schadenswerte	77
7	Zusammenfassung	80
8	Literaturverzeichnis	83
9	Danksagung	86

1 Einleitung

Tumorerkrankungen stellen in der westlichen Welt eine der häufigsten Todesursachen dar. In Deutschland verstarben 2006 circa 211.000 Menschen an einer Tumorerkrankung. In der Rangliste der häufigsten Todesursachen nahmen sie mit einem Anteil von 25.7% an den Gesamttodesfällen den zweiten Platz ein [Quelle: Statistisches Bundesamt]. Nur an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems verstarben mehr Menschen (43.7% der Gesamttodesfälle). Die Suche nach effektiven Behandlungsstrategien von Tumorerkrankungen ist daher eine der großen Herausforderungen der Medizin.

In der onkologischen Therapie stellt die Radionuklidtherapie, neben „konventioneller Strahlentherapie“, Chirurgie und Chemotherapie eine wichtige Behandlungsoption dar. Gemeinsames Ziel aller Therapien ist eine möglichst komplette Zerstörung des Tumors unter Schonung von gesundem Gewebe. Eine Schädigung von gesunden Zellen ist gegenwärtig aber nicht immer zu vermeiden. Die dadurch ausgelösten Nebenwirkungen sind abhängig von den geschädigten Organen. Sind beispielsweise Darmanteile betroffen, können durch Mukosaschäden akut Diarrhöen auftreten oder sich als Spätfolge nach Radiotherapie Stenosen und Strikturen bilden. Im Thoraxbereich kann eine Perikarditis ausgelöst werden oder es können Schluckstörungen nach Ösophagusbestrahlung auftreten. Allen Nebenwirkungen ist gemeinsam, dass sie vom Patienten als unangenehm und belastend empfunden werden. Zusätzlich können durch die onkologische Therapie z.B. mit Chemotherapeutika oder durch Bestrahlung DNA-Schäden entstehen, die ihrerseits zur Ausbildung von Sekundärtumoren führen. Eine Weiterentwicklung bestehender Therapie-Methoden mit dem Ziel selektiver Abtötung von Tumorgewebe ist daher nötig.

Seit langem etabliert ist die Radionuklidtherapie als relativ selektives Therapieverfahren z.B. als Radioiodtherapie u.a. bei der Behandlung von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen. Der β -Emitter Iod-131 wird hierbei über den Natriumiodid-Symporter selektiv in Schilddrüsenzellen aufgenommen, reichert sich an und führt zum Zelltod [Seidl und Senekowitsch-Schmidtke, 2008].

Ein Ansatz zum selektiven Abtöten von Tumorzellen bietet sich auch, wenn der Tumor Oberflächenstrukturen exprimiert, die auf umliegendem, gesundem Gewebe nicht oder seltener vorkommen. Durch Entwicklung von Antikörpern, die gegen diese

Oberflächenstrukturen gerichtet sind und deren Kopplung mit Radionukliden, ist eine zielgenaue Abtötung des Tumors denkbar. Dieser Therapieansatz ist auch eine mögliche Option für Patienten mit diffusem Magenkarzinom deren Tumorzellen Mutationen im E-Cadherin-Gen aufweisen. Diese Tumorzellen exprimieren an ihrer Oberfläche ein verändertes E-Cadherin, das von einem Antikörper spezifisch erkannt wird. E(epithelial)-Cadherin ist ein transmembranäres Glykoprotein aus der Gruppe der Ca^{2+} -abhängigen Zelladhäsionsmoleküle. Es spielt eine Rolle bei der Zellkommunikation und dient der Integrität und Morphologie von epithelalem Gewebe [Fukudome *et al*, 2000]. Mutationen im E-Cadherin-Gen scheinen die Tumorerkrankung z.B. bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich [Schipper *et al*, 1991], bei Mamma-Karzinomen vom lobulären Typ [Berx *et al*, 1998] oder bei Magenkarzinomen [Becker *et al*, 1994] zu begünstigen. E-Cadherin besteht aus einer extra-zellulären Domäne, die Ca^{2+} bindet und für die Zell-Zell-Adhäsion sorgt, einem transmembranären Segment und einer cytoplasmatischen Domäne, die über Katenine mit Aktinfilamenten des Cytoskeletts interagiert (Abb. 1). Die extra-zelluläre Domäne besteht aus 5 doppelt vorhandenen, eigenständigen Abschnitten, die als E-Cadherin 1-5 bezeichnet werden und jeweils 3 Ca^{2+} -Ionen binden [Nagar *et al*, 1996].

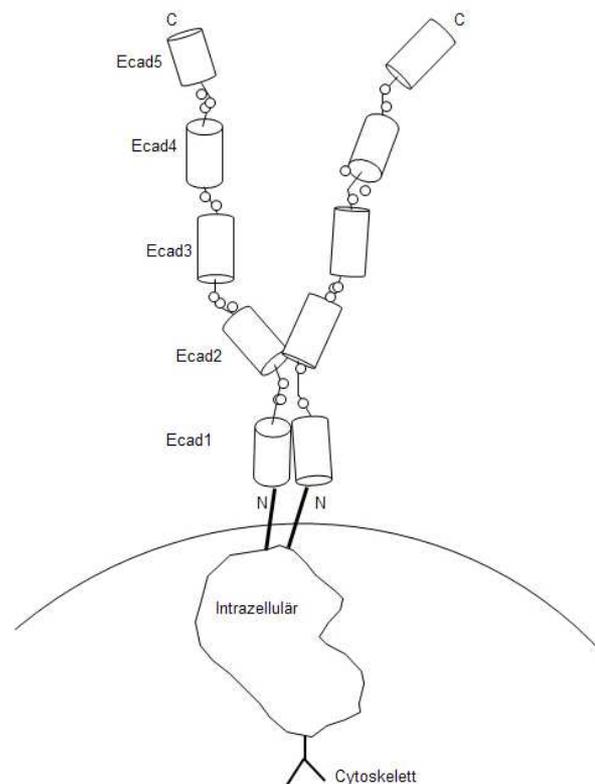


Abbildung 1: E-Cadherin mit extra-zellulärer, transmembranärer und intra-zellulärer Domäne [modifiziert nach Nagar *et al*, 1996]

Die Bindung von Ca^{2+} ist für die Funktionalität von E-cadherin von großer Bedeutung. Die Entfernung von Ca^{2+} bewirkt Konformationsänderungen in der extra-zellulären Domäne des Moleküls [Becker *et al*, 1994; Nagar *et al*, 1996].

Die Versuche in dieser Arbeit wurden mit Zellen eines diffusen Magenkarzinoms (Siegelringzellkarzinom) durchgeführt, die aus dem Aszites einer 28-jährigen Patientin isoliert wurden und werden als HSC45-M2 Zellen bezeichnet [Yanagihara *et al*, 1993]. HSC45-M2 Zellen weisen im Intron 9 eine In-frame-Deletion von 10 Basenpaaren auf. Dies führt zu einem fehlerhaften Splice-Vorgang der prä-mRNA. Es entsteht eine fertige mRNA ohne Exon 9 (d9-E-Cadherin). Exon 9 kodiert für etwa die Hälfte von E-cad3 inklusive der Ca^{2+} -Bindungsstelle [Fukudome *et al*, 2000]. Mittlerweile wurde ein Antikörper entwickelt – d9MAb – der spezifisch mutiertes d-9-E-Cadherin bindet, nicht aber den Wildtyp gesunder Zellen (Abb. 2) [Seidl und Senekowitsch-Schmidtke, 2008].

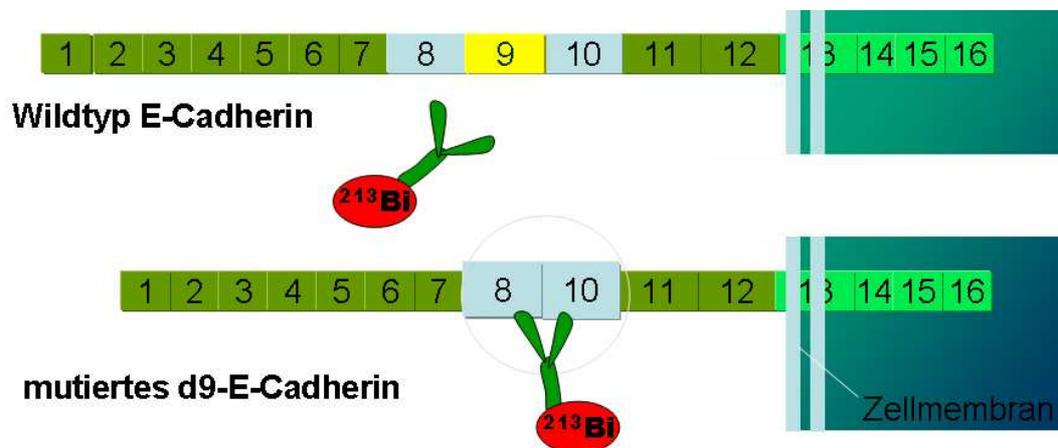


Abbildung 2: d9MAb-Antikörper bindet an d9-mutiertes E-Cadherin, nicht aber an Zellen mit Wildtyp E-Cadherin

Nach Kopplung von Radionukliden oder Zellgiften an den Antikörper sollten Konjugate entstehen, die Tumorgewebe mit Expression von mutiertem d9-E-Cadherin gezielt abtöten. Ein möglicher Therapieansatz könnte Antikörper gekoppelt mit α -Strahler verwenden. Beim α -Zerfall werden α -Partikel, d.h. Heliumkerne emittiert. α -Strahler verursachen auf Grund ihres hohen linearen Energietransfers (LET) häufig schwerwiegende DNA-Schäden, die zum Tod der betroffenen Zelle führen können. Die Reichweiten von α -Partikeln zwischen 40-80 μm entsprechen nur

etwa 4-8 Zelldurchmessern. Zellen, die das Radionuklid nicht binden, bleiben daher weitgehend ungeschädigt.

Auf Grund ihrer großen Masse und der geringen Reichweite bewirken α -Strahler dicht liegende Ionisierungsereignisse. An der DNA führen α -Strahler relativ häufig zur Entstehung von Doppelstrangbrüchen, da der Abstand zwischen zwei Ionisierungsereignissen nahezu der Distanz zwischen den DNA-Strängen entspricht [Seidl und Senekowitsch-Schmidtke, 2008]. Für einen sinnvollen Einsatz von α -Strahlern in der Tumortherapie, beispielsweise bei der oben diskutierten Therapieoption mit an d9MAb-Antikörper gekoppelte α -Strahler zur Behandlung von Patienten die an einem diffusem Magenkarzinom mit mutiertem E-cadherin leiden, ist ein grundlegendes Verständnis über ihre Wirkung auf zelluläre DNA nötig.

In dieser Arbeit wurden Magenkarzinomzellen und humane Lymphozyten sowohl α - als auch γ -Strahlung ausgesetzt. Als α -Strahler wurde Americium-241 benutzt, das durch β^- -Zerfall von Plutonium-241 entsteht. Der Atomkern von Americium-241 besteht aus 95 Protonen und 146 Neutronen. Americium-241 zerfällt unter Freisetzung von insgesamt 8 α -Partikeln zu stabilem Wismut-209. Dabei werden auch β^- -Partikel und γ -Strahlung freigesetzt (Abb. 3). Die Halbwertszeit von Americium-241 beträgt 432,6 Jahre [Quelle: www.strahlenschutz.cc].

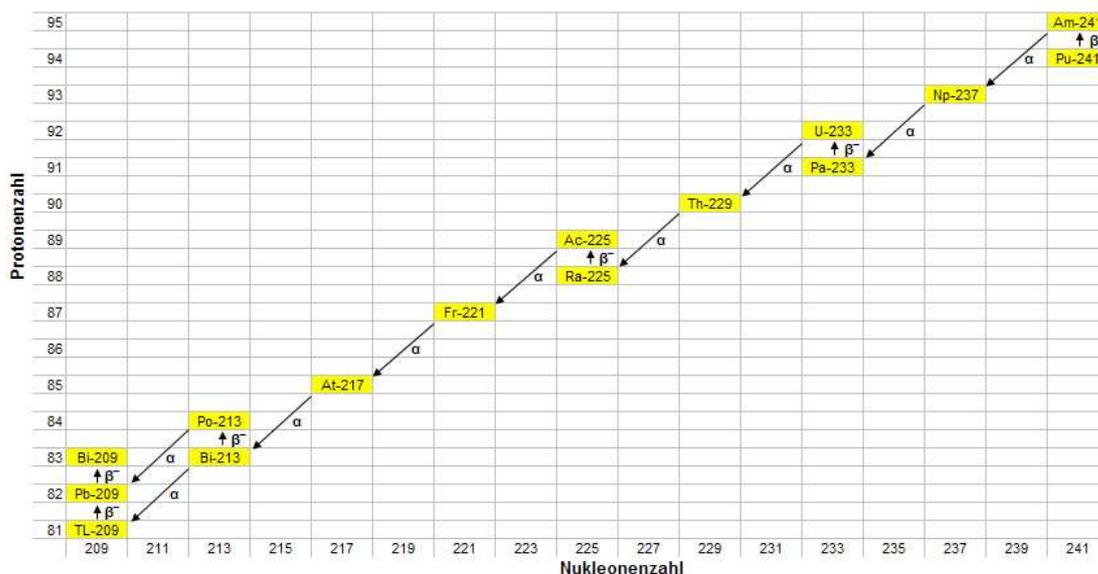


Abbildung 3: Americium-241 Zerfallsreihe (modifiziert nach www.periodensystem.net)

Für die γ -Bestrahlung der Zellen wurde eine Caesium-137 Strahlungsquelle genutzt. Anders als beim α -Zerfall findet bei γ -Strahlung keine Kernumwandlung statt. Ein angeregter Atomkern geht unter Aussendung eines Photons in einen Zustand geringerer Energie über. Weder die Massen- noch die Ordnungszahl ändern sich. Bei Interaktion mit der DNA entstehen vor allem Einzelstrangbrüche. Abhängig von der Bestrahlungsdosis können auch Doppelstrangbrüche auftreten, allerdings wesentlich seltener als nach Inkubation mit α -Strahlern. Zwar verfügt jede Zelle über eine Vielzahl von Reparatursystemen um DNA-Schäden zu beseitigen, allerdings sind nicht alle DNA-Strangbrüche für die Zelle gleich gut zu reparieren [Olive, 1998]. DNA-Doppelstrangbrüche sind sicherlich eine der schwerwiegendsten Zellschädigungen überhaupt [Jeggo und Löbrich, 2007]. Bei DNA-Einzelstrangbrüchen ist eine fehlerfreie Reparatur sehr viel wahrscheinlicher, da die im Zuge der Reparatur entstehende Lücke unter Benutzung des komplementären Stranges wieder aufgefüllt wird. Bei Doppelstrangbrüchen ist diese Hilfe nicht vorhanden. Eine fehlerfreie Reparatur ist möglich, aber schwieriger [Phillips *et al*, 2007; Jeggo und Löbrich, 2007; Downs, 2007; Van Gent und Van der Burg, 2007]. Doppelstrangbrüche können auf zwei verschiedene Arten repariert werden. Eine Möglichkeit ist die „homologe Rekombination“, die generell fehlerfrei abläuft. Diese findet vor allem in der S- und G2- Phase des Zellzyklus statt. Zunächst werden die Enden eines Doppelstrangbruchs derart abgeschnitten, dass überstehende 3'-Enden entstehen. An diese einzelsträngige DNA bindet die essentielle Rekombinase RAD51 zur Bildung aktiver Nukleoprotein-Filamente. Die Bindung von RAD51 an die DNA wird erleichtert durch die Einzelstrang-DNA bindenden Proteine RPA und RAD52. Das RAD51 Nukleoprotein-Filament vermittelt die Suche nach homologen Sequenzen auf der Schwesterchromatide und schließlich den Austausch von DNA-Strängen. Mit Hilfe von DNA-Polymerasen und –Ligasen können die DNA-Enden wieder zusammengeführt und der Doppelstrangbruch so repariert werden [Thorslund und West, 2007]. Wesentlich häufiger werden Doppelstrangbrüche bei Säugetierzellen allerdings mittels der „Nicht-homologen Endverknüpfung“ repariert, die jedoch zu Fehlern neigt und damit zum Verlust von genetischer Information führen kann. Dieser Reparaturmechanismus findet vor allem in der G1-Phase statt und beginnt damit, dass ein als Ku70/80 bezeichnetes Heterodimer an ein DNA-Ende bindet. An das so markierte DNA-Ende bindet dann die katalytische

Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK_{cs}). Die Autophosphorylierung der DNA-PK_{cs} reguliert die nachfolgenden Prozesse der „Nicht-homologen Endverknüpfung“, u.a. auch die Zugänglichkeit der DNA-Enden für weitere Proteine, die für die Reparatur benötigt werden. Kompatible DNA-Enden können schließlich direkt durch den Ligase IV-XRCC4 Komplex verknüpft werden. Diese Reaktion wird stimuliert durch den kürzlich entdeckten Faktor XLF, der mit XRCC4 interagiert. In vielen Fällen sind DNA-Enden nach einem Doppelstrangbruch zunächst nicht kompatibel. Ionisierende Strahlung z.B. erzeugt DNA-Enden, die geschädigte Basen und/oder Zucker enthalten, die vor der Ligation erst prozessiert werden müssen. Dies geschieht mit Hilfe von Nukleasen, DNA-Polymerasen und Polynukleotid Kinasen [Van Gent und Van der Burg, 2007].

Eine Methode zur Darstellung von DNA-Strangbrüchen ist der Comet Assay, der 1984 erstmals von Östling und Johanson beschrieben wurde. Damit lassen sich, in Abhängigkeit vom pH-Wert, bei dem der Comet Assay durchgeführt wird, DNA-Einzel- und/oder Doppelstrangbrüche unmittelbar nach Entstehung auf dem Niveau einer einzelnen Zelle nachweisen. Hierfür werden die Zellen nach Bestrahlung auf einen Objektträger aufgebracht und die Zell- und Kernmembranen werden permeabilisiert. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aus dem Zellkern zur Anode. Kleinere Fragmente wandern weiter als größere Teilstücke. Ungeschädigte, hochmolekulare DNA verbleibt im Kern. Nach Anfärbung mit einem fluoreszierenden Farbstoff stellt sich das Gesamtbild einer geschädigten Zelle unter dem Mikroskop als Komet dar. Die DNA-Fragmente bilden den „Schweif“, die ungeschädigte, hochmolekulare DNA den „Kopf“ (Abb. 4) [Bergqvist *et al*, 1998; Olive *et al*, 1990; Wojewódzka *et al*, 2002].

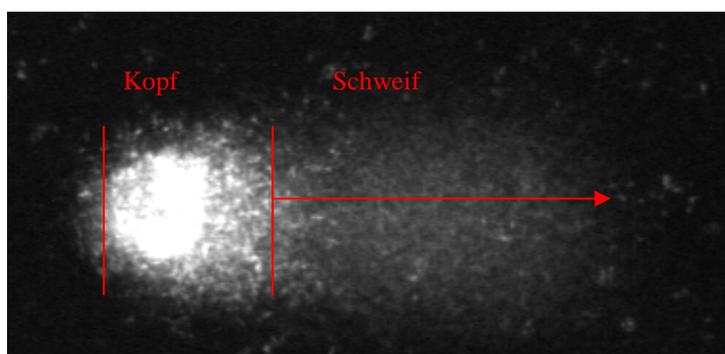


Abbildung 4: "Komet" einer HSC45-M2 Zelle nach α -Bestrahlung mit Americium-241 (3Gy) im alkalischen Comet Assay (TILL-Phototonics-System[®])

Die Art der im Comet Assay sichtbaren DNA-Fragmente ist abhängig vom pH-Wert, bei dem die Auftrennung der DNA-Stränge während der Elektrophorese erfolgt. Bei $\text{pH} > 13$ kommt es zur Hydrolyse der Wasserstoffbrücken zwischen den Basen der komplementären DNA-Stränge. Der Kometenschweif besteht aus DNA-Einzelsträngen, die aus Einzel- und Doppelstrangbrüchen resultieren. Bei einem pH von 8.5 bleiben die Wasserstoffbrücken dagegen erhalten und die komplementären DNA-Stränge werden nicht getrennt. Nachweisbar im Kometenschweif sind nur Fragmente, die die gesamte Doppelhelix durchtrennen [Wojewódzka *et al*, 2002]. Dieser Comet Assay wird als „neutraler“ Comet Assay bezeichnet. Eine Anwendung des Comet Assays in beiden pH-Bereichen sollte daher eine Unterscheidung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen ermöglichen.

2 Zielsetzung

Die Radionuklidtherapie stellt in der gegenwärtigen onkologischen Therapie eine wichtige Behandlungsoption dar. Als Nuklide kamen bisher vor allem β -Emitter zum Einsatz, da diese in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen und Methoden zur Kopplung an die Trägermoleküle etabliert sind. Zunehmend werden aber auch α -Strahler verwendet. Diese verursachen besonders häufig DNA-Doppelstrangbrüche, da die Distanz zwischen zwei Ionisierungen nahezu identisch ist mit dem Abstand der beiden DNA-Stränge. DNA-Doppelstrangbrüche können von der Zelle häufig nicht fehlerfrei repariert werden und führen oft zum Tod der betroffenen Zelle [Seidl und Senekowitsch-Schmidtke, 2008]. Es besteht daher großes Interesse, die Wirkung von α -Strahlern im Hinblick auf die Induktion von DNA-Schäden noch besser zu verstehen. Mittels Comet Assay sollten in dieser Arbeit die von dem α -Strahler Americium-241 gesetzten DNA-Strangbrüche in Einzel- und Doppelstrangbrüche unterschieden werden. Der Comet Assay erlaubt es DNA-Schäden auf dem Niveau der einzelnen Zelle nachzuweisen. Je nach pH-Bereich bei dem der Comet Assay durchgeführt wird, kommen hierbei DNA-Einzel-und/oder Doppelstrangbrüche zur Darstellung [Bergqvist *et al*, 1998; Olive *et al*, 1990; Wojewódzka *et al*, 2002]. Zum Vergleich wurden zusätzliche Bestrahlungen mit dem γ -Strahler Caesium-137 durchgeführt. Als Zellen wurden Magenkarzinomzellen vom diffusen Typ ausgewählt, da ein tumorspezifischer Antikörper verfügbar ist, der gegen diese Zellen gerichtet ist und somit für eine α - Radionuklidtherapie verwendet werden kann. Um Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien darzustellen, wurden die Versuche auch mit humanen Lymphozyten durchgeführt.

3 Material

3.1 Zellen

3.1.1 Magenkarzinomzellen

Die HSC45-M2 Zellen wurden von der Nuklearmedizinischen Klinik der TU München zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um Siegelringkarzinomzellen, die aus dem Aszites einer 28jährigen Patientin isoliert wurden [Yanagihara *et al*, 1993]. Diese Zellen weisen in ihrem Genom im Bereich des Intron 9 eine In-frame-Deletion von 10 Basenpaaren auf. Dies hat einen fehlerhaften Splice-Vorgang der prä-mRNA zur Folge, wodurch eine mRNA ohne Exon 9 entsteht [Fukudome *et al*, 2000]. Dies führt letztendlich dazu, dass die Zellen auf ihrer Oberfläche ein mutiertes E-cadherin exprimieren, das als d-9-E-cadherin bezeichnet wird.

3.1.2 Humane Lymphozyten

Die humanen Lymphozyten wurden am Versuchstag aus frischem venösem Blut isoliert.

3.2 Medien und Lösungen

Medium: DMEM (Biochrom , FG 0435) w 3,7 g/l NaHCO₃, w 4,5 g/l Glucose, w stabiles Glutamin, w NaPyruvat, 10% FBS (Biochrom, S 0115), 1% Pen/Strep (Biochrom, A 2213)

Zum Ablösen der Zellen: 500 ml PBS (Biochrom, L 1825), 15 ml 1% EDTA (Biochrom, L 2113)

Zum Einfrieren der Zellen: DMSO Freeze Medium (Origen, vertrieben von Biochrom)

Phytohämagglutin- Stammlösung: PHA-I (5 ml, Biochrom), 5 ml steriles Wasser für Injektionszwecke

Lysispuffer 1: 44,5 ml Lysispuffer 2, 0,5 g SLS, 500 µl Triton X 100, 5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

Lysispuffer 2: 250 ml 0.5 M NaCl, 100 ml 0.5 mM NaEDTA (pH 10), 5 ml 1 M Tris/HCL

Alkalischer Elektrophorese-Puffer: 30 ml 10 M NaOH, 20 ml 0.5 M Na₂EDTA (pH 10), 5 ml DMSO, H₂O_{dd} ad 1 Liter

TA Puffer: 45 ml 3 M NaAc, 45 ml 1 M Tris HCL, 900 ml H₂O_{dd}

Neutralisationslösung: 5 ml Ammoniumacetat, 45 ml 100 % EtOH

Stammlösung: 3 µl SYBR[®] Green, 50 µl DMSO

Färbelösung: 745 µl H₂O_{dd}, 50 µl DMSO, 200 µl Vectashield, 5 µl Stammlösung

3.3 Chemikalien

- Agarose, Low melting (Serva)
- Ammoniumacetat (Merck, 101115)
- DMSO (Merck, 100765)
- EDTA Dinatriumsalz (Sigma, E 5513)
- Ethanol_{abs} pro analysi (Merck, 100983)
- Trypanblau (Merck, 11732)
- N- Laurylscarcoisin Natriumsalz (Sigma, L9150)
- Natriumacetat (Merck, 106268)
- Natriumchlorid (Roth, 3957.1)
- Natriumhydroxid (Roth, p031.2)
- SYBR- Green[®] (Molecular Probes, 1801)
- Triton X -100 (Fluka)
- Vectashield[®] (Vector Laboratories)

3.4 Verbrauchsmaterialien

- Cellstar mit Filterkappen 175 cm² (Greiner-bio-one, Best.Nr. 6601745)
- Objektträger ESW-370, sandgestrahlt mit Fenster (Erie Scientific)
- Sterilfiltereinheit 500 ml (Nalgene, Z37,821-5)
- Röhren für Zellkultur 15 ml (Nunc)
- Röhren für Zellkultur 50 ml (Nunc)
- Reaktionsgefäße, safe lock (Eppendorf)

3.5 Geräte und Computerprogramm

- Autoklav (Tuttnauer)
- Bestrahlungsanlage Americium- 241 (GSF/LMU, Dr. Roos)
- Elektrophoreseapparatur, Supersurb HE 100 (Amersham Pharmacia)
- Epifluoreszenzmikroskop (invers) (Zeiss Axiovert 135)

- Färbetröge, Typ Hellendahl (Hecht Assistent)
- Monochromator (TILL Phototonics, München)
- Neubauer-Zählkammer (Hecht- Assistent)
- Objektive für Fluoreszenzmikroskop (Zeiss,40x Plan-Neoflur)
- Pipette, Transferpette[®], 0-10µl (Brand)
- Pipette, 20-200 µl (Eppendorf)
- Pipette, 100- 1000 µl (Eppendorf)
- Präzisionswaage (Sartorius L 2200 P)
- Spannungsquelle Power Pac 1000 (BioRAD)
- Thermomixer (Eppendorf)
- Tischzentrifuge für Eppendorfgefäße (Hettich Universal 30 F)
- Tischzentrifuge für 15/50 ml Röhrchen (Hettich Rotana 460 R ($r_{\max}=100\text{mm}$))
- Videokamera (Sony XC-7500)
- Zentrifuge (Großvolumig) (Beckmann Coulter Series J 2-21, Rotor Beckmann coulter JS- 13.1 ($r_{\max}=142\text{mm}$))
- Bildanalyseprogramm für Comet Assay (VisCOMET, Impuls GmbH)

4 Methoden

4.1 Kultivierung der HSC45-M2 Zellen

Zur Anzucht der Zellen wurde der Inhalt eines CryoVials in 40 ml Nährmedium aufgetaut. Es folgte die Zentrifugation (1200 rpm/3 min). Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. Die suspendierten Zellen wurden in eine Zellkulturflasche (175 cm²) mit 30 ml Medium überführt. Für ca. 3 Tage verblieben die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Hatte sich ein ausreichender Zellrasen gebildet, erfolgte die Passagierung. Hierzu wurde verbrauchtes Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und 6 ml 1mM PBS/EDTA zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Zellen durch Abklopfen abgelöst, gründlich resuspendiert, zu 10 ml Medium gegeben und mittels Zentrifugation (1200 rpm/3 min) pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und dem Zellpellet wurden 5ml Medium zugegeben. Nach Resuspendierung wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (175 cm²) mit je 30 ml Medium verteilt. Nicht benötigte Zellen wurden in einer Konzentration zwischen 2x10⁶ bis 10x10⁶ Zellen pro CryoVial in DMSO Freeze Medium eingefroren. Hierzu wurden die Zellen zunächst für 4-24 Stunden im Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte der Transfer in den Cryobehälter mit flüssigem Stickstoff (-196°C).

4.2 Gewinnung humaner Lymphozyten

Die humanen Lymphozyten wurden am Tag der α -Bestrahlung aus frischem, venösem Blut isoliert. Dazu wurden 150 μ l Vollblut mit 450 μ l 0,9% NaCl in einem Eppendorfreaktionsgefäß vermischt. Die Mischung wurde mit 600 μ l Percoll unterschichtet. Die Trennung der Lymphozyten und des Plasmas wurde durch Zentrifugation (1200 rpm/10 min) beschleunigt. Der sichtbare Lymphozytenring wurde abgenommen. Davon wurden 500 μ l mit 1500 μ l 0,9% NaCl in einem Eppendorfreaktionsgefäß vermischt und zentrifugiert (1200 rpm/ 2 min). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das gewonnene Lymphozyten-Pellet wurde in einer Phytohämagglutinin-Stammlösung resuspendiert.

4.3 Bestrahlung der Zellen

4.3.1 Kultivierung von HSC45-M2 Zellen und Lymphozyten auf Mylarfolie (2 μ m) zur Vorbereitung der α -Bestrahlung

Die α -Bestrahlung der Zellen erfolgte mittels einer externen Americium-241-Quelle. Um einen unmittelbaren Kontakt der Zellen zur Bestrahlungsquelle zu gewährleisten, mussten diese auf einer nur 2 μ m dicken Mylarfolie kultiviert werden, die in einen Edelstahlring eingespannt war (Abb. 5 + Abb. 6). Dies war wichtig, da α -Partikel nur eine Reichweite von 40-100 μ m aufweisen. Um den Abstand der Zellen zur Americium-241-Quelle so gering wie möglich zu halten, war darauf zu achten, dass die eingespannte Mylarfolie über den Edelstahlring hinausragte. Zur besseren Adhäsion der HSC45-M2 Zellen wurde die Mylarfolie vor dem Aufbringen der Zellen mit 3 ml 0,8 M NaOH für 5 Minuten angeätzt. Anschließend wurde die Folie dreimal mit Aqua dest. gespült. Bei 150°C wurden die mit Folie bespannten Ringe für 4 Stunden sterilisiert. Dann erst erfolgte das Aufbringen der Zellen auf die Mylarfolie.

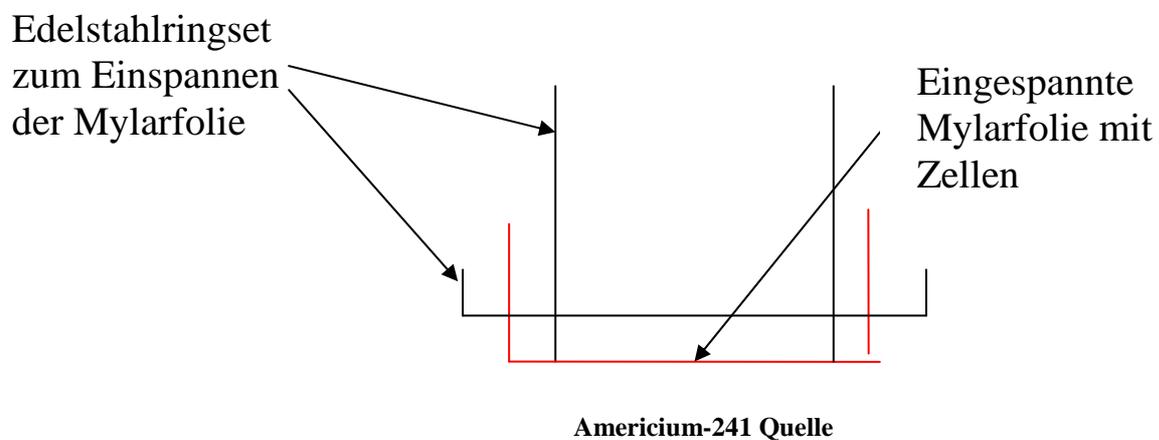


Abbildung 5: Schematische Darstellung der zur α -Bestrahlung benutzten Edelstahlringe



Abbildung 6: Zur α -Bestrahlung der HSC45-M2 Zellen und Lymphozyten benutzte Edelstahlringe mit eingespannter Mylarfolie (entwickelt von Dr. Roos, Helmholtz-Zentrum (Quelle: BfS))

Zur Aussaat wurden pro Edelstahl-Ring $1,5 \times 10^6$ Zellen in 3 ml Medium suspendiert und auf die Folie gegeben. Der Ring wurde mit einer Petrischale abgedeckt und zur Adhäsion der Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert.

4.3.2 Vorbereitung der Lymphozyten

Die α -Bestrahlung der Lymphozyten wurde ebenfalls in den mit Mylarfolie bespannten Edelstahlringen durchgeführt. Die Lymphozyten wurden am Tag der Bestrahlung aus frischem, venösem Blut gewonnen. Da die Lymphozyten als Suspensionszellen nicht auf der Mylarfolie adhären, war ein Anätzen der Folie hier unnötig. Die Edelstahlringe wurden daher nach Einspannen der Mylarfolie nur hitzesterilisiert ($150^\circ\text{C} / 4 \text{ h}$).

4.3.3 α - Bestrahlung der Zellen mit Americium-241

Die Bestrahlung wurde in der Americium-241-Bestrahlungsanlage am Helmholtz-Zentrum durchgeführt. Vor der Bestrahlung wurde das Medium aus den Edelstahlringen abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gespült. Das Spülen mit PBS diente der Entfernung von Zelltrümmern und von nicht adhären Zellen. Um DNA-Reparaturprozesse zu verhindern, wurden die Zellen während der Bestrahlung durch ein mit Eis gefülltes Becherglas gekühlt. Bei einer Dosisleistung von circa $0,1 \text{ Gy} / \text{min}$ wurde für 1 Gy 600 Sekunden, für 2 Gy 1200 Sekunden und für 3 Gy 1800

Sekunden bestrahlt. 85 % der α -Partikel wiesen eine Energie von 5,49 MeV auf. Der Rest größtenteils 5,44 MeV.

Für eine möglichst homogene Bestrahlung rotierte die Quelle. Zusätzlich wurden durch einen sich drehenden Kollimator alle Teilchen abgeschirmt, die mehr als 12% vom geraden Austritt der Strahlen abwichen. Die Americium-241-Quelle, der Kollimator und die Verschluss-scheibe wurden mit Helium begast. Hierdurch wurde der Energieverlust der α -Teilchen um mehr als den Faktor 5 gegenüber Luft verringert. Zur Verdeutlichung des Aufbaus der Americium-241-Bestrahlungsanlage dienen die Abbildungen 7 und 8.

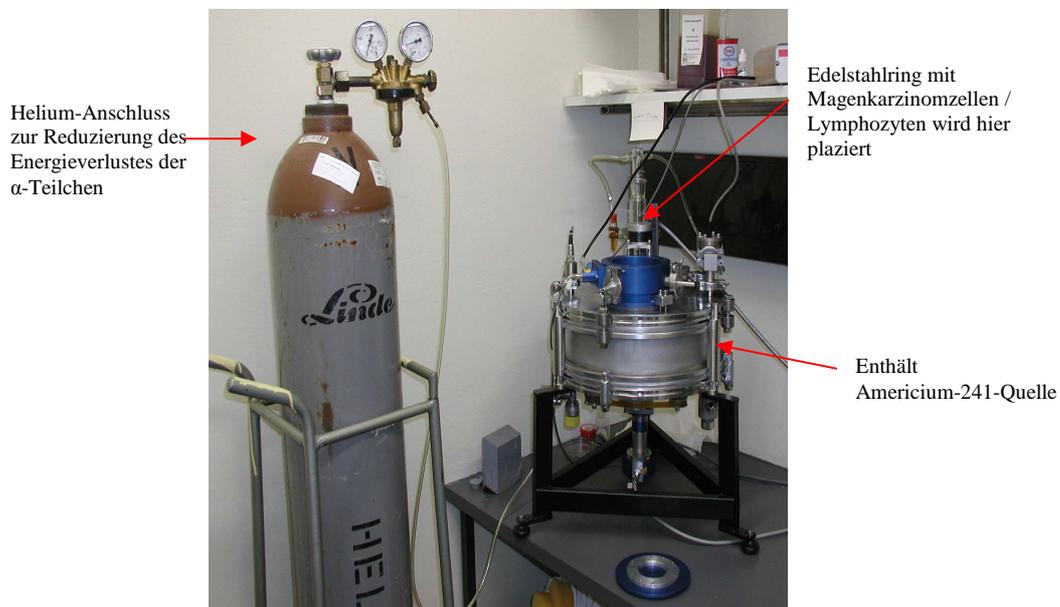


Abbildung 7: Americium-241 Bestrahlungsanlage am Institut für Strahlenbiologie des Helmholtz-Zentrums (Quelle: BfS)

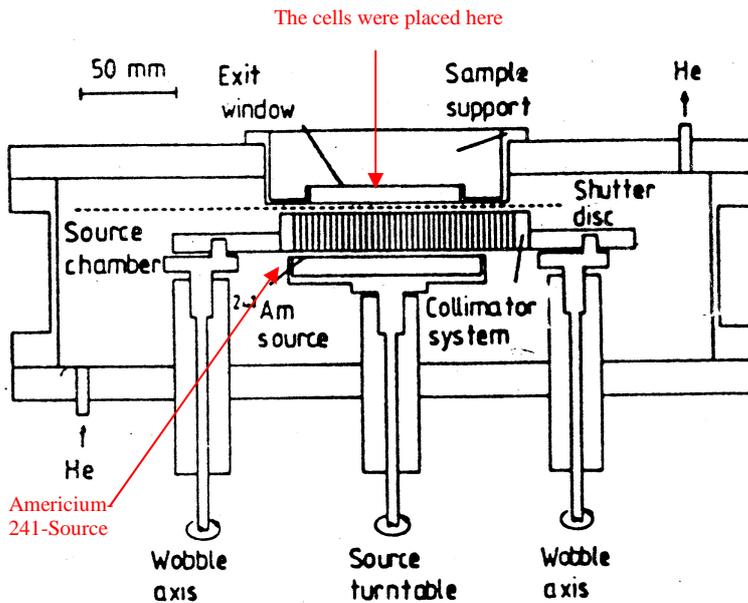


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Americium-241 Bestrahlungsanlage (Quelle: BfS)

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen von der Mylarfolie abgeschabt, je nach Zelldichte in 100 bzw. 150 μl 0,9% NaCl suspendiert und bis zur Durchführung des Comet Assays auf Eis gelagert.

4.3.4 γ -Bestrahlung der Zellen mit Caesium-137

Um annähernd gleiche Bedingungen für α - und γ -Bestrahlung der Zellen zu erhalten, wurden die Zellen auch einen Tag vor der γ -Bestrahlung in Edelstahlringe mit eingespannter Mylarfolie ausgesät. Vor der Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Mit Hilfe eines Spatels wurden die Zellen von der Folie abgeschabt. Die Zellen wurden dann in 0,9% NaCl in einer Konzentration von 5000 Zellen / μl suspendiert und zu je 10 μl (50.000 Zellen) in Eppendorf-Gefäße transferiert. Die γ -Bestrahlung erfolgte in der Bestrahlungsanlage HMW D-2000, die Caesium-137 mit einer Dosisleistung von 40 Gy/h bei einer Aktivität von 148 TBq (1983) als Strahlungsquelle nutzt (Abb. 9). Pro 1 Gy wurden 1,5 Minuten bestrahlt.



Abbildung 9: Caesium-137-Quelle des Helmholtz-Zentrums (Quelle: BfS)

Zur Unterdrückung von DNA-Reparaturprozessen wurden die Zellen während und nach der Bestrahlung auf Eis gelagert.

4.4 Comet Assay

4.4.1 Aufbringen der Zellen auf Objektträger

Für den Comet Assay werden mit Agarose beschichtete Objektträger benötigt. Die Agarose-Lösung wurde hierfür nach folgendem Schema hergestellt: 0,01 g Agarose wurden in ein Zellkulturröhrchen (50 ml) eingewogen und in 10 ml 0,6 M NaCl gelöst. Nach kurzem Schütteln quoll die Agarose-NaCl-Suspension im Wasserbad (50°C / 10 min). Um Klümpchenbildung zu vermeiden, wurde die Suspension anschließend in der Mikrowelle mit lose aufgeschraubtem Deckel aufgeköcht und kurz gevortext. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Agarose-Suspension wurde in Eppendorfgefäße à 1 ml aliquotiert und bis zur Verwendung im Thermomixer (50°C / 900 rpm) flüssig gehalten. Gleichzeitig wurden spezielle Objektträger mit aufgerautem Randbereich und klarem Fenster (ESW-370, Erie Scientific, Portsmouth) mit 70% EtOH entfettet, getrocknet und auf einer Wärmeplatte (40°C) angewärmt. Auf jedem Objektträger wurden 200 µl flüssige 0,1% Agaroselösung gleichmäßig mit einem Ausstrichspatel verteilt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zum Aufbringen der bestrahlten Zellen auf die Objektträger wurde zusätzlich 0,5% Agarose benötigt, die nach vergleichbarem Schema wie die 0,1% Agarose hergestellt wurde.

Je 10 µl einer Zellsuspension wurden mit 100 µl flüssiger, 50°C warmer 0,5% Agarose vermischt. Das Gemisch wurde unverzüglich auf vorgewärmte (50°C), Agarose beschichtete Objektträger pipetiert. Die Zellen wurden mit Deckgläschen abgedeckt, die vorher mit einer 0,1% Triton X-Lösung über Nacht entfettet worden waren. Durch Überführung der Objektträger auf eine Kühlplatte (4°C) verfestigte sich die Agarose und schloss die Zellen ein. Die Deckgläschen wurden entfernt und die Objektträger in Färbetröge mit vorgekühltem Lysispuffer 1 transferiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei werden Zell- und Kernmembran durch die Detergenzien SLS und TritonX100, die hohe NaCl-Konzentration sowie den Ca²⁺-Chelator EDTA permeabilisiert und aufgelöst.

4.4.2 Elektrophorese der DNA-Fragmente bei alkalischem pH

Die Elektrophorese bei alkalischem pH erfolgte an Hand eines modifizierten Protokolls von Gomolka *et al*, 2005. Die Objektträger wurden hierfür in 50 ml vorgewärmten Lysispuffer 2 transferiert und bei 37°C für 1 h im Wasserbad inkubiert. Dies diente der Entfernung nukleärer Proteine. In die Elektrophoresekammer wurden pro Reihe 6 Objektträger gelegt (Abb. 10). Zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge equilibrierten die Proben für 20 min im Elektrophorese-Puffer ohne angelegte Spannung. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei 24 V (0.8 V / cm) und 4°C für 30 min.

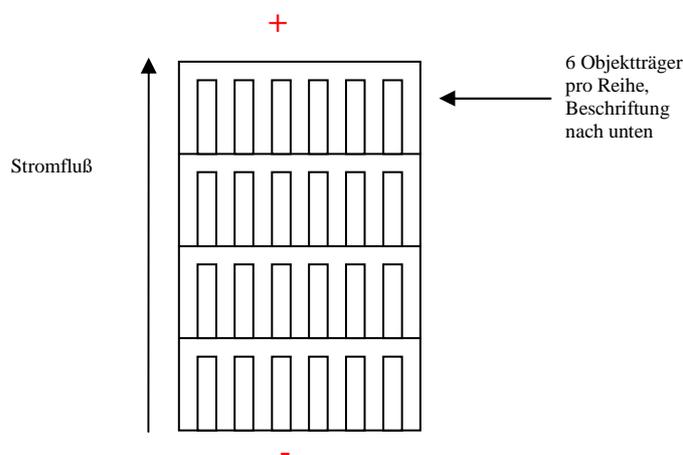


Abbildung 10: Elektrophorese-Kammer mit Anordnung der Objektträger

4.4.3 Elektrophorese der DNA-Fragmente bei neutralem pH

Die Elektrophorese bei neutralem pH wurde an Hand eines modifizierten Protokolls von Wojewódzka *et al*, 2001 durchgeführt.

Die Objektträger wurden dabei nach Inkubation im Lysispuffer 1 in den TA-Puffer transferiert und verblieben darin 1 h bei 4°C. Die Elektrophorese erfolgte im TA-Puffer bei 14 V (0.8 V / cm) und 4°C für 60 min.

4.4.4 Färbung der DNA

Nach Ende der Elektrophorese wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für 30 min in Neutralisationslösung inkubiert. Dabei wurde die DNA präzipitiert und fixiert. Zur Dehydrierung wurden die Objektträger über Nacht in 100% EtOH aufbewahrt. Um die Entstehung von Rissen in der Agarose-Schicht zu verhindern, wurden die Objektträger anschließend bei Raumtemperatur für 5 min in 70% EtOH gestellt und schließlich auf Küchenkrepp getrocknet. Vor der Färbung wurden die Objektträger für 2 x 10 min in H₂O_{dd} gewaschen. Pro Objektträger wurden 100 µl Färbelösung aufgetropft, mit einem Deckglas abgedeckt und nach 90 min Inkubationszeit wurden die Präparate bei 40facher Vergrößerung an einem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Färbung wurde SYBR-Green[®] benutzt, ein Cyanin-Farbstoff, der DNA bindet [Zipper *et al*, 2004]. Mit Hilfe eines Monochromators und einem entsprechendem Filtersystem für SYBR[®]-Green erfolgte eine Anregung des Fluorochroms bei einer Wellenlänge von 461 nm mit einer Emission bei 510 nm. Pro Objektträger wurden 50 Zellen mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms VisCOMET[®] ausgewertet. Überlappende Kometen und apoptotische Zellen wurden ausgeschlossen.

Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Durchführung von neutralem und alkalischem Comet Assay sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung der wichtigsten Schritte des alkalischen und neutralen Comet Assays

Alkalischer pH	Gemeinsame Schritte	Neutraler pH
	Bestrahlung + Auftropfen der Probe	
	Lysispuffer 1	
Lysispuffer 2		Waschen in TA- Puffer
Elektrophorese bei pH > 13		Elektrophorese bei pH 8.5
	DNA-Präzipitation + Fixierung	
	Dehydrierung (EtOH 100%)	
	Rehydrierung (EtOH 70 %)	
	Wässern + Färben	

4.4.5 Bewertung der Qualität und Quantität der DNA-Schäden

Grundlage für die Schadensbetrachtung ist die Unterscheidung in Kopf (hochmolekulare, unfragmentierte DNA) und Schweif (fragmentierte DNA) des Kometen. Zur Charakterisierung der Kometen wird unter anderem der prozentuale Anteil der DNA im Schweif, die so genannte „**Tail DNA%**“ benutzt. Berechnet wird sie mittels VisCOMET[®] nach folgender Formel:

100 – Head DNA% [Quelle: www.cometassayindia.org/definitions.htm]

Je stärker die DNA fragmentiert wurde, desto mehr DNA-Fragmente befinden sich im Schweif und desto intensiver ist hier das Fluoreszenzsignal.

Der Parameter „**Tail Length**“ misst die Schweiflänge. Sie wird von den verschiedenen Auswertesystemen in unterschiedlichen Dimensionen (µm oder Pixel) angegeben. Das in dieser Arbeit verwendete TILL Phototonics[®]-System gibt die „Tail Length“ in Pixel an. Für Probleme beim Vergleich von Daten sorgt zusätzlich eine uneinheitliche Definition der „Tail Length“, da sie sowohl von der Mitte des Kopfes, als auch von dessen Rand aus, gemessen wird. In dieser Arbeit wurde die „Tail Length“ vom Rand des Kopfes aus gemessen. Die „Tail Length“ nimmt mit

zunehmender Bestrahlungsdosis zu (bis zum Erreichen des Sättigungswertes), da bei höheren Dosen eine stärkere Fragmentierung der DNA auftritt. Je kleiner die entstandenen DNA-Bruchstücke sind, desto weiter wandern sie im elektrischen Feld der Elektrophorese. Der Parameter „**Tail Moment Olive**“ vereinigt die Schweiflänge und den prozentualen Anteil der DNA im Schweif. VisCOMET[®] benutzt zur Berechnung folgende Formel:

$$\text{Tail Moment Olive} = (\text{ICG}-\text{CG}_H) \times \text{Tail DNA}\%$$

CG = center of gravity of the tail weighted by grey values (sinngemäße deutsche Übersetzung: Intensitätsschwerpunkt des Schweifes an Hand gemessener Graustufen)

CG_H = center of gravity of the head weighted by grey values (sinngemäße deutsche Übersetzung: Intensitätsschwerpunkt des Kopfes an Hand gemessener Graustufen)

[Quelle: www.cometassayindia.org/definitions.htm]

Bei Auswertung mit dem halbautomatischen TILL Phototonics[®]-System werden die Kometen jeweils vom Betrachter ausgewählt, die Berechnung der Schadensparameter („Tail DNA%“, „Tail Length“, „Tail Moment Olive“) übernimmt das Computerprogramm. Der Kopf des Kometen wird dabei von dem Computerprogramm durch eine Symmetriebetrachtung am Intensitätsschwerpunkt definiert. Der Schweif durch Festlegung von Schwellenwerten. Zur Auswertung der Messwerte kann sowohl der Median als auch der Mittelwert herangezogen werden. In dieser Arbeit wurde durchgängig der Median als Messwert benutzt. Der Median ist ein lagetypischer Messwert. Er bezeichnet die Grenze zwischen zwei gleich großen Hälften, in diesem Fall der Anzahl der Messwerte. Der Median wird, im Gegensatz zum Mittelwert, von einzelnen Extremwerten weniger stark beeinflusst.

Berechnet wird der Median anhand folgender Formel:

$$\text{Für eine gerade Anzahl von } n: \quad x^\circ = x_{\frac{(n+1)}{2}}$$

$$\text{Für eine ungerade Anzahl von } n: \quad x^\circ = \frac{1}{2} \left(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n+1}{2}} \right)$$

Dargestellt wurden die Ergebnisse als so genannte Boxplots, erstellt mit Hilfe des Computerprogramms SPSS Statistics 17.0. Die rechteckige Box eines Boxplots umfasst den Interquartilsabstand der Werte (IQR = interquartile range) (Abb. 11). Dieser repräsentiert die mittleren 50% der gemessenen Werte. Der Median wird als Balken innerhalb der Box dargestellt. Die Linien, die von der Box nach oben bzw. unten abgehen, werden als Whisker bezeichnet. Der Whisker endet jeweils bei dem

letzten Wert, der noch innerhalb einer Grenze von $1,5 \times \text{IQR}$ liegt (Definition nach John W. Tukey). Werte, die außerhalb dieser Grenze liegen werden als Ausreißer bezeichnet und in dem benutzten Programm SPSS Statistics 17.0 durch Sterne oder Punkte markiert. Die Ausreißer werden in „milde“ und „extreme“ Ausreißer unterteilt. Milde Ausreißer liegen in einem Bereich der zwischen $1,5 \times \text{IQR}$ und $3 \times \text{IQR}$ liegt und werden als Punkte dargestellt. Extreme Ausreißer liegen in einem Bereich größer als $3 \times \text{IQR}$ und werden als Sterne abgebildet.

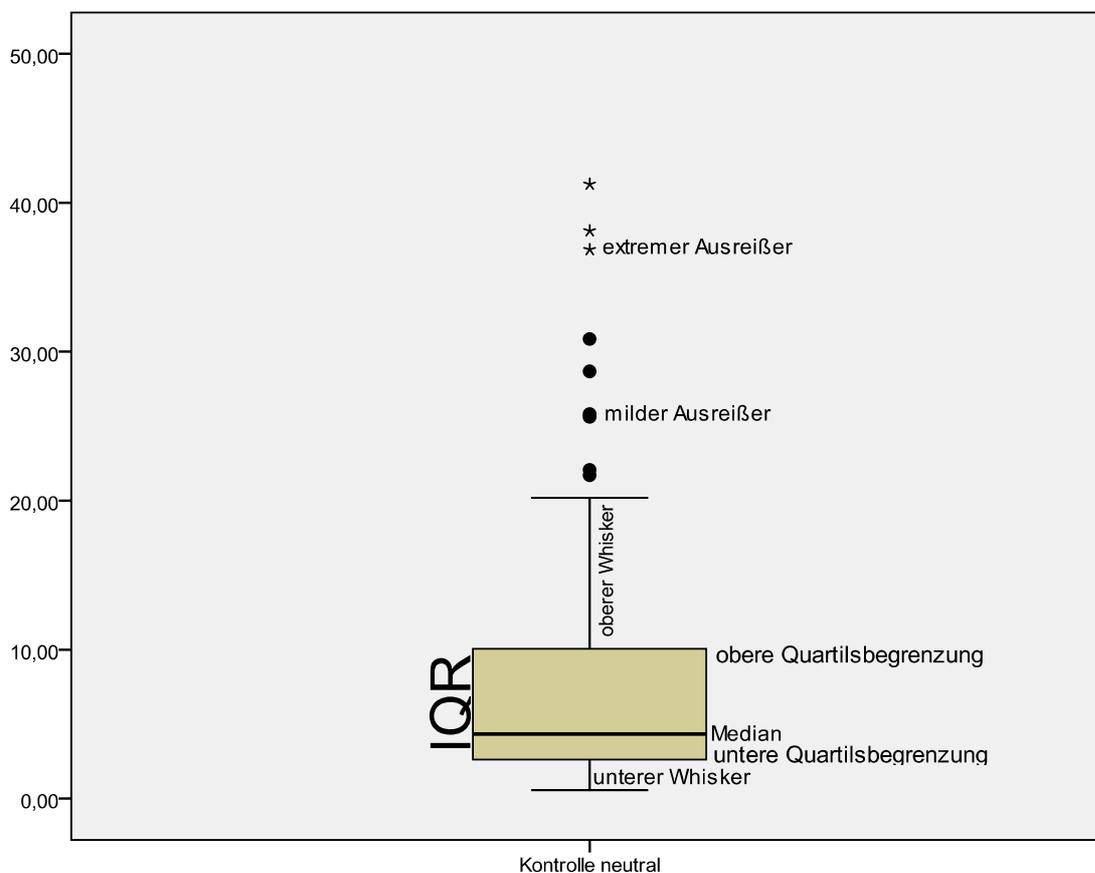


Abbildung 11: Beispiel für einen Boxplot erstellt mit SPSS Statistics 17.0

Zur statistischen Bewertung der Ergebnisse wurde der Mann-Whitney-Test benutzt. Hierbei handelt es sich um einen Homogenitätstest, der die Signifikanz der Übereinstimmung zweier unabhängiger Variablen überprüft. Dabei wird jeder Wert der Gruppe A mit jedem Wert der Gruppe B verglichen. Hat Stichprobe A n_1 -Werte und Stichprobe B n_2 -Werte werden $n_1 \times n_2$ Vergleiche angestellt. Der durchgeführte zweiseitige Test prüft damit ob $A = B$ (Nullhypothese). Das Signifikanzniveau wurde

in dieser Arbeit auf 5% festgelegt, d.h. jedes berechnete $p < 0,05$ bedeutet, dass sich die zwei Proben statistisch signifikant unterscheiden. Sind die Unterschiede zwischen beiden Proben dagegen nicht statistisch signifikant, so ergibt sich ein $p > 0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 Bestrahlung der HSC45-M2 Zellen mit dem α -Emitter Americium-241

Die HSC45-M2 Zellen wurden in drei unabhängigen Versuchen mit Americium-241 bestrahlt. Mit Ausnahme des ersten Versuches wurden dabei Dosen von 1, 2 und 3 Gy appliziert. Im ersten Versuch fand keine Bestrahlung mit 1 Gy statt. Pro Bestrahlungsdosis wurden aus dem Edeltahlring jeweils 4 Proben entnommen (2x alkalischer Comet Assay, 2x neutraler Comet Assay). Pro Probe wurden 50 Zellen analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei Versuche erst einzeln dargestellt und dann zu einem gemeinsamen Ergebnis zusammengefasst.

5.1.1 Versuch 1

Im alkalischen Comet Assay stellte sich im 1. Versuch für die Parameter „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“ eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung dar (Abb. 12, Abb. 14, Tab. 2, Tab. 4). Für den Parameter „Tail Length“ ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Schadenswerten nach Bestrahlung mit 2 Gy und 3 Gy feststellen ($p = 2,475$) (Abb. 13, Tab. 3). Im neutralen Comet Assay ergab sich für die Parameter „Tail DNA%“ und „Tail Length“ eine statistisch signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung (Abb. 12, Abb. 13, Tab. 2, Tab. 3). Beim „Tail Moment Olive“ jedoch zeigte sich zwischen den Schadenswerten nach 2 Gy- und 3 Gy-Bestrahlung bei neutralem pH keine statistisch signifikante Steigerung ($p = 0,087$) (Abb. 14, Tab. 4).

Beim Vergleich der Ergebnisse beider pH-Bereiche fielen statistisch signifikant höhere Werte im neutralen Comet Assay für die „Tail Length“ von HSC45-M2 Zellen nach Bestrahlung mit 3 Gy ($p = 0,015$) und für den „Tail Moment Olive“ nach einer Dosis von 2 Gy ($p < 0,001$) auf. Dagegen wies der alkalische Comet Assay einen signifikant höheren „Tail Length“-Schadenswert nach Bestrahlung mit 2 Gy ($p < 0,001$) auf. Die übrigen Ergebnisse in beiden pH-Bereichen unterschieden sich nicht statistisch signifikant.

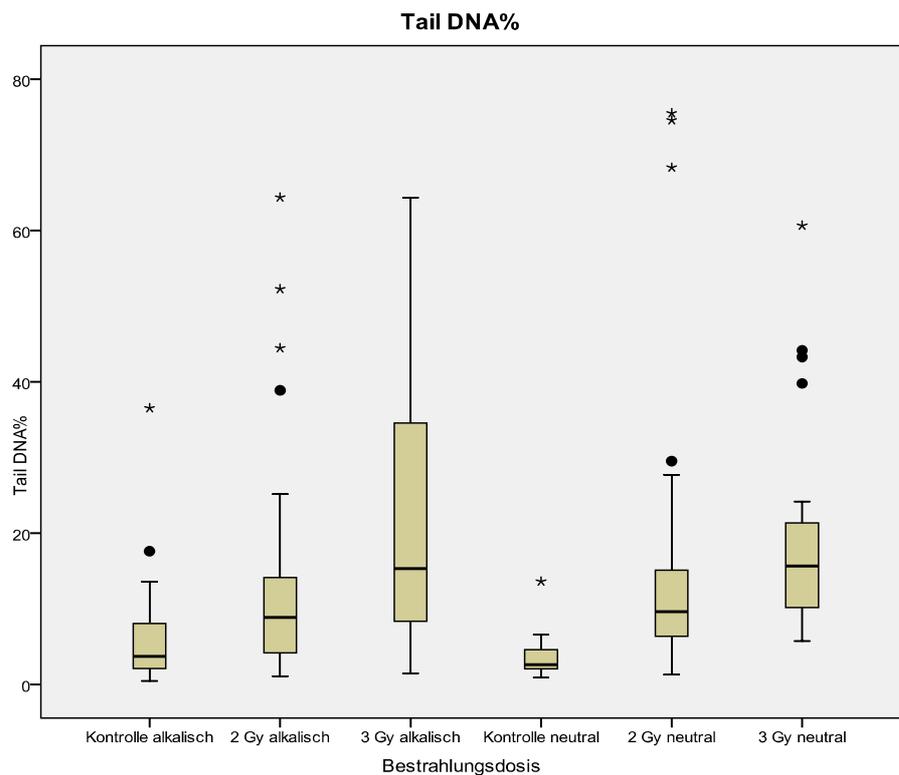


Abbildung 12: „Tail DNA%“-Ergebnisse des 1. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 2: „Tail DNA%“-Ergebnisse des 1. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail DNA%						
	Alkalischer Comet Assay			Neutraler Comet Assay		
	Kontrolle	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	2 Gy	3 Gy
Median	4	9	15	3	10	16
Minimum	0	1	1	1	1	6
Maximum	37	64	64	14	75	61
Perzentile: 25	2	4	8	2	6	10
75	8	14	35	5	15	21

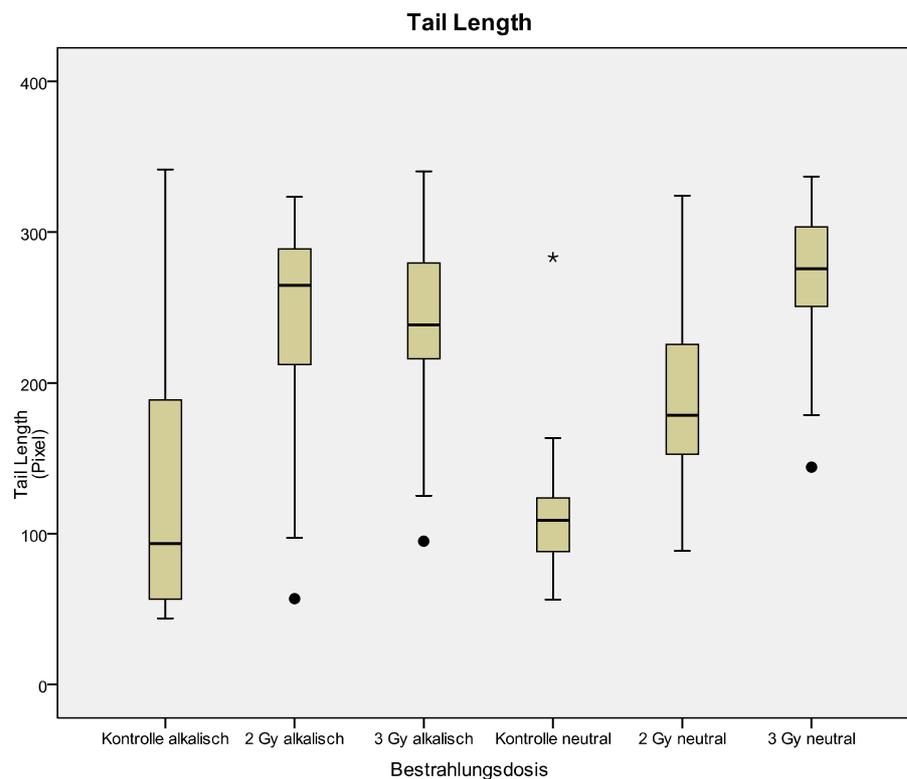


Abbildung 13: „Tail Length“-Ergebnisse des 1. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 3: „Tail Length“-Ergebnisse des 1. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Length						
	Alkalischer Comet Assay			Neutraler Comet Assay		
	Kontrolle	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	2 Gy	3 Gy
Median	93	265	238	109	179	276
Minimum	44	57	95	56	89	144
Maximum	342	323	340	283	324	337
Perzentile: 25	56	207	216	88	152	250
75	190	289	281	124	227	304

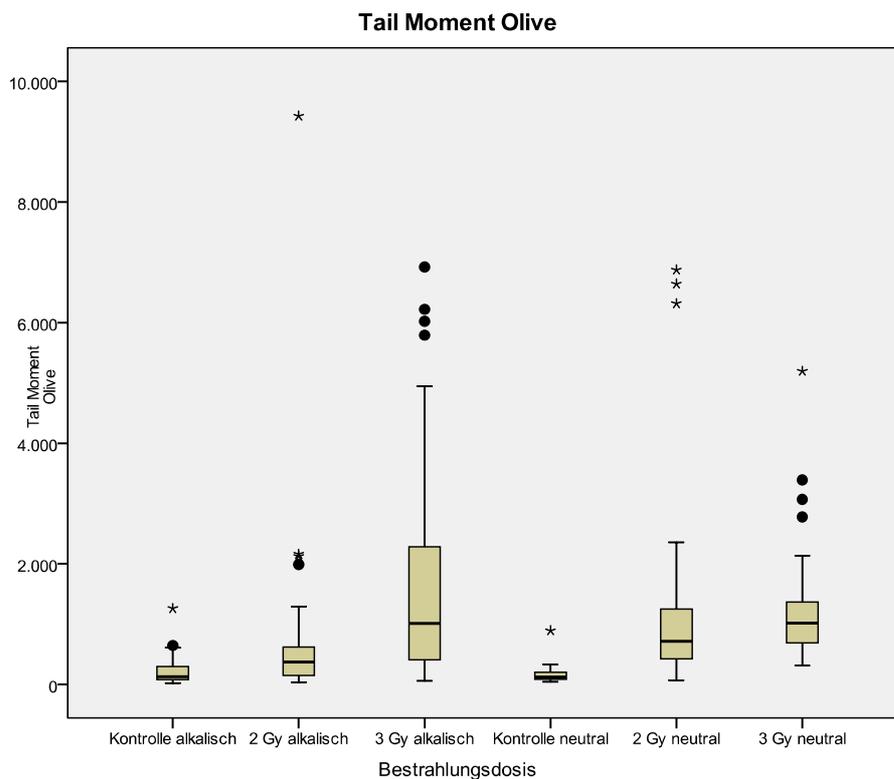


Abbildung 14: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse des 1. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 4: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse des 1. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Moment Olive						
	Alkalischer Comet Assay			Neutraler Comet Assay		
	Kontrolle	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	2 Gy	3 Gy
Median	129	374	1013	123	715	1016
Minimum	20	37	62	46	70	315
Maximum	1260	9425	6922	893	6874	5195
Perzentile: 25	81	144	379	87	419	682
75	298	647	2325	202	1253	1369

5.1.2 Versuch 2

Im zweiten Versuch war im alkalischen Comet Assay für die Parameter „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“ jeweils kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Kontrollgruppe und nach 1 Gy-Bestrahlung („Tail DNA%“: $p = 5,49$; „TOM“: $p = 1,89$), sowie zwischen den Schadenswerten nach Bestrahlungen mit 2 Gy und 3 Gy („Tail DNA%“: $p = 1,89$; „TOM“: $p = 0,102$), messbar (Abb. 15, Abb. 17, Tab. 5, Tab. 7).

Für die „Tail Length“ ergab sich bei alkalischem pH eine Dosis-Wirkungsbeziehung bis zur Dosis von 2 Gy (Abb. 16, Tab. 6). Nach Bestrahlung mit 3 Gy stieg der „Tail Length“-Schadenswert im Vergleich zum Ergebnis nach 2 Gy-Bestrahlung nicht mehr statistisch signifikant an ($p = 0,09$). Bei neutralem pH wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Schadenswerte für die Parameter „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“ im Vergleich zur Kontrollgruppe erst nach Bestrahlung mit 3 Gy gemessen (Abb. 15, Abb. 17, Tab. 5, Tab. 7). Anders bei der Tail Length. Hier ließ sich mit Ausnahme der Schadenswerte nach Bestrahlungen mit 1 Gy und 2 Gy ($p = 0,486$) eine Dosis-Wirkungsbeziehung ableiten (Abb. 16, Tab. 6).

Im zweiten Versuch traten im neutralem Comet Assay sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach Bestrahlung mit 1 Gy und 3 Gy statistisch signifikant höhere „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“-Schadenswerte auf als im alkalischen Comet Assay (jeweils $p < 0,001$). Dagegen lieferte der alkalische Comet Assay höhere „Tail Length“-Schadenswerte nach Bestrahlung mit 2 Gy und 3 Gy (jeweils $p < 0,001$).

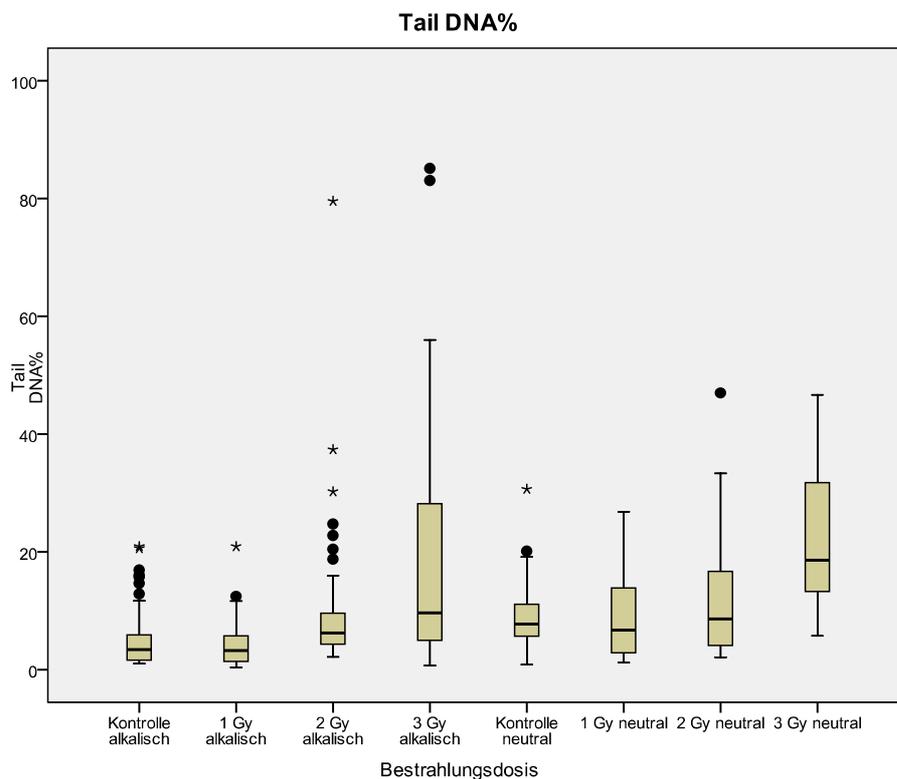


Abbildung 15: „Tail DNA%-Ergebnisse“ des 2. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 5: „Tail DNA%“-Ergebnisse des 2. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail DNA%								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	3	3	6	10	7	7	9	20
Minimum	1	0	2	1	0	1	2	4
Maximum	21	42	80	85	31	37	47	52
Perzentile: 25	2	2	4	4	5	4	4	14
75	5	5	10	30	10	13	17	32

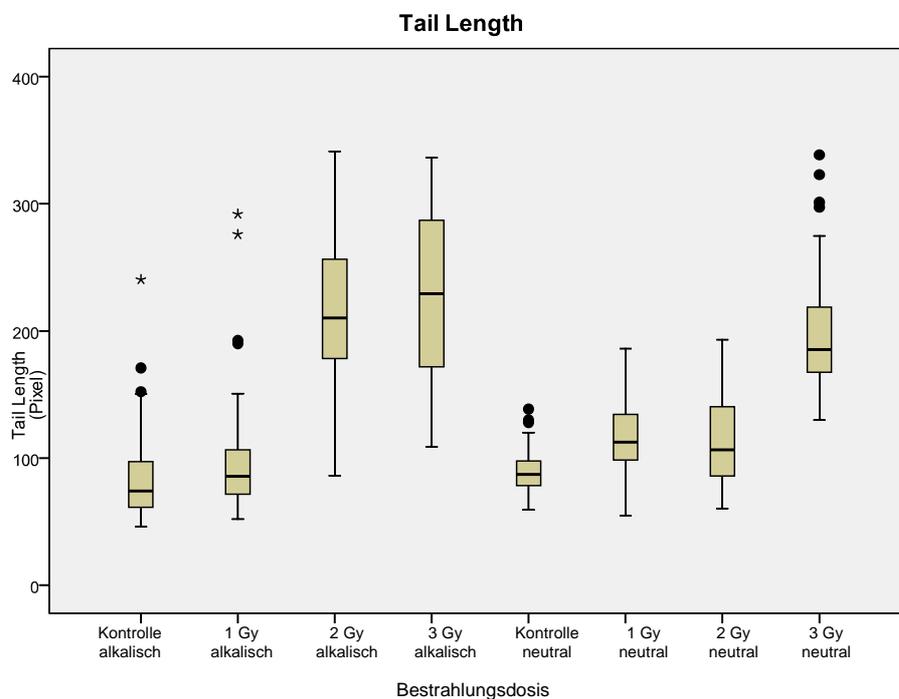


Abbildung 16: „Tail Length“-Ergebnisse des 2. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 6: „Tail Length“-Ergebnisse des 2. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Length								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	77	92	210	254	80	103	106	202
Minimum	46	49	86	109	56	51	60	130
Maximum	240	292	341	353	139	204	193	338
Perzentile: 25	64	75	178	197	70	74	86	175
75	97	124	257	294	93	125	140	243

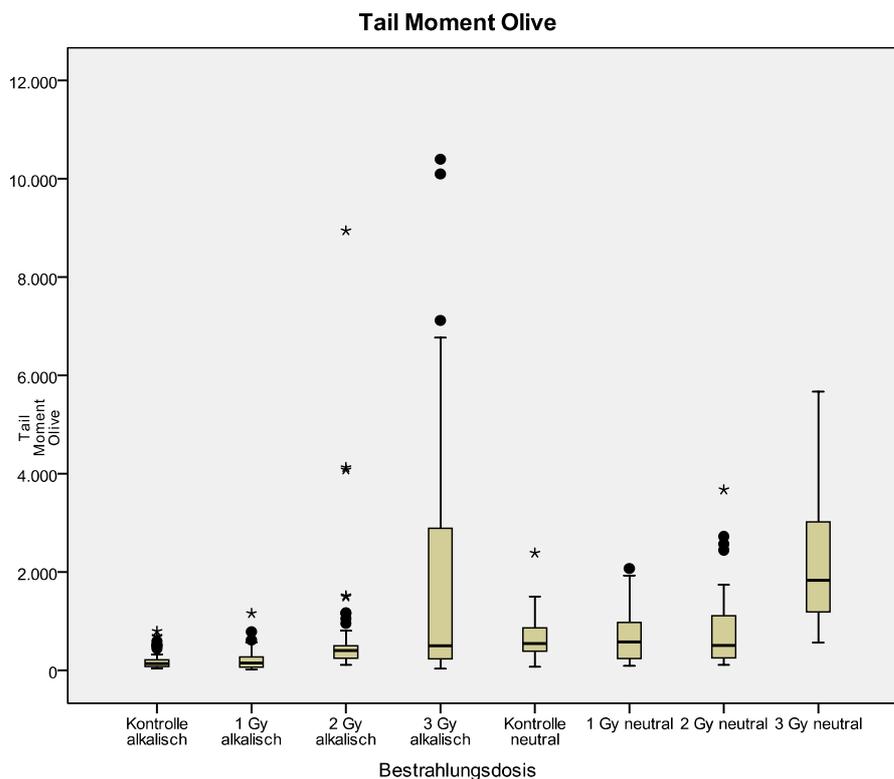


Abbildung 17: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse des 2. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 7: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse des 2. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Moment Olive								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	141	158	401	600	454	465	507	1846
Minimum	31	21	113	34	17	63	111	291
Maximum	1263	4545	8943	10398	2387	2072	3675	6914
Perzentile: 25	74	80	247	299	269	232	253	1294
75	237	327	533	2890	677	971	1137	3012

5.1.3 Versuch 3

Im dritten Versuch zeigte sich im alkalischen Comet Assay für die Parameter „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“ eine Dosis-Wirkungsbeziehung (Abb. 18, Abb. 20, Tab. 8, Tab. 10). Für die „Tail Length“ war eine Dosis-Wirkungsbeziehung nur nach Bestrahlung mit 2 und 3 Gy, nicht aber mit 1 Gy beobachtbar ($p = 0,066$) (Abb. 19, Tab. 9). Im neutralen Comet Assay stellte sich bei allen drei Schadensparametern kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Kontrollgruppe und nach Bestrahlung mit 1 Gy dar („Tail DNA%“: $p = 0,318$; „Tail Length“: $p = 0,378$; „Tail Moment Olive“: $p = 0,528$). Nach Bestrahlung mit 2 und 3 Gy ergaben sich bei allen Parametern Dosis-Wirkungsbeziehungen (Abb. 18 – 20, Tab. 8 – 10).

Der neutrale Comet Assay lieferte im dritten Versuch bei den Schadensparametern „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“ statistisch signifikant höhere Ergebnisse als der alkalische Comet Assay sowohl in der Kontrollgruppe („Tail DNA%“: $p = 0,024$; „Tail Moment Olive“: $p < 0,001$) als auch nach Bestrahlung mit 1 Gy („Tail DNA%“: $p = 0,040$; „Tail Moment Olive“: $p < 0,001$). Nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigte sich im neutralen Comet Assay ein höherer „Tail Moment Olive“-Wert als im alkalischen Comet Assay ($p = 0,002$). Dagegen waren nach der Bestrahlung mit 3 Gy alle Schadensparameter im alkalischen Comet Assay statistisch signifikant höher als im neutralen Comet Assay („Tail DNA%“: $p < 0,001$; „Tail Length“: $p < 0,001$; „Tail Moment Olive“: $p = 0,004$). Für die „Tail Length“ wurde auch nach einer Dosis von 2 Gy ein statistisch signifikant höherer Schadenswert im alkalischen Comet Assay als bei neutralem pH ($p < 0,001$) gemessen.

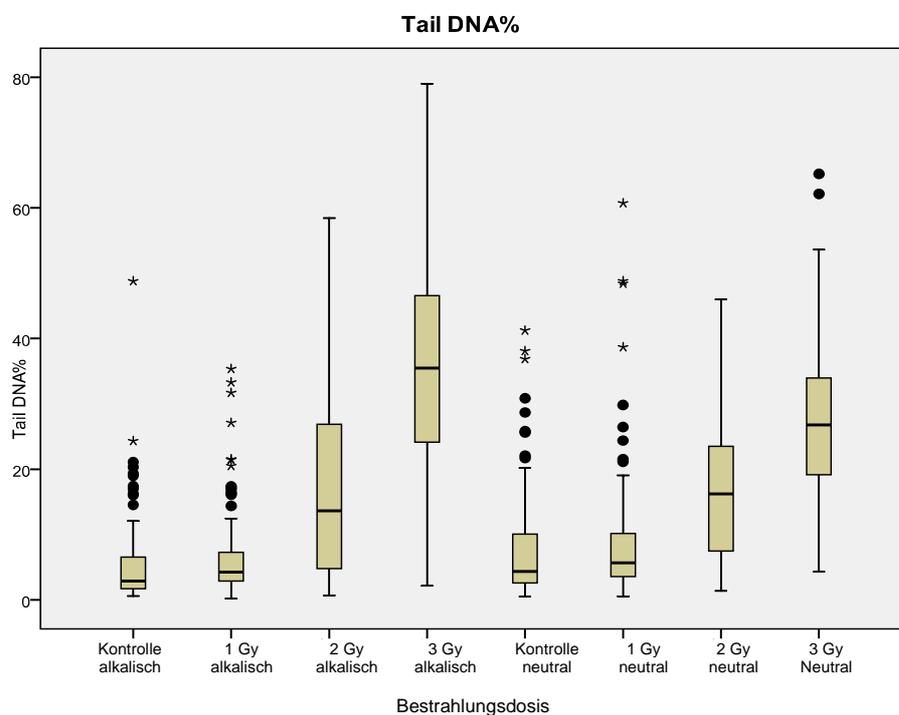


Abbildung 18: „Tail DNA%“-Ergebnisse des 3. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 8: „Tail DNA%“-Ergebnisse des 3. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail DNA%								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	3	4	14	35	4	6	16	27
Minimum	1	0	1	2	1	1	1	4
Maximum	49	35	58	79	41	61	46	65
Perzentile: 25	2	3	5	24	3	4	7	19
75	7	7	27	47	10	10	24	34

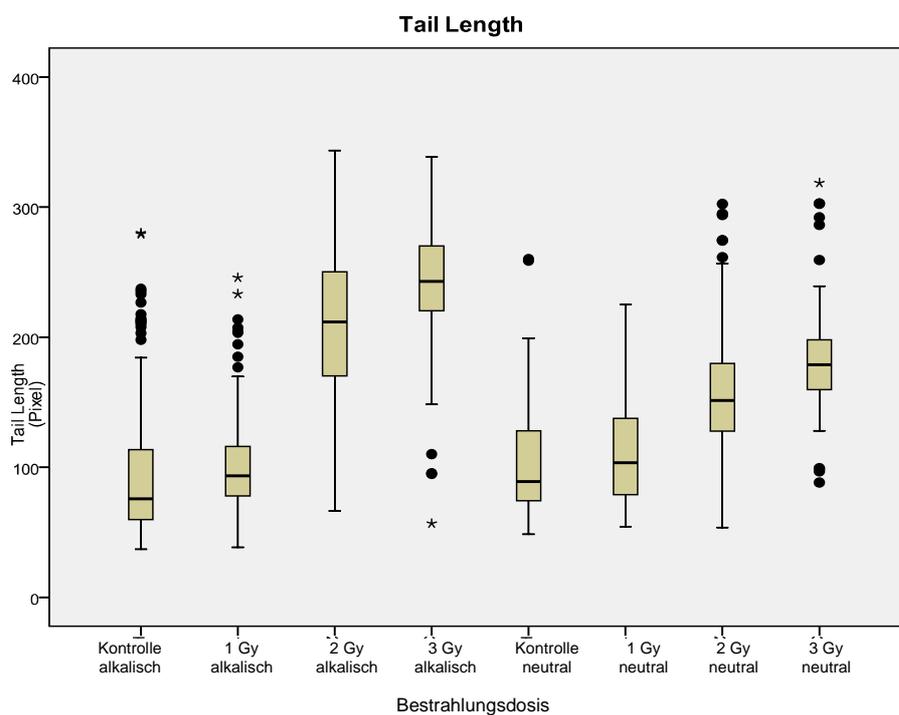


Abbildung 19: „Tail Length“-Ergebnisse des 3. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 9: „Tail Length“-Ergebnisse des 3. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Length								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	76	94	212	243	89	103	151	179
Minimum	37	38	66	57	49	54	54	88
Maximum	280	246	344	339	260	225	302	319
Perzentile: 25	60	78	169	220	74	79	127	160
75	115	116	251	270	128	138	180	198

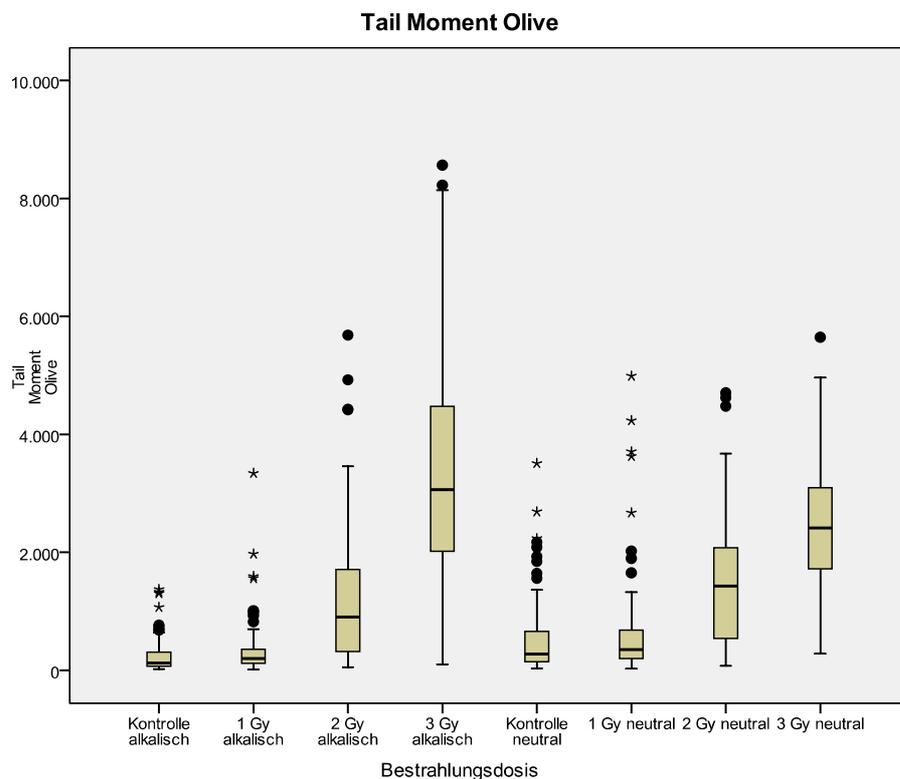


Abbildung 20: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse des 3. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 10: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse des 3. Versuches nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Moment Olive								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	125	198	901	3061	276	353	1429	2412
Minimum	20	13	53	104	31	27	77	281
Maximum	1372	3341	5683	8567	3509	4989	4704	5647
Perzentile: 25	69	119	317	2001	144	199	530	1716
75	311	360	1780	4485	683	683	2091	3100

5.1.4 Zusammenfassung Versuche 1-3

Nach Zusammenfassung der Ergebnisse aus den drei Einzelversuchen der α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit dem α -Strahler Americium-241 ergaben sich im alkalischen Comet Assay für die Parameter „Tail Length“ und „Tail Moment Olive“ eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehungen (Abb. 22, Abb. 23, Tab. 12, Tab. 13). Bei „Tail DNA%“ trat dagegen zwischen den Ergebnissen der Kontrollgruppe und nach Bestrahlung mit 1 Gy keine statistisch signifikante Steigerung der Schadenswerte auf ($p = 0,112$) (Abb. 20, Tab. 11), gleichwohl aber nach Bestrahlung mit 2 und 3 Gy (jeweils $p < 0,001$). Auch im neutralen Comet Assay zeigten sich nach Zusammenfassung der drei Einzelversuche für die Schadensparameter „Tail Length“ und „Tail Moment Olive“ Dosis-Wirkungsbeziehungen (Abb. 22, Abb. 23, Tab. 12, Tab. 13). Beim Parameter „Tail DNA%“ war wie bei alkalischem pH eine statistisch signifikante Steigerung der Schadenswerte nach Bestrahlung mit 1 Gy nicht messbar ($p = 0,066$). Die „Tail DNA%“-Ergebnisse waren bei neutralem pH ausnahmslos statistisch signifikant höher als im alkalischen Comet Assay (jeweils $p < 0,001$). Bei der „Tail Length“ traten in der Kontrollgruppe ($p = 0,006$) sowie nach Bestrahlung mit 2 Gy und 3 Gy (jeweils $p < 0,001$) bei neutralem pH signifikant niedrigere Ergebnisse auf als im alkalischen Comet Assay. Nur nach Bestrahlung mit 1 Gy war für die „Tail Length“ kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden pH-Bereichen darstellbar ($p = 0,648$). Der Parameter „Tail Moment Olive“ lieferte in der Kontrollgruppe sowie nach Bestrahlung mit 1 Gy und 2 Gy bei neutralem pH höhere Werte als der alkalische Comet Assay (jeweils $p < 0,001$). Nach Bestrahlung mit 3 Gy war dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden pH-Bereichen nachweisbar ($p = 1,036$).

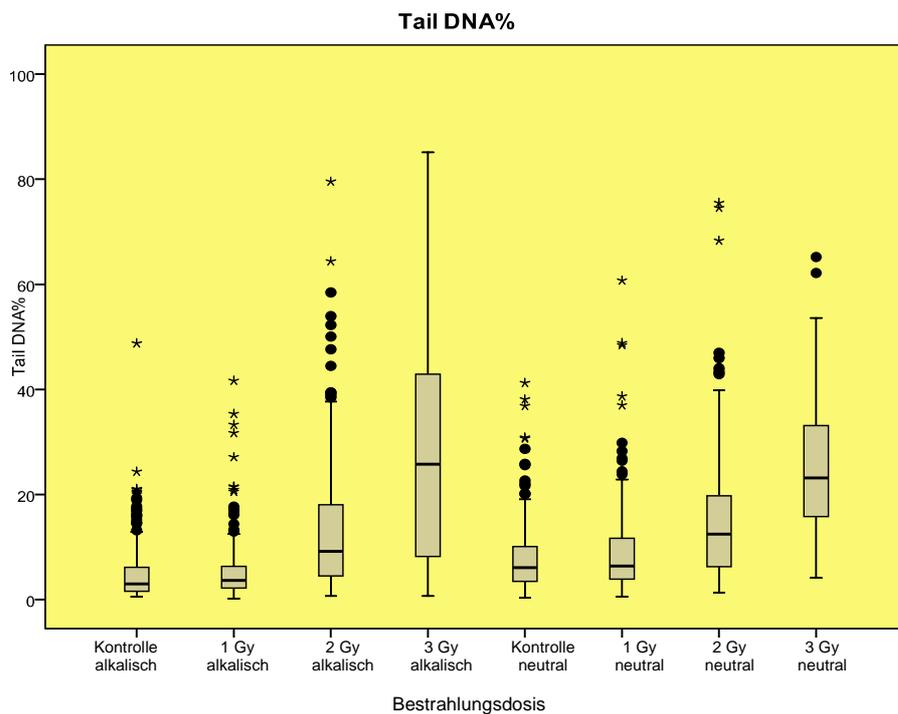


Abbildung 21: „Tail DNA%“-Ergebnisse der Versuche 1-3 nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 11: „Tail DNA%“-Ergebnisse der 3 Einzelversuche nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail DNA%								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	3	4	9	24	5	6	12	21
Minimum	0	0	1	1	0	1	1	4
Maximum	49	42	80	85	41	61	75	65
Perzentile: 25	2	2	4	8	3	4	6	14
75	6	6	18	41	9	12	20	31

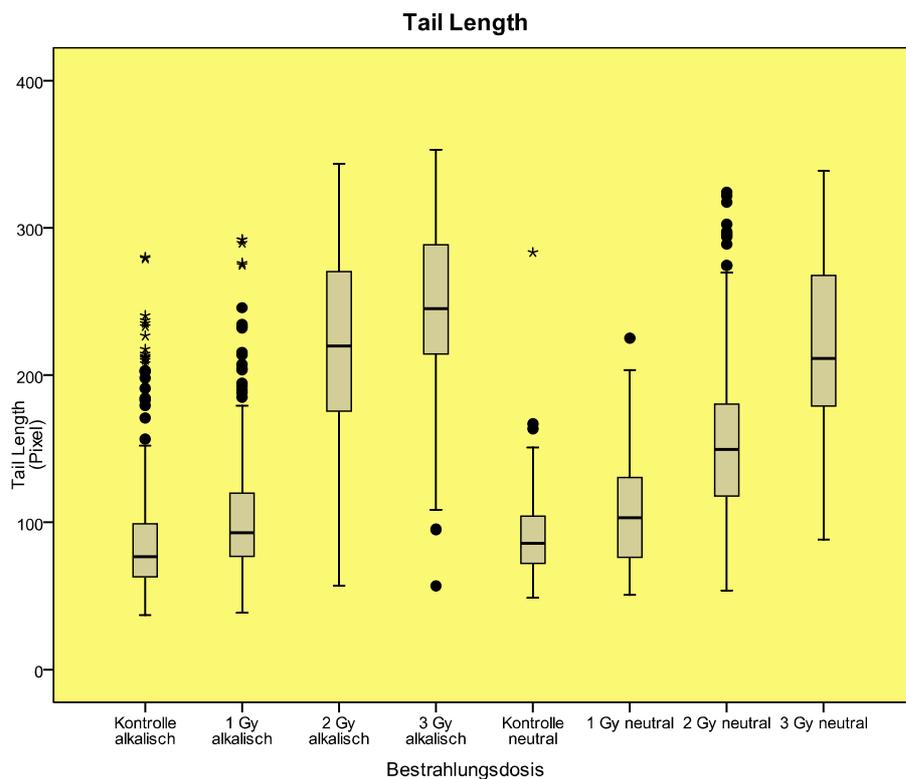


Abbildung 22: „Tail Length“-Ergebnisse der Versuche 1-3 nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 12: „Tail Length“-Ergebnisse der Versuche 1-3 nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Length								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	78	93	220	244	88	103	150	199
Minimum	37	38	57	57	49	51	54	88
Maximum	342	292	344	353	283	225	324	338
Perzentile: 25	61	76	175	214	75	76	117	172
75	111	120	270	287	113	131	180	251

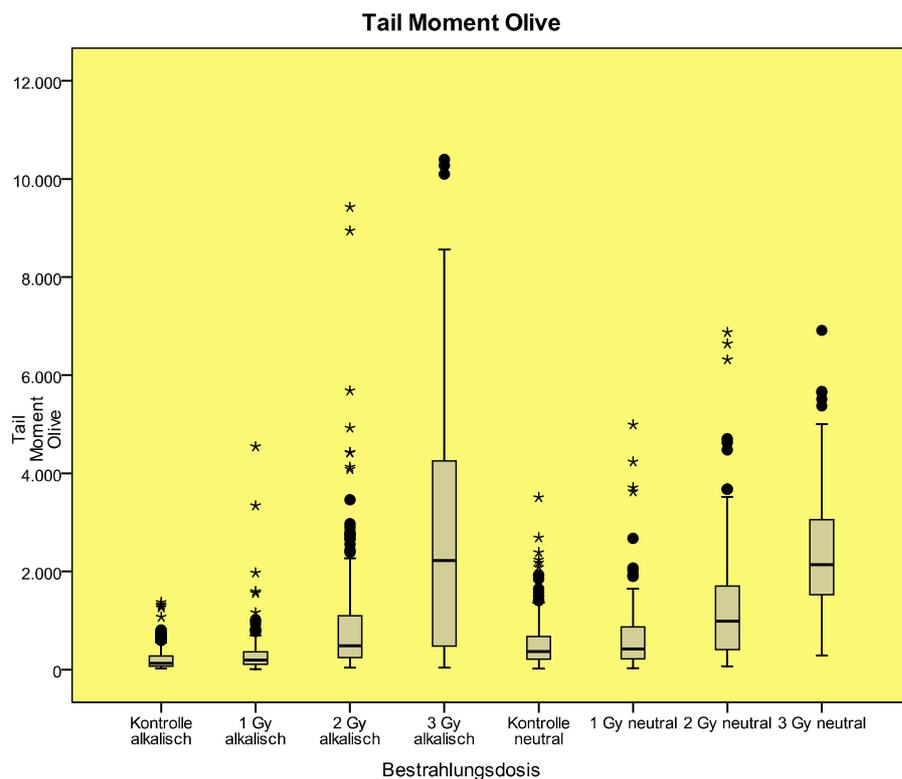


Abbildung 23: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse der Versuche 1-3 nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 13: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse der Versuche 1-3 nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Moment Olive								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	129	191	487	1787	287	418	985	1865
Minimum	20	13	37	34	17	27	70	281
Maximum	1372	4545	9425	10398	3509	4989	6874	6914
Perzentile: 25	71	106	243	462	140	217	408	1223
75	282	359	1097	3927	574	871	1704	2912

Repräsentative Kometen von Zellkernen aus unbestrahlten HSC45-M2 Zellen sowie nach Bestrahlung mit 1, 2 und 3 Gy des α -Strahlers Americium-241 sind für den alkalischen und neutralen Comet Assay in den Abb. 24 und 25 gezeigt.

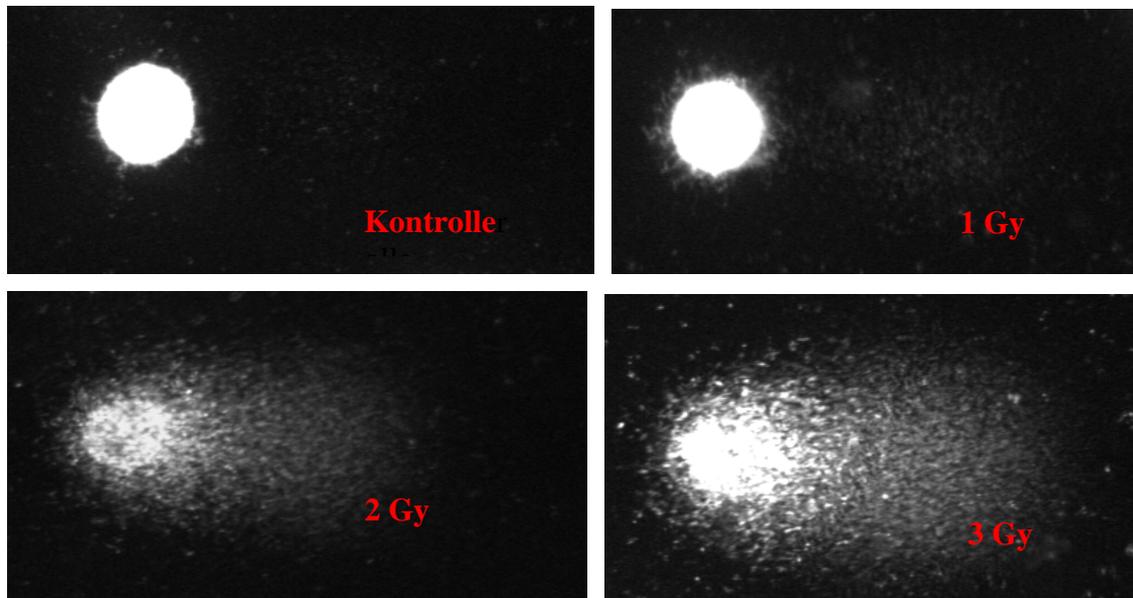


Abbildung 24: Kometen von HSC45-M2 Zellkernen nach Bestrahlung mit dem α -Emitter Americium-241 im alkalischen Comet Assay. Betrachtung unter einem Epifluoreszenzmikroskop in 40facher Vergrößerung nach Färbung mit SYBR[®]-Green. Oben links Kontrollgruppe, oben rechts nach Bestrahlung mit 1 Gy, unten links nach Bestrahlung mit 2 Gy, unten rechts nach Bestrahlung mit 3 Gy

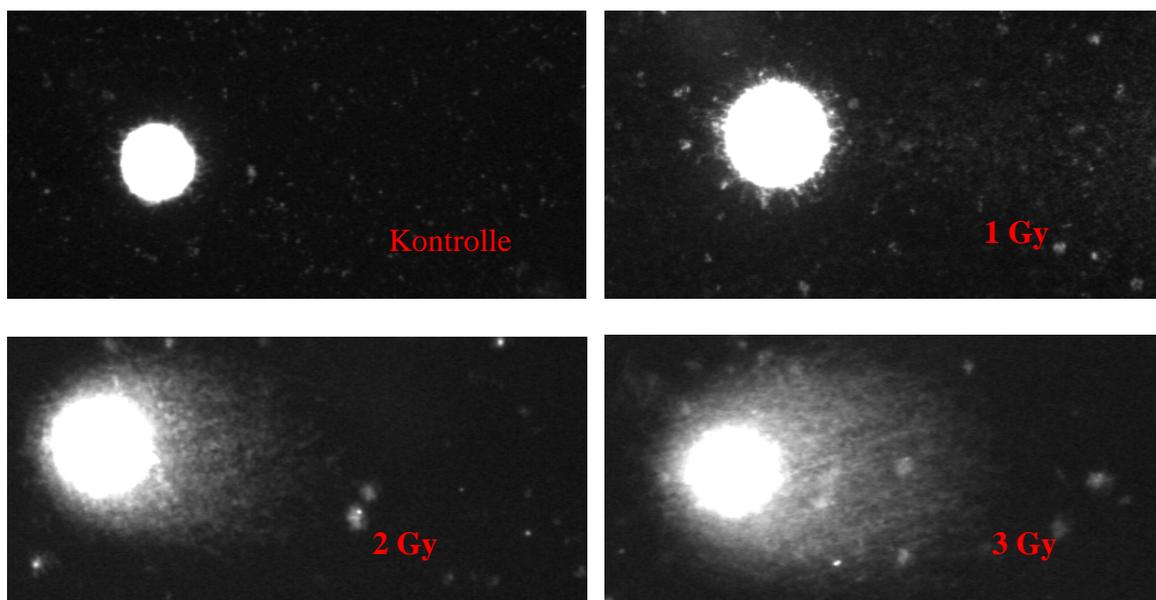


Abbildung 25: Kometen von HSC45-M2 Zellkernen nach Bestrahlung mit dem α -Emitter Americium-241 im neutralen Comet Assay. Betrachtung unter einem Epifluoreszenzmikroskop in 40facher Vergrößerung nach Färbung mit SYBR[®]-Green. Oben links Kontrollgruppe, oben rechts nach Bestrahlung mit 1 Gy, unten links nach Bestrahlung mit 2 Gy, unten rechts nach Bestrahlung mit 3 Gy

5.2 γ -Bestrahlung der HSC45-M2 Zellen mit Caesium-137

Nach γ -Bestrahlung der HSC45-M2 Zellen stellte sich im alkalischen Comet Assay für die Parameter „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“ bis zur Bestrahlungsdosis von 2 Gy eine Dosis-Wirkungsbeziehung dar (Abb. 26, Abb. 28, Tab. 14, Tab. 16). Nach Bestrahlung mit 3 Gy trat dagegen bei beiden Parametern keine statistisch signifikante Steigerung der Schadenswerte auf („Tail DNA%“: $p = 0,456$, „Tail Moment Olive“: $p = 0,096$). Bei der „Tail Length“ unterschieden sich die Ergebnisse von Kontrollgruppe und 1 Gy Bestrahlung nicht statistisch signifikant ($p = 0,294$). Bei höheren Bestrahlungsdosen stellte sich dagegen eine Dosis-Wirkungsbeziehung der „Tail Length“ dar (Abb. 27, Tab. 15). Im neutralen Comet Assay stellte sich nach γ -Bestrahlung der HSC45-M2 Zellen für alle drei Schadensparameter eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung dar (Abb. 25 – 27, Tab. 14 - 16). Die „Tail DNA%“-Ergebnisse des neutralen Comet Assays waren sowohl in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$) als auch nach γ -Bestrahlungen mit 1 Gy ($p < 0,001$) und 3 Gy ($p = 0,02$) statistisch signifikant höher als die entsprechenden Werte des alkalischen Comet Assay. Nur nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigte sich für den Parameter „Tail DNA%“ kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen neutralen und alkalischen Comet Assay ($p = 2,524$). Beim Parameter Tail Length ergaben sich nach γ -Bestrahlung mit 1 Gy im alkalischen und neutralen Comet Assay vergleichbare Ergebnisse ($p = 0,772$). In der Kontrollgruppe und nach Bestrahlung mit 2 und 3 Gy lieferte der alkalische Comet Assay dagegen höhere Werte als der neutrale Comet Assay (jeweils $p < 0,001$) (Abb. 27, Tab. 15). Die Werte für den „Tail Moment Olive“ lagen nach γ -Bestrahlung im neutralen Comet Assay ausnahmslos statistisch signifikant höher als im alkalischen Comet Assay (jeweils $p < 0,001$) (Abb. 28, Tab. 16).

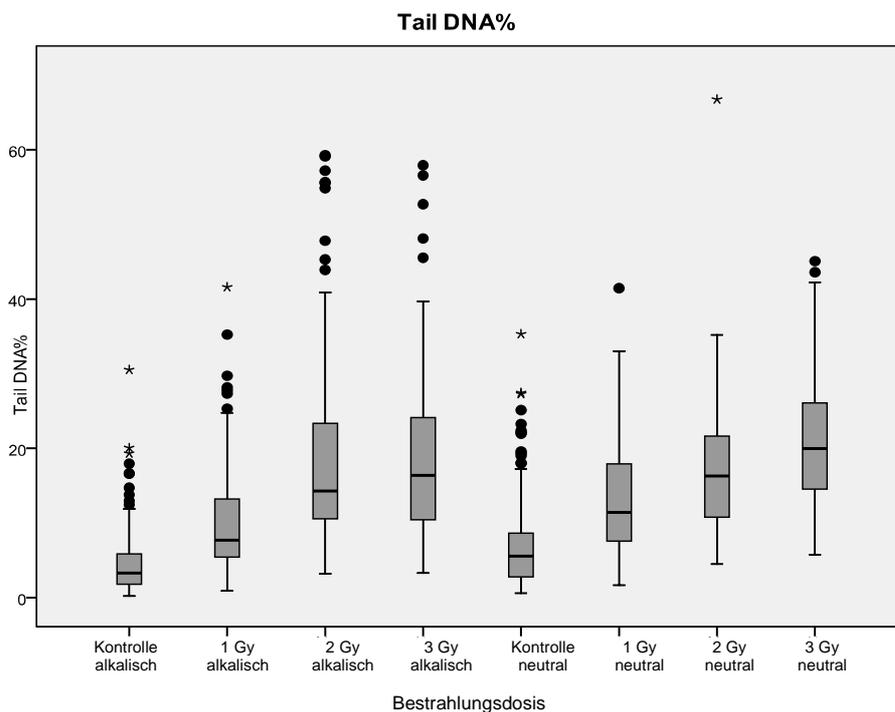


Abbildung 26: „Tail DNA%“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 14: „Tail DNA%“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail DNA%								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	3	7	14	17	5	14	16	20
Minimum	0	1	3	3	1	2	4	6
Maximum	31	42	59	58	35	43	67	45
Perzentile: 25	2	5	10	11	2	8	11	15
75	6	12	23	25	8	20	22	26

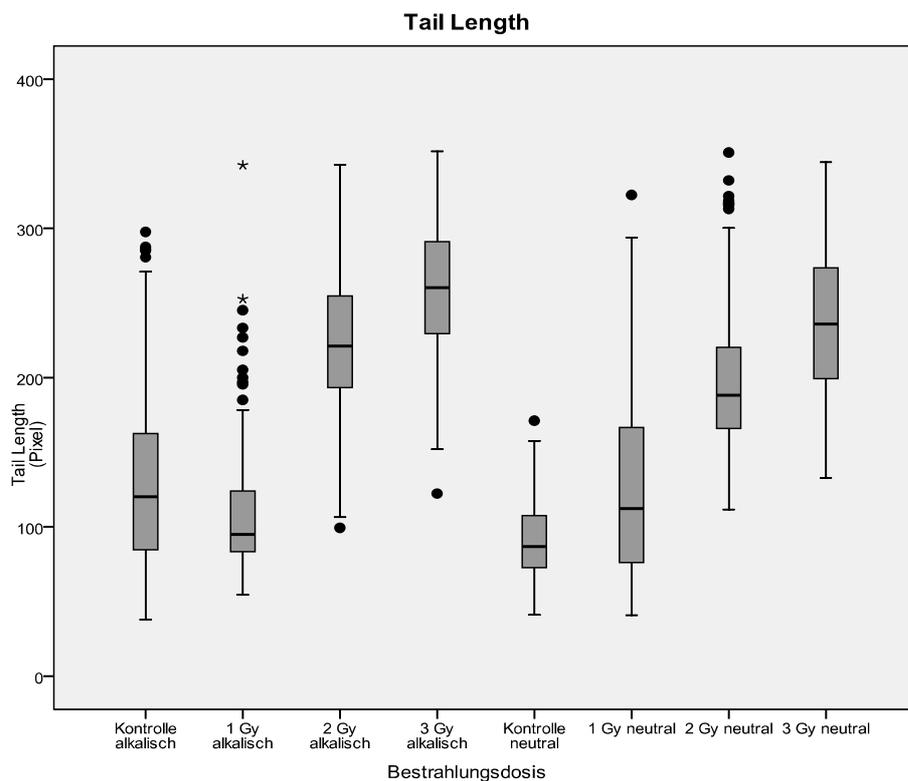


Abbildung 27: „Tail Length“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 15: „Tail Length“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Length								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	106	109	231	264	81	110	188	236
Minimum	38	55	99	122	41	41	112	133
Maximum	298	342	343	352	231	327	351	344
Perzentile: 25	75	87	202	231	70	78	166	199
75	150	165	266	290	102	158	221	274

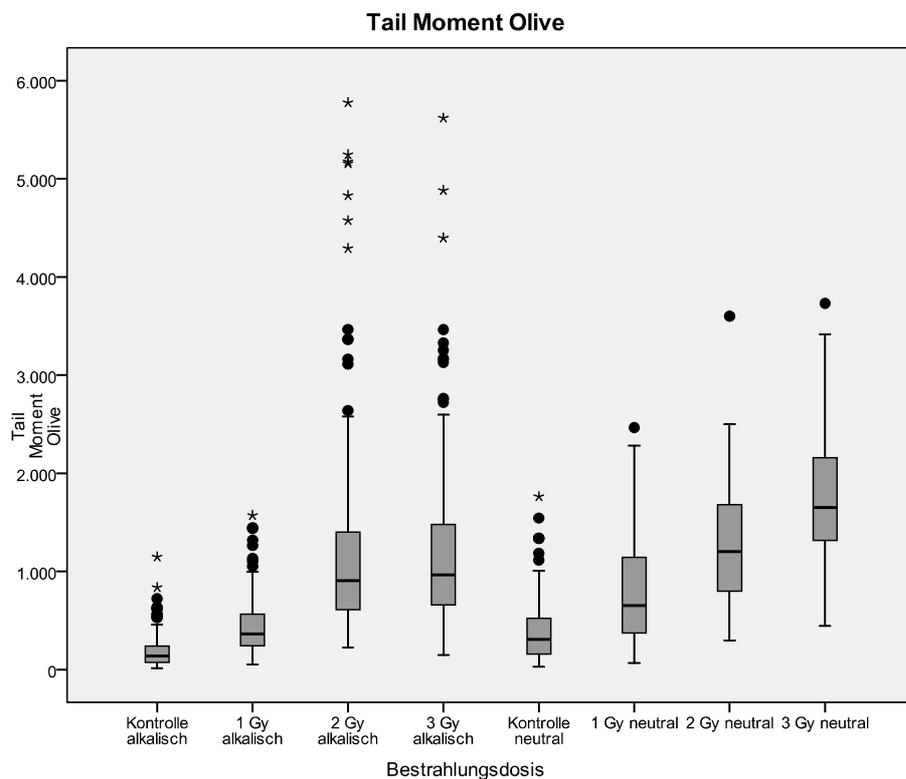


Abbildung 28: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 16: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Moment Olive								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	129	322	899	1082	246	756	1202	1652
Minimum	5	50	225	148	27	67	298	443
Maximum	1147	1967	5776	5618	1761	3252	3599	3731
Perzentile: 25	72	226	559	706	124	423	798	1311
75	214	524	1340	1581	475	1237	1683	2159

Der Vergleich der Ergebnisse nach γ -Bestrahlung und α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen lieferte keinen eindeutigen Trend im Hinblick auf die Stärke der DNA-Schädigung. Im alkalischen Comet Assay waren die Ergebnisse nach γ -Bestrahlung mit 1 Gy beispielsweise bei allen Schadensparametern höher als die zusammengefassten Vergleichswerte nach α -Bestrahlung (jeweils $p < 0,001$). Dies galt auch für die Parameter „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“ im neutralen Comet Assay nach Bestrahlung mit 1 Gy (jeweils $p < 0,001$), während im Parameter „Tail Length“ bei neutralem pH kein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar war ($p = 0,059$). Nach der γ -Bestrahlung mit 3 Gy ergab sich im alkalischen Comet Assay ein niedrigerer „Tail DNA%“-Wert als nach α -Bestrahlung ($p < 0,001$) jedoch ein höherer „Tail Length“-Wert ($p < 0,001$). Repräsentative Kometen von Zellkernen aus unbestrahlten HSC45-M2 Zellen sowie nach γ -Bestrahlung mit 1, 2 und 3 Gy sind für den alkalischen und neutralen Comet Assay in den Abb. 29 und 30 gezeigt.

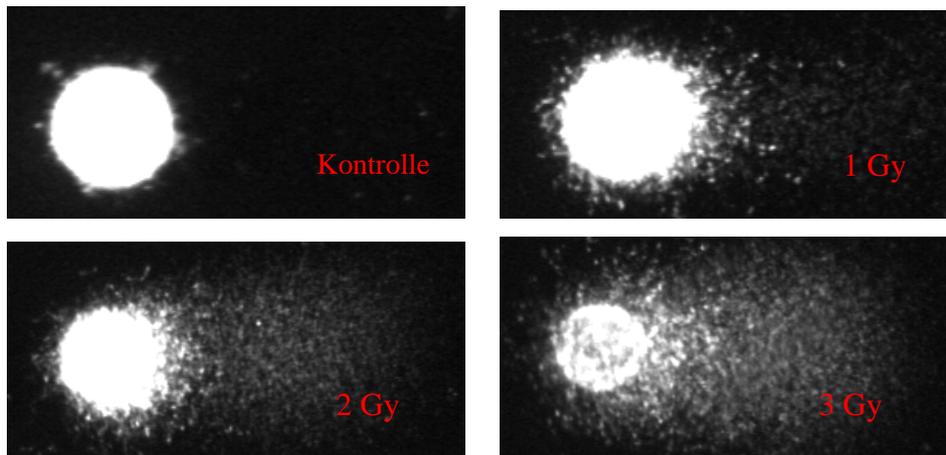


Abbildung 29: Kometen von HSC45-M2 Zellkernen nach Bestrahlung mit dem γ -Strahler Caesium-137 im alkalischen Comet Assay. Betrachtung unter einem Epifluoreszenzmikroskop in 40facher Vergrößerung nach Färbung mit SYBR[®]-Green. Oben links Kontrollgruppe, oben rechts nach Bestrahlung mit 1 Gy, unten links nach Bestrahlung mit 2 Gy, unten rechts nach Bestrahlung mit 3 Gy

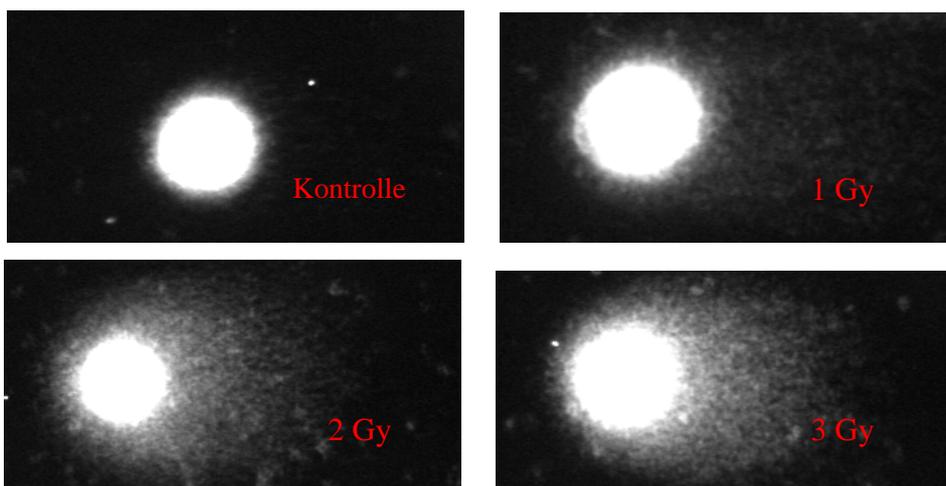


Abbildung 30: Kometen von HSC45-M2 Zellkernen nach Bestrahlung mit dem γ -Strahler Caesium-137 im neutralen Comet Assay. Betrachtung unter einem Epifluoreszenzmikroskop in 40facher Vergrößerung nach Färbung mit SYBR[®]-Green. Oben links Kontrollgruppe, oben rechts nach Bestrahlung mit 1 Gy, unten links nach Bestrahlung mit 2 Gy, unten rechts nach Bestrahlung mit 3 Gy

5.3 Bestrahlung von humanen Lymphozyten mit dem α -Emitter Americium-241

Nach α -Bestrahlung zeigten Lymphozyten im alkalischen Comet Assay für die Parameter „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“ jeweils keine Dosis-Wirkungsbeziehung. Die Unterschiede in den Schadenswerten nach Bestrahlung mit 1 Gy und 2 Gy („Tail DNA%“: $p = 0,162$; „Tail Moment Olive“: $p = 0,18$) sowie nach Bestrahlung mit 2 Gy und 3 Gy („Tail DNA%“: $p = 0,54$; „Tail Moment Olive“: $p = 0,87$) waren jeweils nicht signifikant (Abb. 31, Abb. 33, Tab. 17, Tab. 19). Beim Parameter „Tail Length“ zeigte sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung bis zur Dosis von 2 Gy (Abb. 32, Tab. 18). Nach Applikation von 3 Gy ergab sich unerwartet ein „Tail Length“-Schadenswert auf dem Niveau des Wertes nach Bestrahlung mit 1 Gy ($p = 0,27$). Auch im neutralen Comet Assay ließ sich nach α -Bestrahlung der Lymphozyten für keinen der Schadensparameter eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung darstellen. Der Anstieg der „Tail DNA%“-Werte nach Bestrahlung mit 1 Gy und 2 Gy sowie mit 2 Gy und 3 Gy war jeweils nicht statistisch signifikant (1-2 Gy: $p = 0,216$; 2-3 Gy: $p = 0,476$) (Abb. 31, Tab. 17). Für den Parameter „Tail Length“ lieferte die Bestrahlung mit 2 Gy keine statistisch signifikante Steigerung des Schadenswertes im Vergleich zur Bestrahlung mit 1 Gy ($p = 0,348$). Nach Bestrahlung mit 3 Gy trat dagegen wieder eine statistisch signifikante Steigerung der Schadenswerte auf ($p < 0,001$) (Abb. 32, Tab. 18). Beim Parameter „Tail Moment Olive“ bewegten sich die Ergebnisse im neutralen Comet Assay nach Bestrahlung mit 1 Gy und 3 Gy statistisch auf nahezu identischem Niveau ($p = 0,272$) und der Schadenswert nach Bestrahlung mit 2 Gy lag unter dem Ergebnis nach Bestrahlung mit 1 Gy ($p = 0,006$) (Abb. 33, Tab. 19).

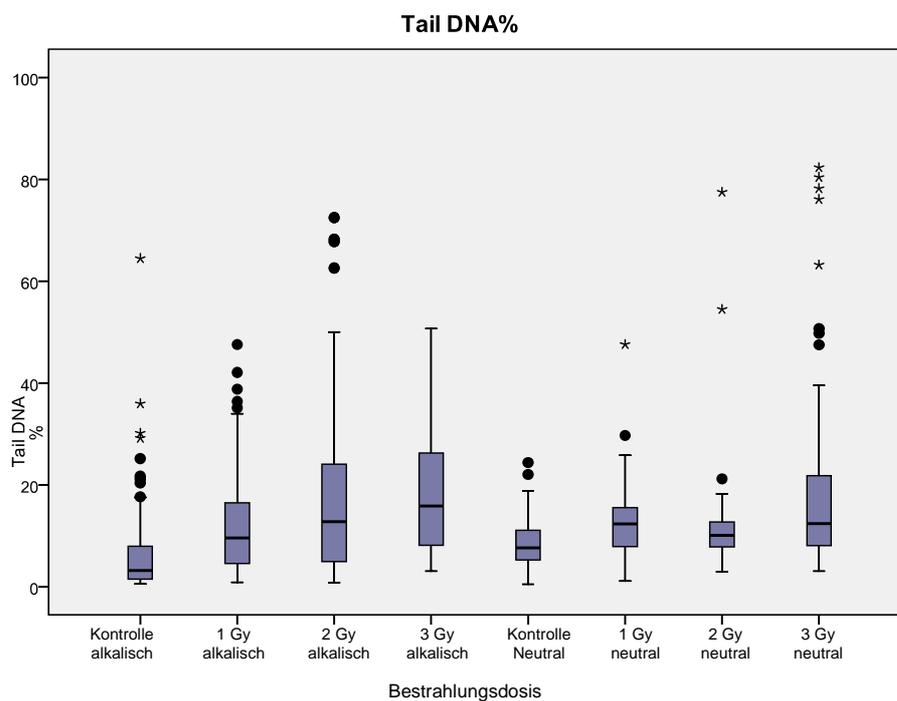


Abbildung 31: „Tail DNA%“-Ergebnisse nach α -Bestrahlung von Lymphozyten mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 17: „Tail DNA%“-Ergebnisse nach α -Bestrahlung von Lymphozyten mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail DNA%								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	3	10	13	16	8	12	10	12
Minimum	1	1	1	3	0	1	3	3
Maximum	64	48	72	51	24	48	77	82
Perzentile: 25	1	5	5	8	5	8	8	8
75	8	17	24	26	11	16	13	22

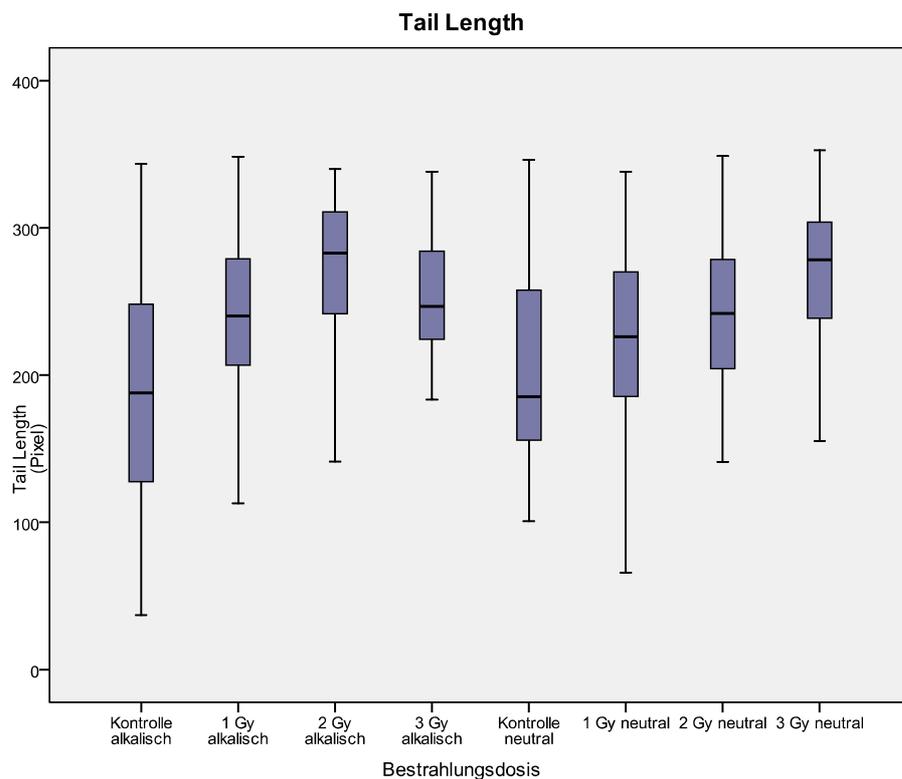


Abbildung 32: „Tail Length“-Ergebnisse nach α -Bestrahlung von Lymphozyten mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 18: „Tail Length“-Ergebnisse nach α -Bestrahlung von Lymphozyten mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Length								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	188	240	283	247	185	226	242	278
Minimum	37	113	141	183	101	66	141	155
Maximum	343	348	340	338	346	338	349	353
Perzentile: 25	127	207	242	224	156	185	204	239
75	249	279	311	284	258	270	279	304

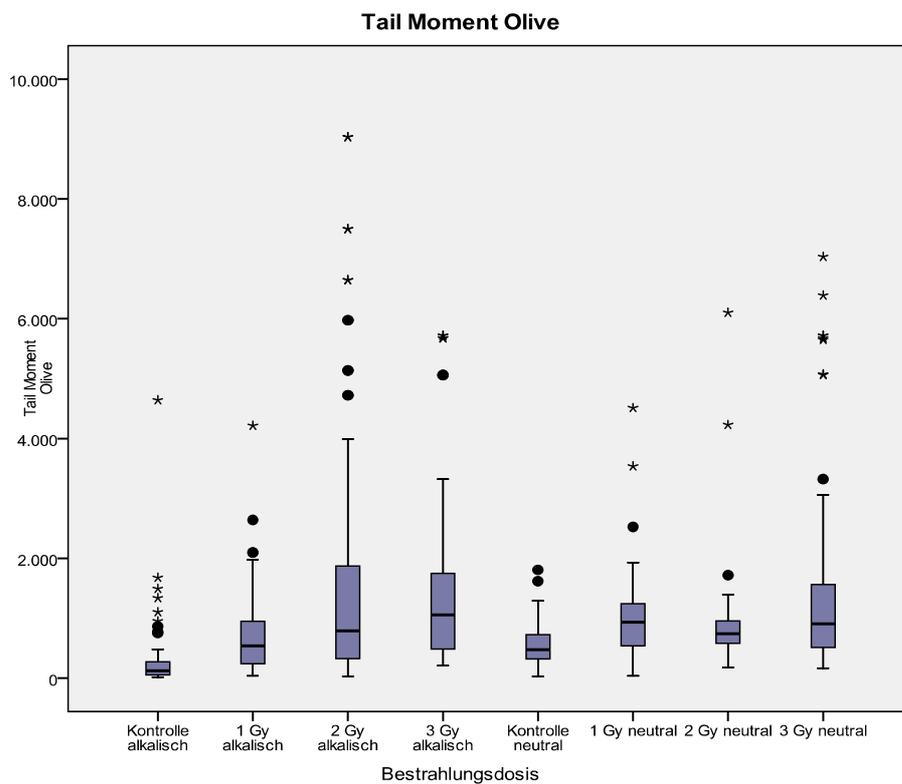


Abbildung 33: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse nach α -Bestrahlung von Lymphozyten mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 19: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse nach α -Bestrahlung von Lymphozyten mit Americium-241 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Moment Olive								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	125	539	792	1057	475	935	741	906
Minimum	17	42	29	209	27	39	176	167
Maximum	4641	4215	9032	5719	1809	4510	6100	7034
Perzentile: 25	57	238	329	486	322	537	579	506
75	276	961	1872	1747	725	1248	960	1567

Repräsentative Beispiele für die mit Hilfe des TILL- Phototonics®- Systems dargestellten Kometen der Zellkerne humaner Lymphozyten nach α - Bestrahlung zeigen die Abbildungen 34 und 35.

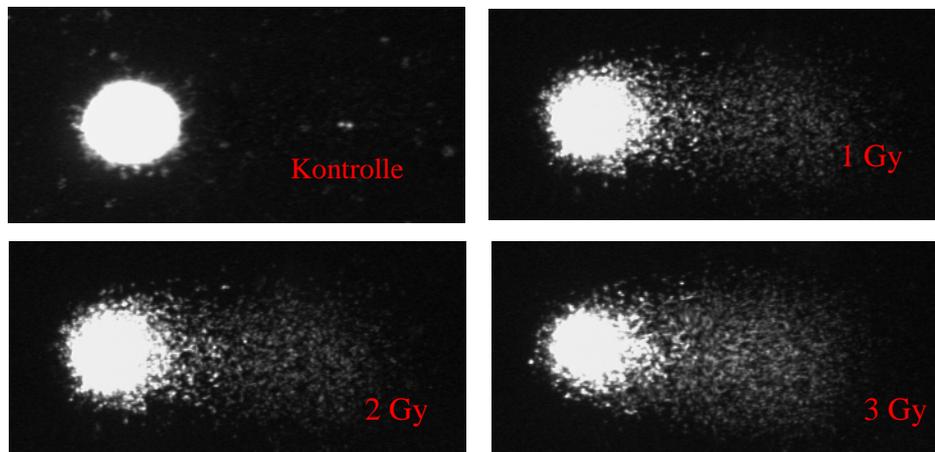


Abbildung 34: Kometen von humanen Lymphozytenzellkernen nach Bestrahlung mit dem α -Emitter Americium-241 im alkalischen Comet Assay. Betrachtung unter einem Epifluoreszenzmikroskop in 40facher Vergrößerung nach Färbung mit SYBR®-Green. Oben links Kontrollgruppe, oben rechts nach Bestrahlung mit 1 Gy, unten links nach Bestrahlung mit 2 Gy, unten rechts nach Bestrahlung mit 3 Gy

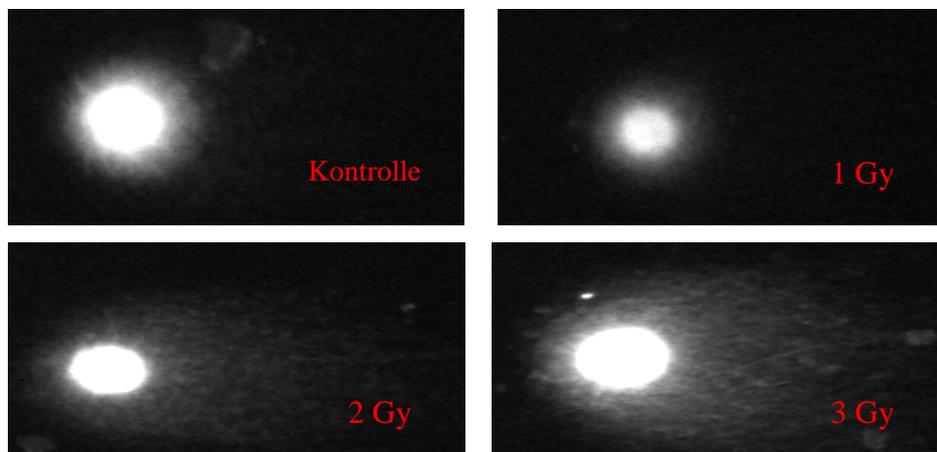


Abbildung 35: Kometen von humanen Lymphozytenzellkernen nach Bestrahlung mit dem α -Emitter Americium-241 im neutralen Comet Assay. Betrachtung unter einem Epifluoreszenzmikroskop in 40facher Vergrößerung nach Färbung mit SYBR®-Green. Oben links Kontrollgruppe, oben rechts nach Bestrahlung mit 1 Gy, unten links nach Bestrahlung mit 2 Gy, unten rechts nach Bestrahlung mit 3 Gy

5.4 γ -Bestrahlung von Lymphozyten mit Caesium-137

Im alkalischen Comet Assay war nach γ -Bestrahlung keine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung für die gemessenen Schadensparameter nachweisbar. Nach einer Dosis von 2 Gy ließen sich für die Parameter „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“ keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Schadensantwort im Vergleich zur Bestrahlung mit 1 Gy nachweisen („Tail DNA%“: $p = 1,602$; „Tail Moment Olive“: $p = 2,616$) (Abb. 36, Abb. 38, Tab. 20, Tab. 22). Die „Tail Length“ zeigte eine Dosis-Wirkungsbeziehung bis zur Dosis von 2 Gy (Abb. 37, Tab. 21). Nach γ -Bestrahlung mit 3 Gy war aber keine Steigerung in der Schadensantwort feststellbar und der gemessene Schadenswert bewegte sich auf dem Niveau des bei 2 Gy bestimmten Wertes ($p = 4,92$). Bei neutralem pH ließ sich für den Parameter „Tail DNA%“ eine statistisch signifikante Steigerung der Schadenswerte nur bis zu einer Dosis von 2 Gy beobachten. Der bei 3 Gy gemessene Schadenswert sank dagegen unter den bei einer Dosis von 2 Gy ermittelten Wert ab ($p = 0,04$) (Abb. 36, Tab. 20). Die „Tail Length“ zeigte im neutralen Comet Assay statistisch vergleichbare Schadenswerte nach Bestrahlung mit 1 Gy und 2 Gy ($p = 2,244$). Eine statistisch signifikante Steigerung der Schadenswerte trat erst wieder nach Bestrahlung mit 3 Gy ein ($p < 0,001$) (Abb. 37, Tab. 21). Der „Tail Moment Olive“ zeigte statistisch keinen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und nach Bestrahlung mit 1 Gy ($p = 1,22$). Auch sank der „Tail Moment Olive“ im neutralen Comet Assay nach Bestrahlung mit 3 Gy unter das Ergebnis der Bestrahlung mit 2 Gy ab (Abb. 38, Tab. 22). Kein klarer Trend ließ sich bei einem Vergleich zwischen alkalischem und neutralem Comet Assay ablesen. So waren beispielsweise die „Tail Length“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung der Lymphozyten im alkalischen Comet Assay nach Bestrahlung mit 2 Gy ($p < 0,001$) signifikant höher und in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$) signifikant niedriger als im neutralen Comet Assay. Nach Bestrahlung mit 1 Gy ($p = 0,068$) und 3 Gy ($p = 8,4$) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen alkalischem und neutralem Comet Assay (Abb. 37, Tab. 21). Auch bei den Parametern „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“ war kein klarer Trend beim Vergleich des alkalischen und neutralen Comet Assay auszumachen.

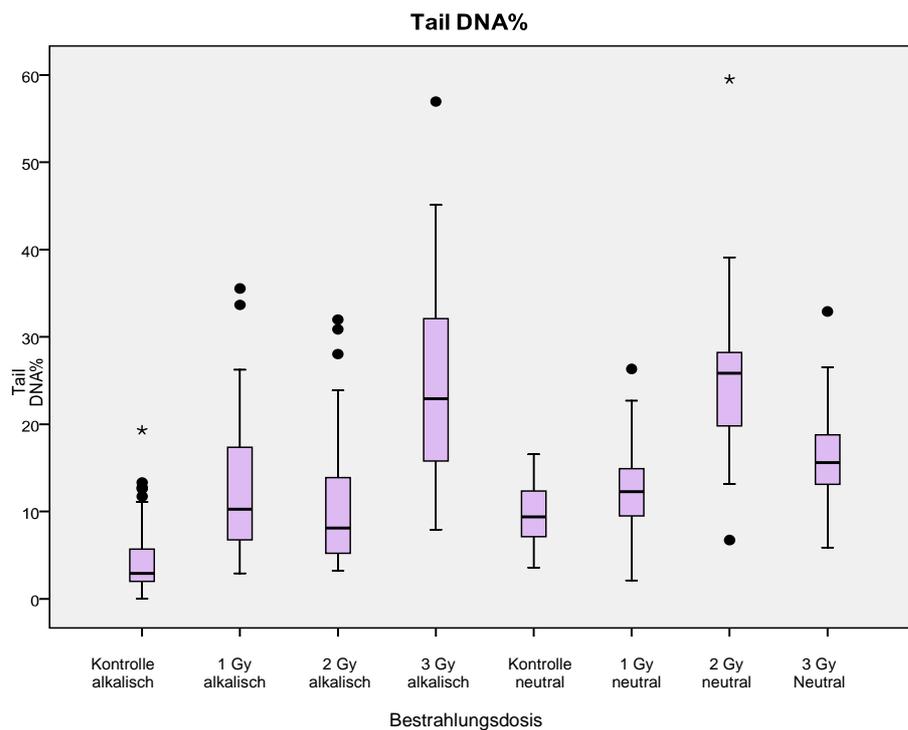


Abbildung 36: „Tail DNA%“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von Lymphozyten mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 20: „Tail DNA%“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von Lymphozyten mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail DNA%								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	3	10	8	23	9	12	26	16
Minimum	0	3	3	8	4	2	7	6
Maximum	19	36	32	57	17	26	60	33
Perzentile: 25	2	6	5	16	7	9	20	13
75	6	17	14	32	12	15	28	19

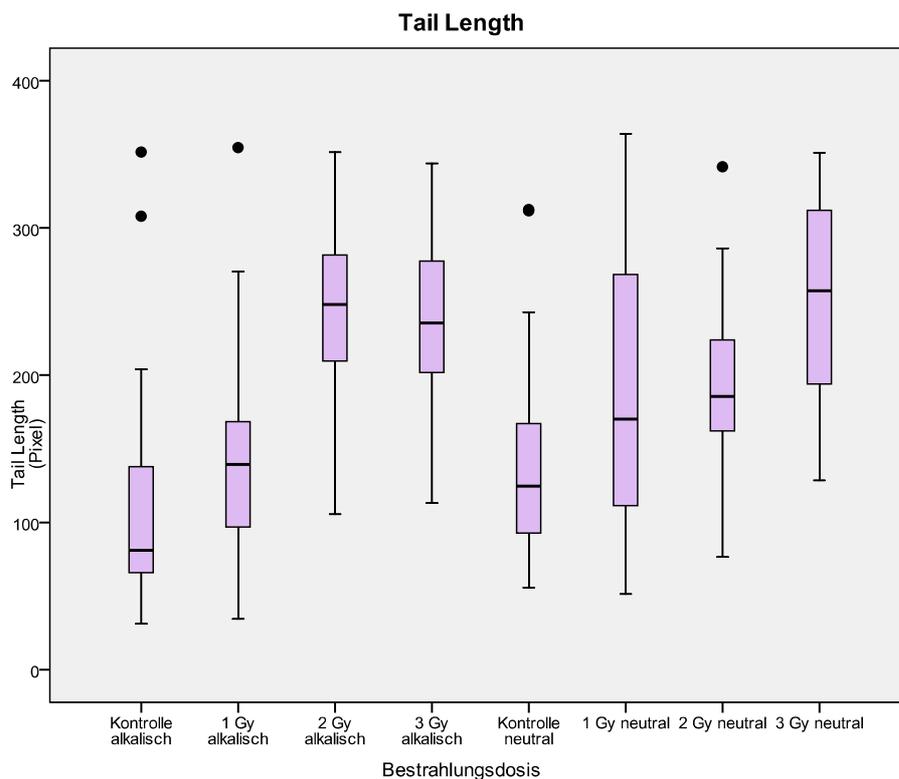


Abbildung 37: „Tail Length“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von Lymphozyten mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 21: „Tail Length“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von Lymphozyten mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Length								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	81	139	248	235	125	170	186	257
Minimum	31	34	106	113	56	51	77	128
Maximum	352	355	352	344	313	364	342	351
Perzentile: 25	65	97	206	202	92	111	162	193
75	139	168	282	278	168	271	225	313

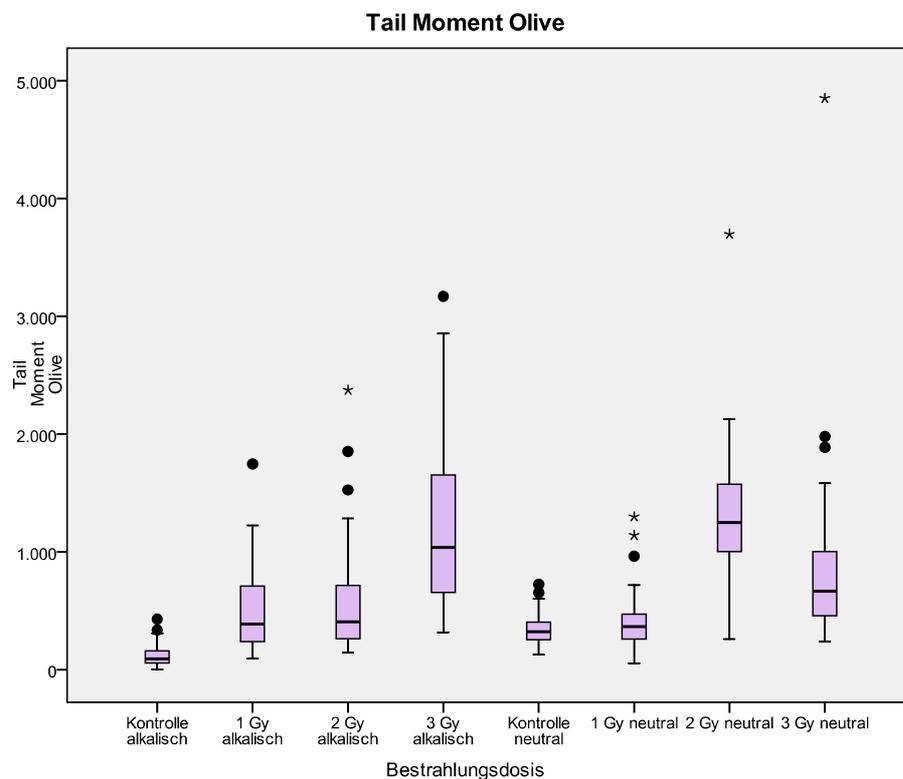


Abbildung 38: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von Lymphozyten mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tabelle 22: „Tail Moment Olive“-Ergebnisse nach γ -Bestrahlung von Lymphozyten mit Caesium-137 im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Tail Moment Olive								
	Alkalischer Comet Assay				Neutraler Comet Assay			
	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy	Kontrolle	1 Gy	2 Gy	3 Gy
Median	91	387	405	1037	323	365	1247	667
Minimum	0	95	143	316	126	54	259	238
Maximum	428	1746	2373	3171	725	1298	3698	4852
Perzentile: 25	54	237	255	644	250	259	997	452
75	160	709	719	1681	403	472	1575	1015

Repräsentative Beispiele für die mit Hilfe des TILL- Phototronics[®]- Systems dargestellten Kometen nach γ - Bestrahlung der humanen Lymphozyten zeigen die Abbildungen 39 und 40.

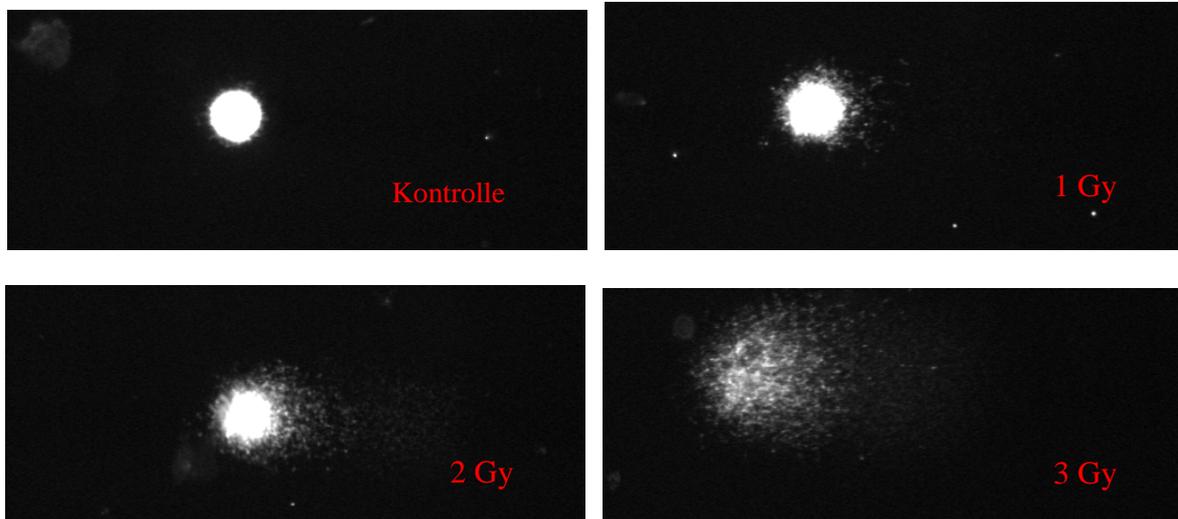


Abbildung 39: Kometen von humanen Lymphozytenzellkernen nach γ -Bestrahlung mit Caesium-137 im alkalischen Comet Assay. Betrachtung unter einem Epifluoreszenzmikroskop in 40facher Vergrößerung nach Färbung mit SYBR[®]-Green. Oben links Kontrollgruppe, oben rechts nach Bestrahlung mit 1 Gy, unten links nach Bestrahlung mit 2 Gy, unten rechts nach Bestrahlung mit 3 Gy

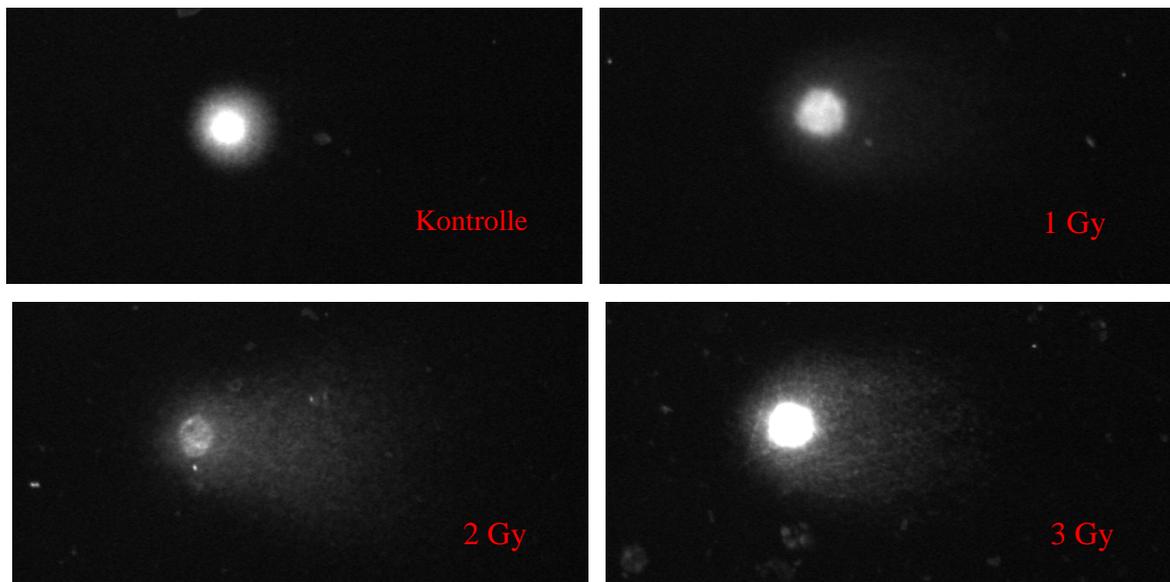


Abbildung 40: Kometen von humanen Lymphozytenzellkernen nach γ -Bestrahlung mit Caesium-137 im neutralen Comet Assay. Betrachtung unter einem Epifluoreszenzmikroskop in 40facher Vergrößerung nach Färbung mit SYBR[®]-Green. Oben links Kontrollgruppe, oben rechts nach Bestrahlung mit 1 Gy, unten links nach Bestrahlung mit 2 Gy, unten rechts nach Bestrahlung mit 3 Gy

6 Diskussion

Mit Hilfe des Comet Assays ist es möglich initiale DNA-Schäden einzelner Zellen darzustellen. In Agarose eingebettete Zellen werden hierfür lysiert und die DNA im elektrischen Feld aufgetrennt. DNA-Fragmente tragen negative Ladungen und wandern im elektrischen Feld zum Pluspol. In der Agarose werden die DNA-Bruchstücke entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, da kleinere Fragmente eine längere Wegstrecke zurücklegen als größere Bruchstücke. Ungeschädigte, chromosomale DNA ist dagegen zu groß um bei der gewählten Agarosekonzentration (0,5%) im elektrischen Feld zu wandern und verbleibt im Zellkern. Die Anfärbung der DNA erfolgt durch einen Farbstoff, in dieser Arbeit SYBR-Green[®], der den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der DNA-Fragmente ermöglicht. Im Zuge der Elektrophorese können theoretisch DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche bei alkalischem pH oder nur DNA-Doppelstrangbrüche bei neutralem pH nachgewiesen werden. Im alkalischen Comet Assay kommt es zur Hydrolyse der Wasserstoffbrücken zwischen den Basen der komplementären DNA-Stränge und der Kometenschweif besteht aus DNA-Einzelsträngen, die aus Einzel- und Doppelstrangbrüchen resultieren. Im neutralen Comet Assay werden die komplementären DNA-Stränge nicht getrennt, so dass im Kometenschweif nur Fragmente wandern sollten, die aus DNA-Doppelstrangbrüchen resultieren.

Es wurde daher erwartet, dass nach Bestrahlung von Zellen die Schadenswerte im alkalischen Comet Assays höher sind als im neutralen Comet Assay. Diese Erwartung wurde größtenteils nicht erfüllt. Stattdessen wies der bei neutralem pH-Wert durchgeführte Comet Assay häufig höhere Schadenswerte auf als der alkalische Comet Assay. Beispielsweise waren alle ermittelten „Tail DNA%“-Werte der zusammengefassten Ergebnisse nach α -Bestrahlung von HSC45-M2 Zellen im neutralen Comet Assay statistisch signifikant höher als im alkalischen Comet Assay (Abb. 21, Tab. 11).

Außerdem wurde erwartet, dass die mit dem α -Emitter Americium-241 bestrahlten HSC45-M2 Zellen bzw. Lymphozyten im neutralen Comet Assay deutlich höhere Schadenswerte aufweisen als Zellen nach γ -Bestrahlung mit Caesium-137, da α -Partikel eine höhere Anzahl an Doppelstrangbrüchen erzeugen als γ -Strahler. Auch diese Erwartung wurde nicht erfüllt. Beispielsweise wiesen die HSC45-M2 Zellen nach γ -Bestrahlung mit 1 Gy ($p < 0,001$) und 2 Gy ($p = 0,012$) höhere „Tail Moment

Olive“-Schadenswerte auf als nach Bestrahlung mit Americium-241. Erst nach α -Bestrahlung mit 3 Gy lieferten HSC45-M2 Zellen einen höheren „Tail Moment Olive“-Wert ($p = 0,044$) als nach γ -Bestrahlung (Abb. 23, Abb. 28, Tab. 13, Tab. 16). Zusätzlich fiel eine große Streuung in den Werten der ermittelten Schadensparameter auf. Dies ist gut ersichtlich aus den einzelnen Minimal- und Maximalwerten, sowie am Interquartilsabstand, den „Whiskern“ und Ausreißern der abgebildeten Boxplots.

Zur Interpretation dieser unerwarteten Ergebnisse wurden Arbeiten anderer Forschungsgruppen herangezogen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse durch unterschiedliche Bedingungen bei der Elektrophorese nur bedingt vergleichbar sind.

So wird durch die gewählte Feldstärke während der Elektrophorese die Distanz der DNA-Migration beeinflusst [Olive *et al*, 1991]. Unterschiedliche Feldstärken während der Elektrophorese bedingen unterschiedliche Ergebnisse der „Tail Length“ und des „Tail Moment Olive“, da die „Tail Length“ in der Berechnung des „Tail Moment Olive“ enthalten ist. Bei unterschiedlichen Elektrophoresebedingungen ist somit kein Vergleich der absoluten Schadenswerte möglich. Ein Vergleich verschiedener Studien wird zusätzlich durch unterschiedliche Dimensionen, in denen die Ergebnisse angegeben werden, erschwert. Das in dieser Arbeit verwandte Auswertesystem der Firma TILL-Phototonics[®] gibt die Werte für die „Tail Length“ beispielsweise in Pixel an. Andere Systeme wie z.B. Meta- Systems[®] berechnen die „Tail Length“ dagegen in μm . Dies beeinflusst auch den Parameter „Tail Moment Olive“, da die „Tail Length“, wie oben bereits erwähnt, in dessen Berechnung eingeht. Die Absolutwerte dieser Parameter sind zwischen den Systemen nicht vergleichbar. Eine Umrechnung ist mit Kenntnis von verwandter Mikroskop-Vergrößerung und Pixelgröße der Kamera möglich:

Objektgröße [Pixel] = Objektgröße [μm] x (Mikroskopvergrößerung / Pixelgröße Kamera)

Eine Umrechnung ist aber nur für einen Vergleich von Daten, die bei identischen Elektrophorese-Bedingungen ermittelt wurden, sinnvoll.

Einfluss auf die ermittelte Höhe der Schadensparameter nimmt auch die Agarose-Konzentration im Gel. Je geringer die Konzentration, desto größer ist die Maschenweite im Agarosegel. Dies führt dazu, dass auch größere Fragmente im Agarosegel wandern können [Drosch, 2005]. Der Grundschaden erscheint bei geringer Konzentration der Agarose also höher. Kleinere DNA-Fragmente können bei niedriger Agarose-Konzentration weiter und schneller wandern. Eventuell wandern sie aus dem Detektionsbereich des Kometen hinaus und werden nicht gewertet. Daraus kann fälschlicherweise eine Verringerung der Schadensparameter resultieren. Bei höherer Agarose-Konzentration ist das Poren-Netzwerk kleiner und größere Fragmente werden im Kern zurückgehalten. Es ist daher von der Höhe der gewählten Bestrahlungsdosen abhängig, bei welcher Agarose-Konzentration die Elektrophorese am besten erfolgt. In der Literatur wird beispielsweise sehr oft 1% Agarose verwandt ([Olive *et al*, 1991, 1994, 1995; Wojewódzka *et al*, 2002]). In dieser Arbeit wurde 0,5% Agarose benutzt. Dies ermöglichte eine bessere Auftrennung von längeren DNA-Fragmenten. Diese sind bei Doppelstrangbrüchen häufiger zu erwarten. Dabei muss berücksichtigt werden, dass dadurch in dieser Arbeit der erwartete Grundschaden höher ausfallen würde, als in den oben zitierten Arbeiten von Olive *et al* (1991, 1994, 1995) und Wojewódzka *et al* (2002).

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse detailliert diskutiert, Vergleiche mit den Daten anderer Forschungsgruppen angestellt, sowie Erklärungen und Lösungsvorschläge für die beobachteten Probleme gegeben.

6.1 Streuung der Ergebnisse

Die ermittelten Ergebnisse wiesen eine große Streuung auf. Auch andere Forschungsgruppen berichten über eine große Streuung ihrer Schadenswerte. Malcolmson *et al* (1995) ermittelten große Abweichungen ihrer Ergebnisse bei Verwendung des Comet Assays im alkalischen pH-Bereich nach Bestrahlung von humanen Lymphozyten mit 2 Gy aus einer Caesium-137-Quelle. Als Spender der Lymphozyten dienten sowohl Patienten die an Karzinomen litten (8 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches, 2 Patientinnen mit Cervixkarzinomen) als auch 5 gesunde Probanden. Malcolmson *et al* (1995) stellten hierbei ebenfalls eine große Streuung der „Tail Length“ Ergebnisse fest und verwendeten als Parameter Kometen mit einer Schweif-Länge $\geq 30 \mu\text{m}$. Eine

Vermutung für die Ursache der großen Streuung der Ergebnisse geben die Autoren nicht. Olive *et al* (1990) berichten ebenfalls über große Streuungen in der Schadensantwort von mit Röntgenstrahlung (0-20 Gy) bestrahlten V79-171b Zellen des chinesischen Hamsters und aus Mäusen isolierten SCCVII-Tumorzellen. Als mögliche technische Gründe hierfür diskutierten die Autoren unter anderem die unterschiedliche Lage der Zellen im Agarosegel, das unterschiedliche Ausmaß der Zell-Lysis und Inhomogenitäten der Agarose. So könnte DNA am Übergang von Agarose und Objektträger bei der Wanderung in der Elektrophorese behindert werden und niedrigere Schadenswerte aufweisen als DNA, die in der Mitte des Objektträgers zu liegen kam. Da Kometen, die sich in ähnlicher Position auf dem Objektträger befanden, aber ebenfalls große Heterogenitäten aufwiesen, erscheint diese Interpretation der Befunde eher unwahrscheinlich. Olive *et al* (1990) vermuten daher, dass technische Faktoren alleine die hohe Streuung der Ergebnisse nicht ausreichend erklären können. Sie halten auch Ursachen, die in der Biologie der Zellen selbst begründet sind, für mitverantwortlich. So könnte unter anderem die Art und Weise der DNA-Verpackung, d.h. ihre Vernetzung mit Proteinen und die damit verbundene DNA-Kondensation einen großen Einfluss auf die Höhe der Schadensparameter nehmen. Um den Einfluss von Proteinen oder RNA zu klären, erscheint eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit RNase und Proteasen sinnvoll (siehe auch Punkt 6.2.2). Auch könnte ein gesetzter Schaden in bestimmten DNA-Arealen mit größerer Wahrscheinlichkeit zu einem DNA-Strangbruch führen als in anderen DNA-Bereichen. Bestärkt wird diese Argumentation durch Befunde von Sak und Stuschke (1998), wonach Doppelstrangbrüche im Bereich des c-myc-Proto-Onkogen-Genlokus schneller repariert werden als in anderen Gen-Loci. Jedoch war der Restschaden nach Reparatur im Bereich des c-myc-Genlokus um 30 % höher als bei der restlichen DNA. Eine Genlokus abhängige, unterschiedlich schnelle und effiziente Reparatur scheint demnach existent.

Alle hier diskutierten Erklärungsversuche für die Streuung der Werte der Schadensparameter im Comet Assay sind letztendlich nicht eindeutig zu belegen. Im Folgenden sollen nun mögliche Erklärungen für die Heterogenität der Schadenswerte nach Bestrahlung der Magenkarzinomzellen und der humanen Lymphozyten diskutiert werden.

6.1.1 Probleme bei der Adhäsion der HSC45-M2 Zellen auf der Mylarfolie

Für eine effiziente externe Bestrahlung mit dem α -Emitter Americium-241 müssen die HSC45-M2 Zellen auf der Mylarfolie als Monolayer wachsen. Damit wäre die Wahrscheinlichkeit von α -Partikeln getroffen zu werden, für alle Zellen annähernd gleich. In der Praxis war dies nicht zu verwirklichen. Die Zellen wuchsen oft mehrschichtig übereinander. Die Konzentration der Zellen auf der Mylarfolie spielte hierbei die entscheidende Rolle. Wurden zu viele Zellen eingesät, führte dies zur Verklumpung und zur Ablösung der Zellklumpen von der Mylarfolie. Es durften aber auch nicht zu wenige Zellen ausgesät werden, damit genügend Material für den Comet Assay zur Verfügung stand. Als optimale Zellzahl erwiesen sich $1,5 \times 10^6$ Zellen, die in 1,5 ml Medium suspendiert waren. Allerdings gab es auch nach Bestrahlung mit 3 Gy noch Zellen, die keine Schädigung aufwiesen. Möglicherweise waren sie auf Grund des mehrschichtigen Wachstums vor α -Partikeln mit ihrer nur wenige Zelldurchmesser betragenden Reichweite geschützt.

Die mit Caesium-137 bestrahlten HSC45-M2 Zellen wiesen nach einer Dosis von 1 Gy sowohl im alkalischen als auch im neutralen Comet Assay ausnahmslos höhere Schadenswerte auf, als die mit dem α -Emitter Americium-241 bestrahlten HSC45-M2 Zellen. Dies bestärkt die Vermutung, dass die mehrschichtig adhärierten HSC45-M2 Zellen vor allem bei niedriger Bestrahlungsdosis vor den α -Partikeln geschützt waren. Durch γ -Bestrahlung mit deutlich größerer Reichweite wurden dagegen auch bei Bestrahlung mit 1 Gy mehr Zellen getroffen und daher mehr DNA-Schäden gesetzt.

Die Probleme, die durch Verwendung der Mylarfolie bei der Bestrahlung auftraten, nehmen wahrscheinlich Einfluss auf die Heterogenität der Ergebnisse, können aber nicht ausschließlich dafür verantwortlich sein, da auch bei der γ -Bestrahlung in Eppendorf-Reaktionsgefäßen große Heterogenitäten in der Schadensantwort auftraten.

6.1.2 Einfluss der Zellzyklusstadien auf die Schadenswerte

Die Tatsache, dass sich die Magenkarzinomzellen und die Lymphozyten während der Bestrahlung in verschiedenen Stadien des Zellzyklus befanden, könnte möglicherweise zur Heterogenität der Schadensantwort beigetragen haben. Mit diesem Thema beschäftigen sich verschiedene Forschungsgruppen, die zu

widersprüchlichen Ergebnissen kommen. Einige Arbeiten zeigen, dass DNA von Zellen in der S- und G1-Phase sowohl durch zahlreiche chemische Substanzen (z.B. Actinomycin D, Bleomycin) als auch durch Strahlung stärker geschädigt wird, als DNA die nicht repliziert bzw. transkribiert wird. [Elia und Bradley, 1992]. DNA, die nicht transkribiert oder repliziert wird, ist laut Elia und Bradley (1992) durch zahlreiche Proteine dichter gepackt, als DNA in der S- oder G1-Phase. Dadurch ist sie besser vor Schädigungen geschützt und DNA-Strangbrüche sollten seltener auftreten als bei DNA in der S/G1-Phase. Um diesen Sachverhalt zu klären, bestrahlten Elia und Bradley (1992) Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) sowie isolierte Zellkerne vor und nach Ablösung von Chromatinproteinen mit einer Caesium-137-Quelle mit Dosen von 10 bis maximal 40 Gy. Zuvor wurde die DNA mittels [^{14}C] Thymidin markiert. Die Darstellung der entstandenen DNA-Doppelstrangbrüche erfolgte mittels „asymmetrischer Field Inversion Gel Elektrophorese“, die darauf beruht, dass DNA-Bruchstücke, die kleiner als 6 Megabasen sind, im Zuge der Elektrophorese in ein Gel wandern. Die ungeschädigte DNA sowie Fragmente > 6 Megabasen verbleiben am Ausgangsort. Die DNA-Bruchstücke im Gel werden mittels Ethidium Bromid angefärbt. An Hand der ermittelten [^{14}C]-Radioaktivität ist eine indirekte Aussage über die Zahl der gesetzten DNA-Doppelstrangbrüche möglich. Zur Ablösung von Proteinen der DNA und damit zur Simulierung einer Situation wie in der G1- bzw. S-Phase, inkubierten Elia und Bradley (1992) isolierte Zellkerne mit verschiedenen hoch konzentrierten NaCl-Lösungen. Bei 0.35 M NaCl-Lösung werden vor allem Nicht-Histon-Proteine entfernt, bei 0.6 M NaCl zusätzlich Histon H1-Proteine, bei 1.2 M NaCl auch H2A- und H2B-Histone und bei 2.0 M NaCl zusätzlich H3- und H4-Histone. DNA, die transkribiert wird ist vor allem von Nicht-Histon-Proteinen und Histon H1 befreit [Elia und Bradley, 1992]. Nach Entfernung der Nicht-Histon-Proteine in isolierten Zellkernen vor der γ -Bestrahlung mit 20 Gy erhöhte sich der in der „asymmetrischen Field Inversion Gel Elektrophorese“ gemessene Schadensparameter F.A.R. (fraction of radioactivity released) im Vergleich zu den intakten Zellen um den Faktor 3. Im Vergleich zur Anwendung von 0.35 M NaCl bewirkte die Behandlung der Zellen mit 0.6 M NaCl nur eine geringe Erhöhung der DNA-Schäden. Eine Steigerung des gemessenen Schadenswertes F.A.R. um das 10fache ergab sich dagegen nach Behandlung der Zellkerne mit 1.2 M NaCl. Diese Ergebnisse unterstützen die These der Autoren,

wonach Zellkerne, deren DNA im Zuge der Replikation/Transkription weniger stark kondensiert vorliegt und daher durch Proteine weniger geschützt ist, nach Bestrahlung eine höhere DNA-Doppelstrangbruchrate aufweisen. Die genauen Mechanismen, die den Ergebnissen zu Grunde liegen, sind nicht eindeutig geklärt. Elia und Bradley (1992) vermuten, Histone könnten der DNA sowohl als rein physikalischer Schutz dienen, als auch freie Radikale abfangen.

Eine Arbeit von Olive *et al* (1991) liefert diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse. Nach Bestrahlung von Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters (V79 Zellen), Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO Zellen), humanen Kolonkarzinomzellen (WiDr Zellen) und lymphoblastischen Zellen der Maus (L5178Y-S Zellen) mit Röntgenstrahlung (max. Dosis 100 Gy) wurden die DNA-Schäden mit Hilfe des neutralen Comet Assays dargestellt. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt, um eine Zuordnung der Zellen zu einzelnen Zellzyklusstadien mittels FACS zu ermöglichen. Damit konnte eine Aussage über das Ausmaß der DNA-Schäden von Zellen in verschiedenen Zellzyklusstadien getroffen werden. Mit Ausnahme der als sehr radiosensitiv geltenden L5178Y-S Zellen, zeigten alle Zelllinien in der S-Phase geringere „Tail Moment Olive“-Werte als Zellen, die sich in der G1- oder G2- Phase befanden. V79 Zellen zeigten nach Bestrahlung mit 50 Gy in der S-Phase einen „Tail Moment Olive“ Mittelwert von etwa 2,9, G1-Phase Zellen dagegen von etwa 6 und G2-Phase Zellen von circa 8. Nach Bestrahlung mit 100 Gy zeigte sich ein ähnliches Bild für die „Tail Moment Olive“ Werte (S-Phase Zellen: ca. 5,3; G1-Phase Zellen: ca. 13; G2-Phase Zellen: ca. 12). Auch unbestrahlte V79 Zellen wiesen in der S-Phase mit einem „Tail Moment Olive“ von etwa 1,5 niedrigere Schadenswerte auf als G1- und G2-Phase Zellen (Tail Moment Olive jeweils ca. 3,3). Vergleichbare „Tail Moment Olive“-Schadenswerte wurden auch für die CHO-Zellen ermittelt. Kaum einen Unterschied bezüglich der Schadensantwort in verschiedenen Zellzyklusstadien zeigten dagegen die L5178Y-S Zellen. Sie wiesen nach allen Bestrahlungsdosen einen deutlich höheren Schadenswert in der S-Phase auf als die anderen Zelllinien. So wurde bei Ihnen nach Bestrahlung mit 100 Gy in der S-Phase ein „Tail Moment Olive“ von etwa 9 gemessen, während die entsprechenden Werte bei den V79 Zellen nur etwa 5,3 und bei den CHO-Zellen etwa 5,8 betragen. Olive *et al* (1991) diskutierten als Grund für die vergleichsweise geringeren Schadenswerte bei Zellen in der S-Phase vor allem die Mobilität der DNA in der Elektrophorese. Die

DNA ändert zur Replikation ihre Konfiguration, so wird sie zum Beispiel an mehreren Stellen von der Helikase entwunden. Dies könnte bei einem Teil der DNA die Migration in der Elektrophorese erschweren.

Evans *et al* (1993) verwiesen ebenfalls auf eine geringere Migration von DNA-Fragmenten bei S-Phase Zellen im Comet Assay und beschränken sich in ihrer Arbeit deshalb auf Ergebnisse von Zellen in der G1- und G2/M-Phase. Für diese Zellzyklusstadien ließ sich im neutralen Comet Assay bei humanen B-Zell-Lymphoblasten (TK6-Zellen) nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (max. Dosis 100 Gy) bei gleicher Dosis annähernd gleiche Schadenswerte für den „Tail Moment Olive“ darstellen.

Auch bei Verwendung anderer Verfahren, wie der Pulsed Field Gel Elektrophorese [Stamato und Denko, 1990; Iliakis *et al*, 1991] und der Neutral Filter Elution [Iliakis *et al*, 1991], wurden nach Bestrahlung bei S-Phase Zellen niedrigere Schadenswerte gemessen, als bei Zellen in anderen Zellzyklusstadien. Bei der Pulsed Field Gel Electrophorese ändert sich während der Elektrophorese die Richtung des Stroms in Sekunden oder Sekundenbruchteilen in 3 Richtungen. Eine davon läuft durch die zentrale Achse des Gels, die beiden anderen in einem Winkel von 120° zu jeder Seite. Dadurch entsteht eine netzartige Auftrennung der DNA. Bei der neutralen Filter Elution werden die Zellen auf Filter aufgetragen und nach Lyse mit einem neutralen Puffer werden sämtliche zelluläre Bestandteile mit Ausnahme der DNA entfernt. Auf dem Filter bleibt nur die DNA zurück. Der Filter mit der DNA wird dann mehrere Stunden lang mit geeigneter Lösung durchströmt. Die ausgewaschene Lösung wird in mehreren Fraktionen gesammelt und der DNA-Gehalt in den einzelnen Fraktionen ermittelt.

Auf Grund der oben diskutierten, widersprüchlichen Ergebnisse ist es schwierig zu beurteilen, wie groß der Einfluss der einzelnen Zellzyklusstadien auf die Streuung der in dieser Studie erzielten Ergebnisse ist. Da unterschiedliche Zellpopulationen auch unterschiedliche Ergebnisse liefern, werden eindeutige Aussagen zusätzlich erschwert. In unserem Fall wäre der Einfluss der Zellzyklusstadien auf die Höhe der DNA-Schäden bei Magenkarzinomzellen und Lymphozyten nur durch Versuche mit synchronisierten Zellpopulationen zu ermitteln gewesen. Auf eine Synchronisation wurde aber verzichtet, da die Antwort einer Zellpopulation auf Bestrahlung unter Bedingungen, möglichst ähnlich denen *in vivo*, untersucht werden sollte.

6.1.3 Einfluss von Schäden die während der Präparation induziert werden auf die Schadenswerte

Banáth *et al* (1998) bemerkten bei Versuchen mit humanen Lymphozyten, dass isolierte Lymphozyten höhere Schadensparameter aufweisen als im Vollblut bestrahlte. Die mittels Ficoll-Paque in mehreren Zentrifugationsschritten isolierten Zellen wiesen zum Teil mehr als doppelt so hohe Schadenswerte auf, als im Vollblut bestrahlte Lymphozyten. Bei der Isolierung der Lymphozyten entstanden durch Suspendieren, Pipetieren, Aufnehmen in 50°C heiße Agarose und Lysieren der Zellen zusätzliche DNA-Schäden. Banáth *et al* (1998) stellten allerdings keine Unterschiede in der Heterogenität der Schadenswerte fest. Die Streuung der Ergebnisse ist durch die Präparation der Zellen somit nicht erklärbar, wohl aber der hohe Grundscha-den, der sowohl im neutralen als auch im alkalischen Comet Assay nachweisbar war.

6.1.4 Einfluss des Zeitpunktes der DNA-Anfärbung auf die ermittelten Schadenswerte

Da Fluoreszenzfarbstoffe zur Anfärbung der DNA kontinuierlich verblassen, variieren die Ergebnisse des Comet Assays in Abhängigkeit von der Zeit, die zwischen Elektrophorese und Auswertung liegt. Dieses Problem kann durch Auswertung innerhalb von 24 Stunden nach Elektrophorese minimiert werden. Ungenauigkeiten sind dennoch nicht zu vermeiden. Daneben kann sich ein weiteres Phänomen auf die exakte Ermittlung der Schadensparameter auswirken, vor allem wenn zu viel Zeit zwischen Elektrophorese und Auswertung liegt. Von Olive und Banáth (1995) wurde ein „Zurückziehen“ der DNA aus dem Schweif Richtung Kopf beschrieben. Dieses Phänomen tritt vor allem bei niedrigen Bestrahlungsdosen auf. Vermutlich basiert es auf der Tatsache, dass auch Enden hochmolekularer DNA in der Elektrophorese wandern. Nach Beendigung der Elektrophorese werden diese wieder zurück in den Kopf des Kometen gezogen. Olive und Banáth (1995) beobachteten Veränderungen der Schadenswerte schon bei einem Zeitraum von mehr als einer Stunde nach Beendigung der Elektrophorese. HT144-(Melanom) Zellen und DU145-(Prostata-Karzinom) Zellen wurden mit Röntgenstrahlung (bis 200 Gy) bestrahlt. Die Auswertung erfolgte 1 Stunde und 24 Stunden nach Elektrophorese-Ende. Olive und

Banáth (1995) färbten die Zellen unmittelbar nach Elektrophorese-Ende mit Propidium Iodid. Je niedriger die Bestrahlungsdosis war, umso stärker verringerte sich der Schadenswert nach 24 Stunden im Vergleich zu den Werten, die 1 Stunde nach Elektrophorese ermittelt wurden. Besonders deutlich zeigte sich der Unterschied dabei im Parameter „Tail Moment Olive“, da sowohl die Menge an eingewanderter DNA als auch die Schweiflänge des Kometen abnimmt. Der „Tail Moment Olive“ der mit 20 Gy bestrahlten Melanom - und Prostatakarzinomzellen betrug 24 Stunden nach Elektrophorese-Ende etwa 60% des Wertes, der eine Stunde nach Elektrophorese-Ende bestimmt worden war. Nach Bestrahlung mit 80 Gy erreichten beide Zelllinien 24 Stunden nach Elektrophorese-Ende „Tail Moment Olive“-Werte, die jeweils etwa 80% des Ergebnisses betrug, das eine Stunde nach Elektrophorese ermittelt wurde. Eine Abweichung beider „Tail Moment Olive“-Werte von weniger als 8% trat nach Bestrahlung mit 200 Gy auf.

In dieser Arbeit betrug die Zeit nach Elektrophorese bis zur Auswertung etwa 24 Stunden, vorgegeben durch die Zeiten zur DNA-Präzipitation/Fixierung (30 Minuten), Dehydrierung (über Nacht), Rehydrierung und Trocknung (mind. 1 Stunde) des verwendeten Protokolls. Eine Auswertung eine Stunde nach Elektrophorese-Ende, wie von Olive und Banáth (1995) empfohlen, war daher nicht möglich. In der Literatur wird in der Regel ebenfalls ein Zeitraum von etwa 24 Stunden zwischen Elektrophorese und Auswertung der angefärbten DNA angegeben. Es gibt kaum Veröffentlichungen, in denen so zeitnah ausgewertet wurde, wie von Olive und Banáth (1995) gefordert. Da in dieser Arbeit die Präparate konsequent etwa 24 Stunden nach Bestrahlung ausgewertet wurden, kann es zu einer Zunahme der Heterogenität der Schadenswerte nur innerhalb des relativ langen Zeitraumes der mikroskopischen Auswertung mit Hilfe des TILL[®]-Phototonics-Systems gekommen sein. Dieser betrug pro Versuch für alle Objektträger etwa 5 Stunden, da pro Versuch 16 Objektträger mit jeweils 50 Kometen ausgewertet wurden. Für jeden Objektträger werden etwa 20 Minuten Auswertzeit am TILL[®]-Phototonics-System benötigt. Innerhalb dieser Zeitspanne könnte es zu einem Zurückziehen von DNA-Enden in den Kometenkopf gekommen sein. Dadurch könnten bei Objektträgern, die zum Schluss ausgewertet wurden, niedrigere Schadensparameter gemessen worden sein, als bei Objektträgern die am Anfang ausgewertet wurden. Ein Einfluss auf die Heterogenität der Schadenswerte erscheint daher besonders im Hinblick auf die

niedrigen Bestrahlungsdosen von maximal 3 Gy wahrscheinlich. Wie groß dieser Einfluss war, müsste durch weitere Versuche mit Magenkarzinomzellen und Lymphozyten geklärt werden. Ein Teil der mit 1-3 Gy bestrahlten Zellen müsste dabei zu Beginn ausgewertet werden, der andere Teil erst nach 5 Stunden. Eine dabei ermittelte Veränderung der Schadenswerte könnte den Einfluss der Zeit auf die Höhe der Schadenswerte klären.

Für die relativ große Streuung der Ergebnisse in dieser Arbeit kann letztendlich keine zufriedenstellende Erklärung gefunden werden. Da auch in der Literatur relativ hohe Streuungen für die Schadenswerte bei alkalischem und neutralem Comet Assay beschrieben werden, ist eine fehlerhafte Durchführung des Comet Assays in dieser Arbeit auszuschließen.

6.2 Mögliche Ursachen für relativ hohe Werte der Schadensparameter des Comet Assays bei neutralem pH

Der Comet Assay bei neutralem pH lieferte häufig höhere Schadenswerte als der Comet Assay bei alkalischem pH. Dies entsprach nicht den Erwartungen, da bei neutralem pH ausschließlich Doppelstrangbrüche erfasst werden, bei alkalischem pH dagegen Einzel- und Doppelstrangbrüche. Vergleiche der Schadenswerte nach alkalischem bzw. neutralem Comet Assay wurden auch von anderen Forschungsgruppen durchgeführt. Bergqvist *et al* (1998) analysierten humane Bronchialkarzinom-Zellen (U-1810) nach Bestrahlung mit einer ⁶⁰Co-Quelle im Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH. Nach γ -Bestrahlung mit Dosen von 1-5 Gy wurde die Elektrophorese ohne Angabe von Gründen bei neutralem pH 10 Minuten bei 0,25 V/cm, bei alkalischem pH 5 Minuten bei 0,7 V/cm durchgeführt. Die unterschiedlichen Elektrophorese-Bedingungen erschwerten einen Vergleich der Ergebnisse beider Comet Assays. Die Bestrahlung der Zelllinie U-1810 (großzelliges Bronchialkarzinom) lieferte in beiden pH-Bereichen Schadenswerte, die mit den hier erzielten Ergebnissen bei Magenkarzinomzellen und Lymphozyten vergleichbar sind. Bei unbestrahlten U-1810 Zellen war der „Tail Moment Olive“ beim neutralen Comet Assay um den Faktor 3 höher als bei alkalischem Comet Assay. Nach Bestrahlung mit 1 Gy war der „Tail Moment Olive“ bei neutralem pH annähernd doppelt so hoch wie bei alkalischem pH. Ähnliche Befunde waren auch in dieser Studie bei den Magenkarzinomzellen und den Lymphozyten zu beobachten. Beispielsweise lieferten

die Lymphozyten in der zur γ -Bestrahlung zugehörigen Kontrollgruppe im neutralen Comet Assay einen signifikant höheren „Tail DNA%“-Wert als im alkalischen Comet Assay (Abb. 36 und Tab. 20). Nach α -Bestrahlung mit 1 Gy zeigten HSC45-M2 Zellen im 2. Versuch im neutralen Comet Assay einen signifikant höheren „Tail Moment Olive“ Schadenswert als im alkalischen Comet Assay (Abb. 17 und Tab. 7). Drei weitere Zelllinien, U-1752 aus einem Plattenepithelkarzinom der Lunge, U-1285 aus einem kleinzelligen Bronchialkarzinom und U-1906E gewonnen aus einer Gehirnmetastase eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms, die Bergqvist *et al* (1998) im Rahmen ihrer Arbeit untersuchten, zeigten dagegen keine signifikant unterschiedlichen Schadenswerte bei neutralem und alkalischem Comet Assay, sowohl bei unbestrahlten Zellen als auch nach Bestrahlung mit 1 Gy.

Banáth *et al* (1998) analysierten Schäden in humanen Lymphozyten nach Röntgenbestrahlung mit dem Comet Assay bei alkalischem und neutralem pH. Bei unbestrahlten Lymphozyten war der „Tail Moment Olive“ bei neutralem pH annähernd 6fach höher als bei alkalischem pH. Für den alkalischen Comet Assay wurden die Lymphozyten von Banáth *et al* (1998) mit 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt, für den neutralen Comet Assay dagegen mit 10, 25, 50, 75 und 100 Gy. Ein Vergleich der Schadenswerte aus beiden pH-Bereichen ist bei Banáth *et al* (1998) somit nur bei 10 Gy möglich. Bei neutralem pH lag der „Tail Moment Olive“ für die Lymphozyten bei etwa 5, bei alkalischem pH bei etwa 29. Banáth *et al* (1998) kommentierten die höheren Tail Moment Olive Werte der unbestrahlten Lymphozyten bei neutralem Comet Assay nicht.

Letztendlich kann keine der zitierten Arbeiten zufrieden stellende Erklärungen für die vergleichsweise hohen Schadenswerte bei neutralem pH liefern. Im Folgenden werden daher mehrere denkbare Erklärungen diskutiert.

6.2.1 Durch den neutralen Comet Assay möglicherweise erfasste DNA-Schäden

Die vergleichsweise hohen Schadenswerte im neutralen Comet Assays lassen vermuten, dass in diesem Assay nicht ausschließlich Doppelstrangbrüche erfasst werden. Diese Fragestellung wurde von Wojewódzka *et al* (2002) an Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) untersucht. Zunächst bestrahlten sie die Zellen mit UV-C-Licht (245 nm). Hierbei entstehen vor allem Cyclobutan- Pyrimidin-Dimere

und 6-4 Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte. Diese werden von der humanen Zelle mittels Excisionsreparatur repariert. Dabei entstehen vorübergehend Einzelstrangbrüche. Die initial durch UV-C-Strahlung gesetzten Pyrimidindimerisierungen sind weder bei neutralem noch bei alkalischem Comet Assay nachweisbar, da hierbei keine Einzelstrangbrüche entstehen.

Im Comet Assay bei neutralem pH betrug der „Tail Moment Olive“ der unbestrahlten Zellen etwa 13, bei alkalischem pH etwa 9. Während der Reparatur, bei der vorübergehend Einzelstrangbrüche erzeugt werden, konnten im neutralen Comet Assay keine zusätzlichen Schäden nachgewiesen werden. Der „Tail Moment Olive“ lag hierbei mit 11 sogar etwas unter dem Wert der unbestrahlten Zellen. Im alkalischen Comet Assay war hingegen nach 30 Minuten, solange benötigt das Nukleotid-Excisions-Reparatursystem zum Setzen der Einzelstrangbrüche, ein signifikanter Anstieg des „Tail Moment Olive“ auf über 93 nachweisbar. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass Einzelstrangbrüche nur im alkalischen, nicht aber im neutralen Comet Assay gemessen werden. Diese Befunde konnten auch mittels eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers gegen einzelsträngige DNA bestätigt werden (Wojewódzka *et al*, 2002). Im Comet Assay bei neutralem pH konnte im Gegensatz zum alkalischen pH die DNA mittels Antikörper nicht markiert werden, da bei neutralem pH keine Denaturierung der DNA in Einzelstränge erfolgt. Die DNA liegt dort stets doppelsträngig vor. Im Widerspruch zu diesen Befunden stehen jedoch Ergebnisse derselben Forschergruppe mit H_2O_2 als schädigendem Agens. Werden DNA-Schädigungen mit H_2O_2 gesetzt, treten fast ausschließlich Einzelstrangbrüche und oxidative Schädigungen auf und nur sehr selten Doppelstrangbrüche (Wojewódzka *et al*, 2002). Mit H_2O_2 geschädigte Zellen sollten im neutralen Comet Assay daher keine höheren Schadenswerte liefern als unbehandelte Zellen. Tatsächlich war der Schaden bei den mit H_2O_2 behandelten Zellen aber doppelt so hoch wie bei unbehandelten Zellen. Allerdings war der „Tail Moment Olive“-Wert bei den mit H_2O_2 behandelten Zellen im neutralen Comet Assay geringer (ca. 84%) als im alkalischen. Die Frage, ob im neutralen Comet Assay doch auch andere DNA-Schäden als Doppelstrangbrüche erfasst werden, lässt sich auch durch diese Befunde nicht endgültig beantworten.

Eventuell können auch zwei Einzelstrangbrüche, die auf gegenüberliegenden Strängen in räumlicher Nähe liegen, im neutralen Comet Assay fälschlicherweise als

Doppelstrangbruch gewertet werden. Ein geringer Anteil von Einzelstrangbrüchen könnte im neutralen Comet Assay dadurch messbar sein. Es wird kontrovers diskutiert, wie weit zwei Einzelstrangbrüche auf gegenüberliegenden Strängen auseinander liegen müssen, um vom neutralen Comet Assay fälschlicherweise als Doppelstrangbruch detektiert zu werden. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung von Doppelstrangbrüchen, die von der Zelle als solche erkannt werden, und zwei gegenüberliegenden Einzelstrangbrüchen, die vom Comet Assay als Doppelstrangbruch gewertet werden, bietet die Berücksichtigung von Reparaturmechanismen [Olive, 1998].

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen gliedert sich in eine schnelle und eine langsame Phase. Es ist anzunehmen, dass zwei nah gegenüberliegende Einzelstrangbrüche, die von der Zelle als Einzelstrangbrüche erkannt werden, in der frühen Phase repariert werden. Von der Zelle als Doppelstrangbruch betrachtete Läsionen, deren Reparatur schwieriger ist, sollten dagegen zum Großteil in der späten Phase beseitigt werden. In der frühen Reparaturphase beträgt die Halbwertszeit für Doppelstrangbrüche 10 Minuten [Olive, 1998]. Dies könnte ein Hinweis sein, dass nah gegenüberliegende Einzelstrangbrüche vom neutralen Comet Assay fälschlicherweise als Doppelstrangbruch gewertet wurden. Die Schwierigkeit besteht darin, dass auch „echte“ Doppelstrangbrüche in der frühen Phase repariert werden, vor allem wenn sie leicht für Reparatur-Enzyme zugänglich sind, sich also in Regionen befinden, in denen Transkription stattfindet [Olive, 1998]. Daher ist ein Ausschluss von „falschen Doppelstrangbrüchen“ an Hand der Reparaturmechanismen nicht möglich.

Wojewódzka *et al* (2002) zeigten, dass die DNA bei neutralem pH doppelsträngig vorliegt und daher sehr wahrscheinlich im neutralen Comet Assay keine „eindeutigen“ Einzelstrangbrüche gemessen werden. Ob nah gegenüber liegende Einzelstrangbrüche das Ergebnis verfälschen können ist unklar. Es ist denkbar, dass eine gewisse Anzahl dieser Einzelstrangbrüche gemessen wird. In welcher Zahl diese auftreten, kann bisher nicht sicher festgestellt werden. Da zwei Einzelstrangbrüche nur vergleichsweise selten räumlich nah gegenüber entstehen [Olive, 1998], ist ihr Anteil im Vergleich zu echten Doppelstrangbrüchen aber vermutlich gering.

6.2.2 Einfluss von RNA und Chromatinproteinen auf die Schadenswerte im Comet Assay

Zur Erhöhung der Sensitivität des Comet Assays ist eine möglichst vollständige Entfernung nukleärer Proteine von essentieller Bedeutung [Olive *et al*, 1995]. Durch DNA-bindende Proteine kann die Wanderung von DNA im elektrischen Feld der Elektrophorese behindert werden. Beim alkalischen Comet Assay erfolgt die Entfernung nukleärer Nicht-Histon Proteine vor allem mittels 0.31 M NaCl, das im Lysispuffer 2 enthalten ist. Im neutralen Comet Assay wird der Lysispuffer 2 durch TA-Puffer (enthält ausschließlich NaAc, TrisHCl und H₂O_{dd}) ersetzt. Daher werden beim neutralen Comet Assay die nukleären Proteine weniger effizient entfernt. In dieser Arbeit wurde darauf vertraut, dass durch Inkubation der Objektträger beim neutralen Comet Assays in Lysispuffer 1, der zu 80 % aus Lysispuffer 2 besteht und somit auch NaCl enthält, eine ausreichende Entfernung nukleärer Proteine stattfindet. Allerdings ist eine Beeinträchtigung der Wanderung der DNA-Fragmente während der Elektrophorese durch nicht entfernte Proteine, z.B. Histone, nicht gänzlich auszuschließen.

Zur möglichst effizienten Entfernung nukleärer Proteine wurden verschiedene Verfahren beschrieben. So wurde z.B. die Lysis bei 50°C für 4 Stunden durchgeführt [Olive *et al*, 1991, 1994, 1995, Evans *et al*, 1993]. Wegen mehrfach beschriebener, hitzelabiler DNA-Elemente [Rydberg, 2000] wurde jedoch in dieser Arbeit darauf verzichtet. Rydberg (2000) bestrahlte humane Fibroblasten mit Röntgenstrahlung und stellte die entstandenen DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe der Pulsed Field Gel Electrophoresis dar. Die Lysis der Zellen wurde hierbei einmal bei 50°C (24 Stunden) und einmal bei 4°C (96 Stunden) durchgeführt. Nach Bestrahlung mit 200 Gy trat bei den Fibroblasten die in 50°C warmen Lysispuffer inkubierten ein um 63% höherer Schadenswert auf als nach Lyse bei 4°C. Rydberg (2000) führte dies auf hitze-labile Elemente in der DNA zurück, die während der Bestrahlung entstehen. Diese bestehen vermutlich aus hitze-lablen Zuckerläsionen und liegen vor allem in multipel geschädigten DNA-Arealen vor. Durch Einwirkung von Wärme können daraus DNA-Doppelstrangbrüche entstehen. Eine Lysis bei 50°C nach Bestrahlung von Zellen kann somit falsche Schadenwerte zur Folge haben und wurde in dieser Arbeit daher auch nicht angewandt.

Für den neutralen Comet Assay wurde eine effiziente Entfernung nukleärer Proteine bei *Trichoderma koningii*-Protoplasten (Deuteromycetes) und humanen Lymphozyten mittels Proteinase K erprobt [Drosch, 2005]. Diese degradiert sowohl Histon- als auch Nicht-Histon-Proteine [Olive *et al*, 1995]. Drosch (2005) inkubierte hierzu die Objektträger mit den lysierten Zellen vor Beginn der Elektrophorese mit Proteinase K. Zusätzlich wurden die Zellen für 90 Minuten (37°C) mit RNase behandelt, um mögliche RNA Kontaminationen auszuschließen. Zur Kontrolle wurde ein neutraler Comet Assay ohne vorherige RNase- und Proteinase K-Inkubation durchgeführt. Die nicht mit RNase/Proteinase K behandelten Zellen wurden mit bis zu 20 Gy mit einer ⁶⁰Co- Quelle bestrahlt, die mit RNase/Proteinase K inkubierten Zellen mit bis zu 40 Gy. Bei *Trichoderma koningii* ließen sich nach Inkubation mit RNase/Proteinase K deutlich höhere Schadenswerte feststellen. Nach Bestrahlung mit 20 Gy zeigten die mit RNase und Proteinase K behandelten *Trichoderma koningii* Proben beispielsweise einen Tail DNA% Wert von 38%, während die Vergleichsgruppe nur einen Wert von 16% aufwies. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die anderen Bestrahlungsdosen und die „Tail Moment Olive“- Schadenswerte ermittelt.

Eine Dosis-Wirkungsbeziehung aber war bei den mit RNase/Proteinase behandelten *Trichoderma koningii*-Protoplasten nicht festzustellen. So wiesen beispielsweise die mit 5 Gy bestrahlten Proben einen „Tail Moment Olive“ von etwa 1700 auf, während der bei 10 Gy ermittelte Wert nur etwa 1300 betrug. Der „Tail Moment Olive“-Wert nach Bestrahlung mit 25 Gy war wiederum nahezu identisch mit dem bei 5 Gy ermittelten Wert. Bei den Lymphozyten kam es zu keiner Veränderung der Schadenswerte durch RNase/Proteinase K Inkubation. Die Erhöhung der Schadenswerte bei den *Trichoderma koningii*-Protoplasten als Folge der Inkubation mit RNase / Proteinase K erscheint aus folgenden Gründen plausibel: Werden die nukleären Proteine vor der Bestrahlung entfernt, entstehen während der Bestrahlung vermutlich mehr DNA-Strangbrüche, da der schützende Effekt der Proteine entfällt. Eine Entfernung nukleärer Proteine nach Bestrahlung erhöht die Schadenswerte durch Verbesserung der Mobilität der DNA-Fragmente in der Elektrophorese. Warum eine RNase / Proteinase K Behandlung bei den Lymphozyten zu keiner Veränderung der Schadenswerte führte, ist daher nicht zu verstehen. Da die Verwendung von RNase / Proteinase K nach Drosch (2005) die Versuchsbedingungen nicht optimierte wurden in der vorliegenden Arbeit weder RNase noch Proteinase K angewandt.

Da jedoch in dieser Studie die Schadenswerte im neutralen Comet Assay oft deutlich höher ausfielen als im alkalischen Comet Assay scheint die Entfernung nukleärer Proteine für die Ergebnisse ohnehin nicht von Bedeutung zu sein. Da im neutralen Comet Assay nukleäre Proteine schlechter entfernt werden als im alkalischen Comet Assay wären im neutralen Comet Assay niedrigere Schadenswerte auf Grund einer schlechteren Mobilität der DNA-Fragmente zu erwarten gewesen. Trotzdem kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass DNA-bindende Proteine zu einer Verfälschung der Computer-gestützten Auswertung im Comet Assay führen, wie im folgenden Punkt (6.2.3) ausgeführt.

6.2.3 Einfluss der mikroskopischen Auswertung auf die Schadenswerte

Bei der mikroskopischen Auswertung des neutralen Comet Assays trat vor allem bei Versuchen mit HSC45-M2 Zellen ein nicht genau definierbarer, fluoreszierender Background auf. Bei den Lymphozyten war dieses Problem wesentlich weniger präsent, aber auch vorhanden. Unklar ist, worum es sich bei diesem Background handelt. Der Farbstoff SYBR[®]-Green sollte eigentlich nur DNA anfärben. Dieser Background beeinträchtigte die Auswertung, da dadurch die Werte für die Schadensparameter erhöht wurden. Dies könnte vor allem bei unbestrahlten Zellen und nach Bestrahlung mit 1 Gy zu falsch hohen Schadenswerten geführt haben. Nach Bestrahlung mit 2 Gy und 3 Gy war der Background größtenteils von den radiogen induzierten Doppelstrangbrüchen überlagert und sein Einfluss als Fehlerquelle daher geringer.

Nach Olive *et al* (1990) trat bei Durchführung des neutralen Comet Assays mit Ovarialzellen des chinesischen Hamsters und SCCVII Zellen der Maus nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (bis 15 Gy) ebenfalls ein hoher Fluoreszenz-Background auf. Dies veranlasste die Autoren den neutralen Lysis-Puffer durch ein Lysis-Gemisch aus hohem Salzgehalt/alkalischer Lysis (0.03 M Na OH, 1 M NaCl) zu ersetzen. Dadurch wurde der Fluoreszenz-Background reduziert. Allerdings stellt dieses modifizierte Protokoll keine Alternative dar, wenn ausschließlich Doppelstrangbrüche gemessen werden sollen, da dieser veränderte Comet Assay vermutlich Einzel- und Doppelstrangbrüche misst. Zusätzlich berichten Olive *et al* (1990), dass der unspezifische Fluoreszenz-Background zunahm, wenn statt Propidium Iodid Acridine Orange zur DNA-Färbung benutzt wurde und das

Agarosegel auf den Objektträgern getrocknet wurde. Zur Verminderung der Background-Fluoreszenz wurden die Objektträger von Olive *et al* (1990) daraufhin in einer befeuchteten luftdicht verschlossenen Box aufbewahrt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Objektträger mit den Magenkarzinomzellen und den Lymphozyten an der Luft angetrocknet und anschließend bis zur mikroskopischen Auswertung ebenfalls in einer befeuchteten, verschlossenen Box aufbewahrt. Woher der beobachtete Fluoreszenz-Background stammt und warum dieser bei den Magenkarzinomzellen ausgeprägter war als bei den humanen Lymphozyten, lässt sich nicht abschließend klären.

Auch war ein auffallender Unterschied in der Ausbildung der Kometen von HSC45-M2 Zellen bei neutralem und alkalischem pH zu beobachten. Bei alkalischem pH war der Kopf deutlich vom Schweif abgegrenzt. Die Konturen waren scharf und klar erkennbar. Im Vergleich dazu wirken Kometen bei neutralem pH „verschwommener“. Die Abgrenzung zwischen Kopf und Schweif war weniger deutlich. Oftmals entstand der Eindruck, der Kopf wäre von einer DNA-Wolke umgeben. Diese wolkenähnliche Struktur lagerte sich fast symmetrisch um den Kopf. Olive *et al* (1991) zeigten ähnliche Kometen nach Röntgenbestrahlung (20, 50 und 100 Gy) von Ovarialzellen des chinesischen Hamsters im neutralen Comet Assay. Auch hier sind die Grenzen zwischen Kopf und Schweif undeutlich. Olive *et al* (1991) kommentieren dies in ihrer Arbeit leider nicht. Wojewódzka *et al* (2002) führten den Comet Assay bei neutralem pH mit humanen Lymphozyten durch. Dabei modifizierten sie das Standard-Protokoll des neutralen Comet Assays, da sie mit dem ursprünglichen Protokoll nur Kometen mit schlecht definierbarer Kontur erhielten, die für die Computerauswertung untauglich waren. Kernpunkt des veränderten Protokolls war vor allem das Ersetzen der Lysis bei 50°C durch eine Lysis bei 4°C. Mit dem modifizierten Protokoll erhielten die Autoren Kometen mit gut definierten Grenzen, ohne dass dabei die Sensitivität des Comet Assays verringert wurde. Wojewódzka *et al* (2002) zeigen in ihrer Arbeit leider keine Bilder der Kometen, so dass kein Vergleich mit den Kometen dieser Arbeit angestellt werden konnte. Da in der vorliegenden Studie die Lysis im neutralen Comet Assay der Magenkarzinomzellen und der Lymphozyten ebenfalls bei 4°C durchgeführt wurde, ließ sich aus der Arbeit von Wojewódzka *et al* (2002) keine weitere Verbesserungsmöglichkeit ableiten.

Es handelt sich hierbei vermutlich um Zelltyp-abhängige Phänomene, da der Fluoreszenz-Background bei den Lymphozyten weniger stark ausgeprägt war, als bei den Magenkarzinomzellen. Auch bei *Trichoderma koningii* zeigten sich im neutralen Comet Assay optisch gut auswertbare Kometen [Drosch, 2005].

Eine zufriedenstellende Erklärung kann weder für den Fluoreszenz-Background noch für die verschwommen wirkenden Kometen im neutralen Comet Assay gefunden werden. Da die Ursachen unklar sind, können auch keine Verbesserungsvorschläge gemacht werden. In den oben zitierten Arbeiten über den neutralen Comet Assay sind diese Probleme ebenfalls beschrieben. Eine fehlerhafte Durchführung des Comet Assays ist daher nahezu auszuschließen.

7 Zusammenfassung

Eine zielgerichtete Tumorthherapie, die gesundes Gewebe bestmöglich schont, ist eine der großen Herausforderungen in der Medizin. Ein Ansatz hierzu bietet sich unter anderem bei Patienten, die an einer Untergruppe des diffusen Magenkarzinoms leiden. Ihre Tumorzellen exprimieren einen veränderten Oberflächenmarker. An dieses veränderte E-Cadherin kann ein als d9MAb bezeichneter Antikörper selektiv binden. Wird dieser Antikörper zum Beispiel mit einem Radionuklid gekoppelt, ist eine selektive Abtötung des Tumors denkbar.

Bevor diese Therapie am Patienten zum Einsatz kommt, ist es nötig abzuklären, welche Schäden dabei an der DNA betroffener Zellen verursacht werden. Hierzu sollte diese Arbeit einen Beitrag leisten. Dazu sollten die DNA-Schäden untersucht werden, die durch Bestrahlung mit maximal 3 Gy von Magenkarzinomzellen und Lymphozyten mit zwei verschiedenen Strahlenarten, α - und γ -Strahlung, induziert werden. Als α -Strahler diene hierbei Americium-241, als γ -Strahlungsquelle Caesium-137. Zur Darstellung der DNA-Schäden wurden der alkalische und neutrale Comet Assay durchgeführt. In Agarose eingebettete Zellen werden dabei lysiert und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern darin zum Pluspol. Ungeschädigte, chromosomale DNA wandert auf Grund ihrer Größe nicht im elektrischen Feld und verbleibt am Ausgangsort. Nach Anfärbung der DNA ergibt sich unter dem Mikroskop ein Bild, das an einen Kometen erinnert. In Abhängigkeit vom pH-Wert, bei dem die Elektrophorese durchgeführt wird, können Einzel- und Doppelstrangbrüche oder nur Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden. Bei neutralem pH sollten nur Doppelstrangbrüche zur Darstellung kommen, bei alkalischem pH dagegen beide Arten von Strangbrüchen.

Die Ausbildung der Kometen im Comet Assay wird von vielen Faktoren beeinflusst. Neben der Temperatur, bei der Bestrahlung und Auswertung durchgeführt werden, Zellzyklusstadien der untersuchten Zellen, spielt auch der Zeitpunkt zu dem die Auswertung durchgeführt wird, eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Alle diese Faktoren erschweren einen Vergleich mit Studien, die unter Verwendung unterschiedlicher Protokolle durchgeführt wurden. Bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit traten mehrere Probleme auf. Sowohl neutraler als auch alkalischer Comet Assay wiesen eine große Streuung der Ergebnisse auf. Besonders

betroffen davon waren die Parameter „Tail DNA%“ und „Tail Moment Olive“. Mitverantwortlich hierfür war vermutlich die Bestrahlungsdurchführung, vor allem die Bestrahlung der Zellen mit dem α -Emitter Americium-241. Es konnte nicht gänzlich verhindert werden, dass die Magenkarzinomzellen mehrschichtig wuchsen und eventuell dadurch ein Teil der Zellen von den α -Partikeln nicht erreicht wurde. Nicht getroffene Zellen können zur Heterogenität der Ergebnisse geführt haben. Auch war es nicht möglich sicherzustellen, dass alle Zellen einer Schicht von den Strahlen geschädigt werden, da das verwendete Americium-241 keine 100%ige Homogenität liefert. Daher muss bei zukünftigen Bestrahlungs-Experimenten versucht werden, die Bestrahlungsbedingungen zu optimieren, indem z.B. der Anteil der auf der Mylarfolie mehrschichtig wachsenden Zellen weiter verringert wird. Aber auch bei den unbestrahlten Zellen trat eine große Heterogenität in den Ergebnissen auf. Die Zellen wurden im Verlauf der zahlreichen Präparationsschritte geschädigt und können daher auch ohne Bestrahlung DNA-Strangbrüche aufweisen. Eine Verringerung dieser Schäden ist kaum denkbar, da diese Schritte zur Durchführung des Comet Assays nötig sind.

Die Ergebnisse des neutralen Comet Assay bereiten Probleme bezüglich der Interpretation. Über die Gründe kann nur spekuliert werden. Möglicherweise wurden doch nicht ausschließlich DNA-Doppelstrangbrüche gemessen. Bei der mikroskopischen Auswertung fiel im neutralen Comet Assay vor allem bei den Magenkarzinomzellen ein Fluoreszenz-Background auf. Dieser wurde auch in einer Arbeit von Olive *et al* (1991) beschrieben und scheint sowohl vom Zelltyp als auch vom benutzten Farbstoff und der Feuchtigkeit des Agarosegels abhängig zu sein. Da der verwendete Farbstoff nur DNA anfärbt, handelt es sich hierbei vermutlich um sehr kleine DNA-Fragmente. Da diese aber außerhalb ihres eigentlichen Kometen liegen können, ist eine ungenaue Messung der Schadensparameter vor allem bei niedrigen Bestrahlungsdosen nicht zu vermeiden. Bei neutralem pH wirkten die Kometen in der mikroskopischen Auswertung zusätzlich etwas verschwommen. Ähnliches wurde auch von Wojewódzka *et al* (2002) bei Versuchen mit humanen Lymphozyten beobachtet. Leider ließ sich auch für dieses Problem keine Verbesserungsmöglichkeit finden. Die relativ geringe Sensitivität des neutralen Comet Assay bei niedriger Bestrahlungsdosis wird von Wojewódzka *et al* (2002) auf

die Auflösung von überspiralisierten DNA-Arealen zurückgeführt. Diese Begründung erscheint nicht ausreichend logisch.

Das eigentliche Ziel dieser Arbeit, eine Aussage über die unterschiedlichen DNA-Schäden, induziert durch α - und γ -Strahlung zu treffen, konnte auf Grund der Schwierigkeiten bei der Durchführung des neutralen Comet Assays nicht erreicht werden. Es blieb daher nur die Möglichkeit Verbesserungsvorschläge für eine zukünftige Anwendung des Comet Assays zu diskutieren.

8 Literaturverzeichnis

Ban ath J P, Fushiki M, Olive P. Rejoining of DNA single-and double- strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* 1998; 73: 6,649-660

Becker K F, Atkinson M, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert J R, H ofler H. E-Cadherin Gene Mutations provide Clues to Diffuse Type Gastric Carcinomas, *Cancer Research.* 1994; 54: 3845-3852

Bergqvist M, Brattstr om D, St alberg M, Vaghef H, Brodin O, Hellmann B. Evaluation of radiation-induced DNA damage and DNA repair in human lung cancer cell lines with different radiosensitivity using alkaline and neutral single cell gel electrophoresis, *Cancer Letters* 1998; 133: 9-18

Berx G, Becker K F, H ofler H, Van Roy F. Mutations of the human E- cadherin (CDH1) Gene, *Human Mutation.* 1998; 12: 226- 237

Downs J A. Chromatin structure and DNA double-strand break response in cancer progression and therapy, *Oncogene* 2007; 26: 7765-7772

Drosch M. Etablierung des Comet Assay für Trichoderma koningii; Bachelor-Thesis Technische Universität München - Lehrstuhl für Zellbiologie, Bundesamt für Strahlenschutz, GsF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit; Juli 2005

Elia M C, Bradley M O. Influence of Chromatin structure on the induction of DNA double strand breaks by ionizing radiation, *Cancer Res.*1992; 52: 1580-1586

Evans H, Ricanati M, Horng M-F, Jiang Q, Mencl J, Olive P. DNA Double-Strand Break Rejoining Deficiency in TK6 and other Human B-Lymphoblast Cell Lines, *Radiation Research* 1993; 134: 307-315

Fukudome Y, Yanagihara K, Takeichi M, Ito F, Shibamoto S. Characterization of a mutant E-cadherin protein encoded by a mutant gene frequently seen in diffuse-type human gastric carcinoma, *Int. J. Cancer* 2000; 88: 579-583

Iliakis G E, Cicilioni O, Metzger L. Measurement of DNA double strand breaks in CHO cells at various stages of the cell cycle using pulsed field gel electrophoresis, calibrations by means of ¹²⁵I decay. *Int. J. Radiat. Biol.* 1991; 59: 343-357

Jeggo PA und Löbrich M. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact, *Oncogene* 2007; 26: 7717-7719

Malcolmson A M, Davies G, Hanson J A, Deeley J O T, Gaffney C C, Mc Gregor A D, Kerby I J. Determination of Radiation-induced Damage in Lymphocytes using the Micronucleus and Microgel Electrophoresis "Comet" Assay, *European Journal of Cancer* 1995; 31: 2320-2323

Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini J M. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization, *Nature* 1996; 380: 360-364

Olive P L, Banáth J P, Durand R. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells measured using the „Comet“ Assay, *Radiation Research* 1990; 122: 86-94

Olive P L, Wlodek D, Banáth J P. DNA Double strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis, *Cancer Research* 1991; 51: 4671-4676

Olive P L, Wlodek D, Durand R E, Banáth J P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis, *Experimental Cell Research* 1992; 198: 259-267

Olive P L, Bánath J P, MacPhail H S. Lack of a Correlation between Radiosensitivity and DNA Double-Strand Break Induction or Rejoining in Six Human Tumor Cell Lines, *Cancer Research* 1994; 54: 3939- 3946

Olive P L, Banáth J P. Radiation–Induced DNA Double-Strand Breaks produced in Histone-Depleted Tumor Cell Nuclei Measured Using the Neutral Comet Assay, *Radiation Research* 1995; 142: 144-152

Olive P L. The Role of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation, *Radiation Research* 1998; 150: (Suppl) S42-S51

Phillips E R, McKinnon P J. DNA double-strand break repair and development, *Oncogene* 2007; 26: 7799-7808

Rydberg B, Löbrich M, Cooper P K. DNA Double-Strand Breaks induced by high-energy neon and iron ions in human Fibroblasts. I. Pulsed–Field Gel Electrophoresis Method, *Radiation Research* 1994; 139: 133-141

Rydberg B. Radiation–Induced Heat-Labile Sites that convert into DNA Double-strand Breaks, *Radiation Research* 2000; 153: 805-812

Sak A, Stuschke M. Repair of ionizing radiation induced DNA double-strand breaks (dsb) at the c-myc locus in comparison to the overall genome. *Int. J. Radiat Biol.* 1998; 73: 35- 43

Schipper J H, Frixen U H, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. *Cancer Research* 1991; 51: 6328-6337

Seidl C, Senekowitsch-Schmidtke R. Zielgerichtete Radionuklidtherapie mit α -Emittern – Grundlagen, experimentelle und erste klinische Studien. *Der Nuklearmediziner* 2008; 31: 81-92

Stamato T D, Denko N. Asymmetric field inversion gel electrophoresis: A new method for detecting DNA double strand breaks in mammalian cells. *Radiation Research* 1990; 121: 196-205

Thorslund T, West SC. BRCA2: a universal recombinase regulator, *Oncogene* 2007; 26: 7720- 7730

Van Gent DC, Van der Burg M. Non-homologous end-joining, a sticky affair, *Oncogene* 2007, 26: 7731- 7740

Wojewódzka M, Grądzka I, Buraczewska I. Modified neutral comet assay for human lymphocytes, *Nukleonika* 2002; 47: 1-5

Wojewódzka M, Buraczewska I, Kruszewski M. A modified neutral Comet assay: Elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti single – stranded DNA antibody, *Mutation Research* 2002; 518: 9-20

Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M. Antiproliferative effects of isoflavone on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Research* 1993; 53: 5815-5821

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications; *Nucleic Acids Research* 2004; 32 No.12, e103-107

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Senekowitsch-Schmidtke, die mir diese Doktorarbeit erst ermöglicht hat, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich an ihrem enormen Wissen teilhaben ließ.

Ebenso großer Dank gebührt Herrn Dr. Christof Seidl und Frau Dr. Ute Roessler, die mich mit großer Geduld in die Tücken der Laborarbeit eingeführt haben und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten.

Des Weiteren möchte Ich mich bedanken bei

Meinen Eltern, die mir mein Medizinstudium erst ermöglicht haben und immer bedingungslos an meiner Seite stehen. Euch kann Ich niemals genug danken.

Alexander, für jeden Augenblick den Du da bist. Frei nach Herbert Grönemeyer, seit Ich Dich kenne, trage Ich Glück im Blick.

Nicholas, für Vieles.