

**Beitrag zum Verständnis der biologischen Wirksamkeit  
des Auger-Elektronen emittierenden Radionuklids  $^{125}\text{I}$   
in menschlichen Zellen**

DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT  
ZU KIEL

vorgelegt von  
**Sandra Zerhusen**

KIEL 2001

REFERENT: PROF. DR. J. SOLL

KOREFERENT: PD DR. MED. U.M. CARL

TAG DER MÜNLICHEN PRÜFUNG: 18.6.01

ZUM DRUCK GENEHMIGT: KIEL, 20.6.01

DER DEKAN

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	1
<b>1.1 Physikalische Grundlagen zur Auger-Elektronen-Emission</b>	1
<b>1.2 Biologische Strahlenwirkung</b>	4
1.2.1 Grundlagen	4
1.2.2 Klonogener Zelltod	7
1.2.3 Auger-Elektronen-Effekte durch <sup>125</sup> I	8
<b>1.3 Dosimetrie und Relative Biologische Wirksamkeit</b>	11
<b>1.4 Medizinischer Einsatz von Auger-Elektronen-Emittern</b>	13
<b>1.5 Zielsetzung</b>	15
<b>2 Material und Methoden</b>	16
<b>2.1 Zellkultur</b>	16
2.1.1 Vermehrung	16
2.1.2 Wachstumskurven	17
2.1.3 Protein-/ DNA-Gehalt und Durchmesser der Zellen	18
2.1.4 Durchflußzytometrie	19
<b>2.2 Strahlenexposition</b>	20
2.2.1 <sup>137</sup> Cs-γ-Strahlung	20
2.2.2 <sup>125</sup> Iododesoxyuridin	21
2.2.3 <sup>125</sup> I-Antipyrin	25
2.2.4 Na <sup>125</sup> I	27
2.2.5 <sup>3</sup> H/ <sup>125</sup> IUdR-Markierung	27
<b>2.3 Biologische Endpunkte</b>	28
2.3.1 Farbttest auf „Lebensfähigkeit“	28
2.3.2 Acetylcholinesterase -Test	28
2.3.3 Koloniebildungstest	30
2.3.4 Comet Assay	31
2.3.5 Hydroxylapatit -Chromatographie	36
<b>3 Ergebnisse</b>	39
<b>3.1 Anteile an den Zellzyklusphasen</b>	39
<b>3.2 <sup>137</sup>Cs-γ-Strahlung</b>	40
3.2.1 Viabilitätsraten	40
3.2.2 Acetylcholinesterase-Aktivitätsraten	41
3.2.3 Klonogenes Überleben	42
3.2.4 Bestimmung von DNA-Schäden mit dem Comet Assay	43
3.2.5 Strangbruchmessung mittels Hydroxylapatit-Chromatographie	45

<b>3.3</b>	<b><sup>125</sup>Iododesoxyuridin</b>	46
3.3.1	Inkorporationsstudien	46
3.3.2	Klonogenes Überleben und DNA-Schädigung (Comet Assay)	50
3.3.3	Hydroxylapatit-Chromatographie nach Doppelmarkierung	56
<b>3.4</b>	<b><sup>125</sup>I-Antipyrin</b>	58
3.4.1	Effekte durch nicht-radioaktives Antipyrin	58
3.4.2	Effekte nach <sup>125</sup> I-AP-Exposition	59
<b>3.5</b>	<b>Na<sup>125</sup>I</b>	61
3.5.1	30 h-Exposition mit Mediumwechsel	61
3.5.2	28 h-Exposition ohne Mediumwechsel	63
<b>3.6</b>	<b>Korrelation zwischen Koloniebildungstest und Comet Assay</b>	64
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	65
<b>4.1</b>	<b>Biologische Endpunkte nach <sup>137</sup>Cs-<math>\gamma</math>-Bestrahlung</b>	65
4.1.1	Acetylcholinesterase-Test	65
4.1.2	Koloniebildungstest	67
4.1.3	Comet Assay	67
4.1.4	Hydroxylapatit-Chromatographie	70
<b>4.2</b>	<b>Vergleich der Trägermoleküle</b>	72
4.2.1	Koloniebildungstest nach <sup>125</sup> IUdR- und <sup>125</sup> I-AP-Exposition	72
4.2.2	Comet Assay nach <sup>125</sup> IUdR- und <sup>125</sup> I-AP-Exposition	77
4.2.3	Koloniebildungstest und Comet Assay nach Na <sup>125</sup> I-Exposition	83
4.2.4	Korrelationen zwischen biologischen Endpunkten	85
<b>4.3</b>	<b>Quantifizierung der biologischen Wirksamkeit von <sup>125</sup>I</b>	86
4.3.1	Energieberechnungen zum <sup>125</sup> I-Zerfall (Literaturvergleich)	87
4.3.2	Dosisberechnung und Wirksamkeitsfaktoren	88
<b>4.4</b>	<b>Tierexperimente und klinische Studien mit <sup>125</sup>I</b>	94
	<b>Zusammenfassung</b>	96
	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	98
	<b>Anhang</b>	102
	<b>Literaturverzeichnis</b>	112

## Abkürzungsverzeichnis

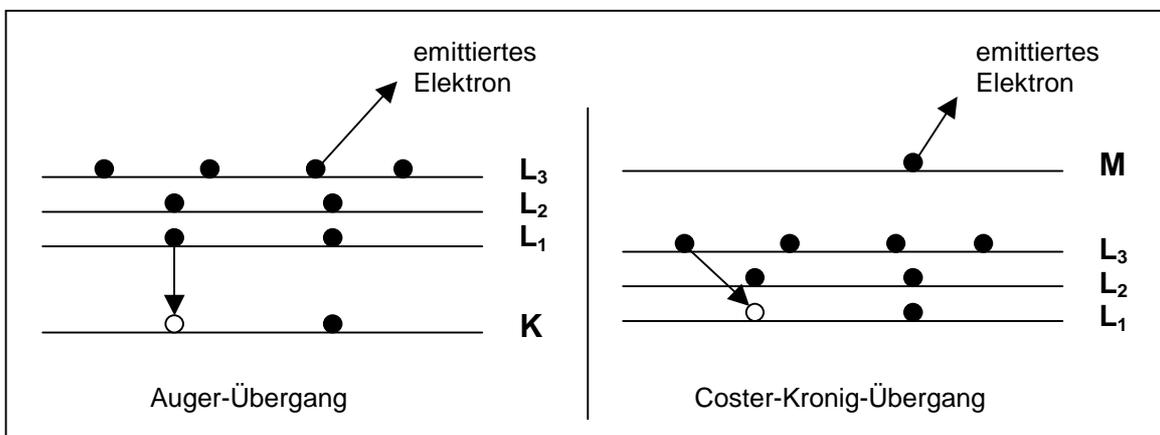
AChE	Acetylcholinesterase
AE	Auger-Elektron(en)
CdR	Desoxycytidin
D <sub>0</sub>	Dosis für Reduktion des Überlebens auf 37% des Ausgangswertes im linearen Teil der Überlebenskurve
D <sub>37</sub>	Dosis für Reduktion des Überlebens von 100% auf 37%
d/c	Zerfälle pro Zelle (decays per cell)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSB	Doppelstrangbrüche
ds-DNA	doppelsträngige DNA
ESB	Einzelstrangbrüche
es-DNA	einzelsträngige DNA
5-FU	5-Fluorouracil
FUdR	Fluorodesoxyuridin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA	Hydroxylapatit
I-AP	Iod-Antipyrin
IUdR	Iododesoxyuridin
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LET	Linearer Energie-Transfer
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Phosphat Buffered Saline
RBW	Relative Biologische Wirksamkeit
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	Standardfehler (standard error)
SF 2	Überlebensfraktion (Surviving Fraction) nach 2 Gy
T-25	Zellkulturflaschen mit 25 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche
TdR	Desoxythymidin
TS	Thymidilatsynthetase

## 1 Einleitung

Das Interesse der Strahlenbiologie an Auger-Elektronen emittierenden Radionukliden begann in den 70er Jahren und besteht bis heute fort. Die Ursache liegt darin, daß Auger-Elektronen-Emitter, wie z.B.  $^{125}\text{I}$ , wegen ihrer besonderen physikalischen Eigenschaften und der daraus resultierenden biologischen Wirkungen auf eine potentielle Anwendung in der Strahlenmedizin hinweisen. Deren Realisierung erfordert weiterhin sowohl experimentelle biologische als auch theoretische physikalische Untersuchungen.

### 1.1 Physikalische Grundlagen zur Auger-Elektronen-Emission

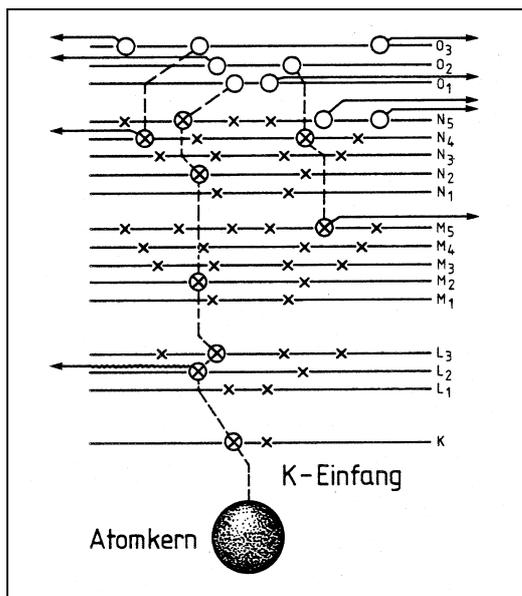
Radionuklide, die über Elektroneneinfang oder innere Konversion zerfallen, können niederenergetische Elektronen emittieren. Diese Elektronen werden nach dem französischen Physiker Pierre Auger, der die zugrundeliegenden Elektronenübergänge 1925 erstmals entdeckte, als Auger-Elektronen (AE) bezeichnet. Beim Elektroneneinfang wird ein Elektron einer inneren Schale (meistens aus der K-Schale) vom Kern eingefangen, wodurch ein Proton in ein Neutron verwandelt wird. Dadurch entsteht in dieser Schale eine Fehlstelle, die durch den Übergang eines Elektrons aus einer höheren Schale gefüllt wird (für eine zusammenfassende Darstellung s. Bambynek et al., 1977). Die dabei freiwerdende Energie wird entweder auf ein Elektron einer äußeren Schale übertragen, das als AE emittiert wird, oder in Form von Röntgenstrahlung wieder abgegeben. Bei den Elektronen-Übergängen wird zwischen Auger- und Coster-Kronig-Übergängen unterschieden. Im ersten Fall füllt z.B. ein Elektron der  $L_1$ -Schale die Fehlstelle der K-Schale auf, während ein anderes Elektron der  $L_3$ -Schale emittiert wird (Abb. 1). Im zweiten Fall der Coster-Kronig-Übergänge gehören beide beteiligten Unterschalen der gleichen Hauptschale an (z.B. Übergänge innerhalb der L-Schale).



**Abbildung 1**

Schematische Darstellung von Auger- und Coster-Kronig-Übergängen

Auger- und Coster-Kronig-Übergänge werden im Gegensatz zu Übergängen mit Photonenemission, die verstärkt bei Atomen mit hoher Kernladungszahl erfolgen, auch als strahlungslose Übergänge bezeichnet (s. z.B. Aberg, 1971). Bei jedem Übergang entstehen eine bzw. zwei neue Fehlstellen in höherliegenden Schalen, die wiederum Ausgangspunkt für weitere Übergänge sind. In größeren Atomen kann so eine ganze Kaskade von Übergängen stattfinden (AE-Kaskade), in deren Verlauf die Energie des angeregten Atoms immer weiter abnimmt und die Fehlstellen zu den äußeren Schalen hin verschoben werden. Am Ende der Kaskade bleibt ein mehrfach ionisiertes Atom mit positiven Ladungen übrig (Abb. 2). Die Übergänge zwischen verschiedenen Schalen finden mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten statt, und für den Ablauf einer Kaskade ergibt sich eine große Zahl von Kombinationsmöglichkeiten (s. z.B. Bambynek et al., 1972). Je mehr Schalen das angeregte Atom besitzt, desto mehr Übergangsmöglichkeiten gibt es.

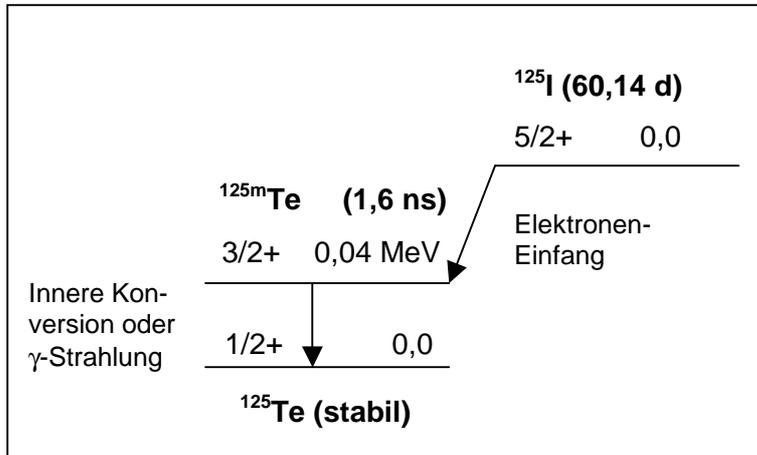


**Abbildung 2**

Schematischer Ablauf einer AE-Kaskade nach Elektroneneinfang aus der K-Schale (Humm, 1984); x: Elektronen ⊗: durch Elektronen-Übergänge gefüllte Fehlstellen, O: positive Ladungen nach Ablauf der Kaskade, —————>: AE-Emission, ~~~~~>: Photonenemission)

$^{125}\text{I}$  ist in der Strahlenbiologie das am häufigsten untersuchte AE emittierende Radionuklid. Es zerfällt ausschließlich über Elektroneneinfang, wobei hauptsächlich die K-Schale beteiligt ist, und geht unter Ablauf der AE-Kaskade in den metastabilen  $^{125\text{m}}\text{Te}$ -Zustand mit einer Lebensdauer von 1,6 ns über (Abb. 3). Während überwiegend (zu 93%) durch innere Konversion ein weiteres Elektron (Konversionselektron) ausgesendet wird, erfolgt in 7% der Fälle der Übergang in den stabilen Tellur-Grundzustand unter  $\gamma$ -Emission. Der Prozeß der inneren Konversion findet mit hoher

Wahrscheinlichkeit (>80%) in der K-Schale statt und initiiert durch die erneute Fehlstelle eine zweite AE-Kaskade (für eine zusammenfassende Darstellung s. z.B. Sastry, 1992).



**Abbildung 3**

MIRD: Zerfallsschema für  $^{125}\text{I}$   
(Weber et al., 1989)

Durch die beiden AE-Kaskaden entsteht ein sehr komplexes Energie-Emissionsspektrum, das nur mit hohem Rechenaufwand zu simulieren ist. Ein Monte Carlo-Programm für die Simulation des  $^{125}\text{I}$ -Zerfalls (erstmalig entwickelt von Charlton und Booz, 1981) ermöglichte die Generierung eines Zerfallsspektrums für  $^{125}\text{I}$  (Tab. 1), bei dem u.a. die einzelnen beteiligten Strahlungskomponenten mit den mittleren Energien und absoluten Häufigkeiten pro Zerfall berechnet wurden. Dieses  $^{125}\text{I}$ -Zerfallsspektrum wird von einer großen Anzahl niederenergetischer Elektronen mit geringer Reichweite in biologischem Material dominiert. Die am häufigsten emittierten Auger- und Coster-Kronig-Elektronen besitzen Energien von unter 500 eV und Reichweiten in biologischem Gewebe von unter 30 nm.

In der modell-theoretischen Vorstellung baut sich im Falle eines isolierten Atoms ein Ladungspotential auf, das nach Ablauf der AE-Kaskade auf dem  $^{125}\text{Te}$ -Tochternuklid zurückbleibt (Abb. 2). Für dieses Potential wurde eine mittlere Energie von 1,07 keV pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall berechnet (Pomplun et al., 1987). In kondensierter Phase wird dagegen unterstellt, daß Fehlstellen in den äußeren Schalen durch freie Ladungsträger neutralisiert werden, so daß erneut Elektronen für weitere Emissionsprozesse zur Verfügung stehen. Dadurch ändert sich die Anzahl der berechneten emittierten Elektronen. Es wurden beim isolierten Atom im Mittel 15 emittierte AE pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall und in kondensierter Phase eine mittlere Anzahl von 21 AE gefunden (Pomplun, 2000).

**Tabelle 1**  
Zerfallsspektrum von  $^{125}\text{I}$  in kondensierter Phase  
(Pomplun, 1987 und 2000)

Strahlung	mittlere Energie (keV)	Häufigkeit/ Zerfall
<i>Gammastrahlung:</i>		
$\gamma_1$	35,48	0,068
<i>Konversions- elektronen:</i>		
K	3,643	0,803
L <sub>1</sub>	30,51	0,0969
L <sub>2</sub>	30,9	0,00761
L <sub>3</sub>	31,1	0,00193
M <sub>1</sub>	34,5	0,0165
M <sub>2</sub>	34,6	0,00321
M <sub>3</sub>	34,7	0,00088
N <sub>1</sub>	35,3	0,0039
N <sub>2</sub>	35,3	0,00081
<i>Röntgenstrahlung:</i>		
K <sub><math>\alpha</math>1</sub>	27,46	0,759
K <sub><math>\alpha</math>2</sub>	27,22	0,412
K <sub><math>\beta</math>1</sub>	30,99	0,132
K <sub><math>\beta</math>2</sub>	31,69	0,0394
K <sub><math>\beta</math>3</sub>	30,93	0,0680
K <sub><math>\beta</math>5</sub>	31,23	0,00186
L <sub><math>\alpha</math></sub>	3,95	0,141
<i>Auger-Elektronen:</i>		
KLL AE	22,5	0,133
KLX AE	26,4	0,058
KXY AE	30,2	0,00548
LLX CKE	0,285	0,267
LMM AE	3,04	1,25
LMX AE	3,67	0,344
LXY AE	4,29	0,0221
MMX CKE	0,0942	1,49
MXY AE	0,405	3,31
NNX CKE	0,0316	3,33
NXY AE	0,0161	8,12

AE = Auger-Elektron, CKE = Coster-Kronig-Elektron

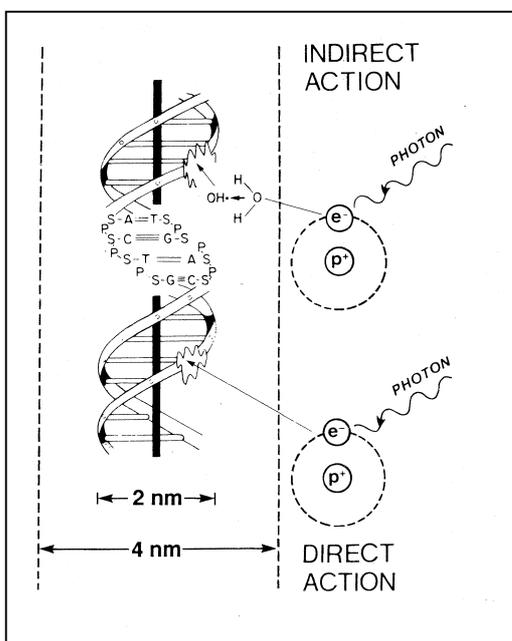
## 1.2 Biologische Strahlenwirkung

### 1.2.1 Grundlagen

Durch ionisierende Strahlung kann Energie auf biologisches Material übertragen werden. Es kommt zu Veränderungen in den Molekülen und Molekülverbänden, die hauptsächlich auf Ionisationen und Anregungen zurückzuführen sind. Ein charakteristisches Maß für die biologische Strahlenwirkung stellt deshalb die Ionisationsdichte dar, die mit dem Linearen Energie-Transfer (LET) als mittlerer Energieverlust entlang eines Weges beschrieben wird. Der LET beträgt beispielsweise für  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlen 0,3 keV/ $\mu\text{m}$  und liegt im Vergleich

zu Radon- $\alpha$ -Strahlen mit  $118 \text{ keV}/\mu\text{m}$  sehr niedrig (s. z.B. Alpen, 1990). Man spricht auch von dünn oder dicht ionisierender Strahlung bzw. Niedrig- oder Hoch-LET-Strahlung.

Bei der Energiedeposition in biologischem Gewebe wird zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung unterschieden (Abb. 4). Die direkte Wirkung beinhaltet eine unmittelbare Energieabsorption und biologische Schädigung am betrachteten Molekül, während bei der indirekten Wirkung die Strahlenenergie zunächst auf andere Moleküle (vor allem  $\text{H}_2\text{O}$ ) unter Bildung von Radikalen übertragen wird, die dann mit dem betrachteten Molekül reagieren und einen Schaden herbeiführen (s. z.B. Hall, 1994).

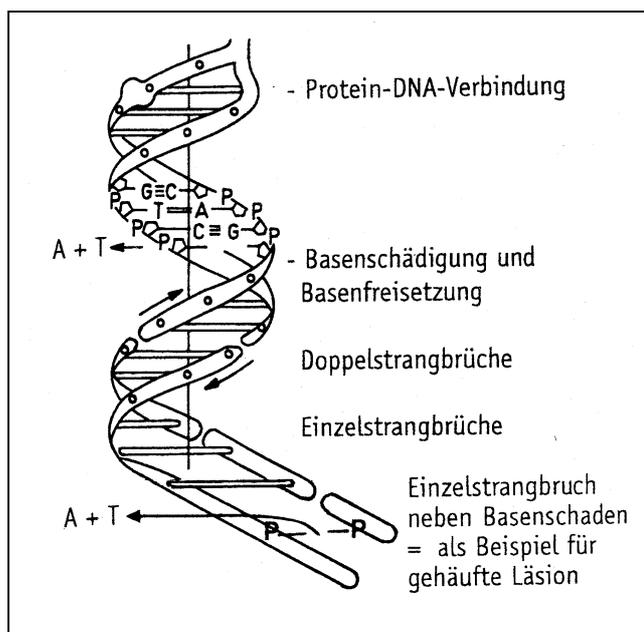


**Abbildung 4**  
Darstellung direkter und indirekter Strahlen-  
effekte (Hall, 1994)

Es wird aus folgenden Gründen angenommen, daß DNA-Schäden das kritische Ereignis im strahleninduzierten Zelltod und bei Zellmutationen bilden: Studien mit  $\alpha$ -Polonium-Mikronadeln, die im Zytoplasma oder im Zellkern positioniert waren, zeigten beispielsweise, daß für das Abtöten von Zellen bei Bestrahlung des Zytoplasmas wesentlich höhere Dosen benötigt wurden als bei Bestrahlung des Zellkerns (Munro, 1970). Auch wurde nachgewiesen, daß das Auftreten von Chromosomen-Aberrationen nach Bestrahlung eng mit dem Zelltod zusammenhing (Evans, 1972). Radionuklide mit Emission kurzreichweitiger AE, wie z.B.  $^{125}\text{I}$ , lösten nach Inkorporation in die DNA Zelltod und Genschäden aus (Feinendegen, 1975). Die DNA wird daher als kritische subzelluläre Struktur für die biologische Wirkung ionisierender Strahlung angesehen.

Es können im wesentlichen folgende DNA-Schäden auftreten (Abb. 5):

1. Einzelstrangbrüche (ESB), die wenig biologische Konsequenzen ergeben, da sie schnell durch z.B. ein „Rejoining“ (Schneeweiss et al., 1987) oder eine Exzisionsreparatur behoben werden (s. z.B. Tubiana, 1990),
2. Doppelstrangbrüche (DSB), die entweder durch eine einzelne genügend große Energiedeposition (ca. 300 eV) oder durch zwei ESB entstehen, die sich direkt oder mit nur wenig Basenabstand gegenüberliegen (s. z.B. Hall, 1994); auch DSB sind reparabel, wobei eine homologe und eine nicht-homologe Rekombination, sowie eine End-zu-End-Verbindung in Frage kommen (Frankenberg-Schwager, 2001),
3. Basenschäden, die eine irreversible Strukturveränderung einer Base beinhalten und
4. lokal-multiple Schäden, bei denen z.B. mehrere Strangbrüche gehäuft oder in Kombination mit Basenschäden auftreten können (gehäufte Läsion oder „Cluster“).



**Abbildung 5**  
Darstellung von Strahlenschäden an der DNA (Herrmann und Baumann 1997)

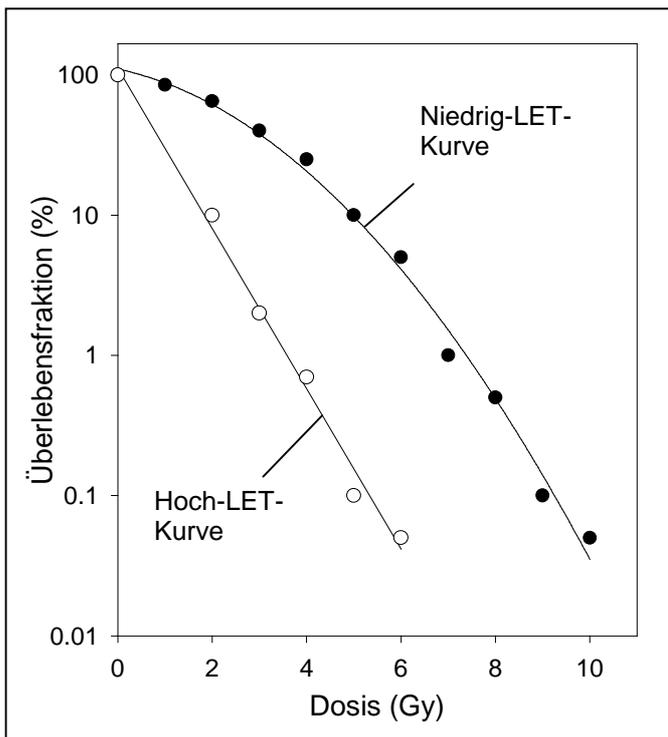
Als eine der wichtigsten biologischen Schädigungen nach Bestrahlung gelten nicht oder falsch reparierte DSB. Dies kann zu Mutationen und Zelltod führen, die aus biologischer und klinischer Sicht die bedeutendsten zellulären Strahlenwirkungen darstellen (s. z.B. Steel, 1997). Mutationen, als vererbare Änderungen der genetischen Information der Chromosomen bis zu maligner Transformation, werden im Gegensatz zum klonogenen Zelltod hier nicht näher erläutert.

### 1.2.2 Klonogener Zelltod

In der Strahlenbiologie wird der Zelltod als Verlust der Koloniebildungsfähigkeit (Klonogenität) bezeichnet. Zellen werden als klonogen angesehen, wenn sie das Potential für mehrere Zellteilungen besitzen und innerhalb eines festgelegten Zeitraumes von üblicherweise 9 - 12 Tagen Kolonien mit mindestens 50 Tochterzellen bilden (s. z.B. Nias, 1990). Nach allgemeiner Konvention werden Zellen, die nach Strahlenbehandlung koloniebildungsfähig sind, als überlebende Zellen bezeichnet (s. Kiefer, 1989). Die wichtigste Methode zur Bestimmung des klonogenen Zelltodes bzw. des klonogenen Überlebens ist der Koloniebildungstest mit der Erstellung einer halblogarithmischen Überlebenskurve, die den Anteil überlebender Zellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis wiedergibt. Die halblogarithmische Darstellung läßt eine bessere Analyse und Vergleich der niedrigen Überlebensfraktionen zu als bei normaler Auftragung in Form einer sigmoiden Kurve (s. Steel, 1997).

Puck und Marcus (1956) erstellten als erste eine Überlebenskurve für HeLa-Zellen, die in ihrer Form charakteristisch für Röntgenstrahlung ist und bei der sich nach einer anfänglichen Schulterregion eine Gerade ergibt, die als linearer Bereich der Kurve bezeichnet wird. Diese exponentielle Beziehung gilt für Einzeldosen und ergibt sich für alle Säugetierzellen nach Photonenbestrahlung. Die Schulter wird als Region interpretiert, in der sublethale Schäden akkumulieren, bis sie zum Zelltod führen (s. z.B. Alpen, 1990). Schulterkurven nach Gamma- und Röntgenbestrahlung werden als Niedrig-LET-Überlebenskurven bezeichnet (Abb. 6). Bei Bestrahlung von Säugetierzellen mit beispielsweise  $\alpha$ -Partikeln hat die Überlebenskurve dagegen einen exponentiellen Verlauf ohne Schulter und wird als Hoch-LET-Überlebenskurve bezeichnet.

Überlebenskurven werden heute als Standardmethode zur Bestimmung der Strahlenwirkung auf Zellen eingesetzt und mit unterschiedlichen mathematischen Modellen diskutiert. Der gebräuchlichste Parameter zur Beschreibung dieser Kurven ist der  $D_0$ -Wert, der die Dosis angibt, bei der die Überlebensfraktion im linearen Kurventeil auf 37% ihres Ausgangswertes reduziert wird (s. z.B. Kiefer, 1989). Bei schulterlosen Kurven wird dagegen häufig der  $D_{37}$ -Wert angegeben, der in der ersten Dekade abgelesen wird. Der Koloniebildungstest ist in der klinischen Strahlenbiologie eine allgemein anerkannte Möglichkeit zur Bestimmung der Radiosensitivität von Zellen. Dabei gilt anhand der Kurvencharakteristik, daß die Zellen umso strahlenempfindlicher sind, je niedriger der  $D_0$ - oder  $D_{37}$ -Wert liegt.



**Abbildung 6**  
Schema einer Hoch- und Niedrig-LET-Überlebenskurve

### 1.2.3 Auger-Elektronen-Effekte durch $^{125}\text{I}$

Zerfälle von AE-Emittern können auf molekularer und zellulärer Ebene zu den erwähnten DNA-Strangbrüchen, Mutationen, Chromosomen-Aberrationen, malignen Transformationen und zum Zelltod führen. Die Wirkung der AE-Emitter hängt in erster Linie von der subzellulären Lokalisation und damit von entsprechenden Trägermolekülen ab, welche die AE-Emitter in verschiedenen Kompartimenten einer Zelle positionieren können. Es wurde übereinstimmend festgestellt, daß der Zerfall von AE-Emittern außerhalb des Zellkerns Strahleneffekte vom Niedrig-LET-Typ hervorruft, während AE-Emitter wie  $^{125}\text{I}$ , die nahe der DNA zerfallen, Hoch-LET-Effekte bewirken (Hofer, 2000). Außerhalb der Zelle lokalisiert, scheinen sie weitgehend wirkungslos zu sein. Es wird im folgenden ein kurzer Literaturüberblick zu Studien mit  $^{125}\text{I}$  gegeben, in denen die DNA als wichtigstes Target für den strahleninduzierten Zelltod betrachtet wird. Als Trägermolekül wurde überwiegend  $^{125}\text{I}$ -markiertes Iododesoxyuridin ( $^{125}\text{IUdR}$ ) benutzt, das als Thymidinanalogon in die DNA eingebaut wird.

#### ➤ Vergleich von $^{125}\text{IUdR}$ mit anderen inkorporierten Radionukliden

Burki et al. (1973) verglichen  $^3\text{H}$  (als reinen  $\beta^-$ -Strahler) mit  $^{125}\text{I}$ , wobei beide Radionuklide als  $^3\text{H}$ -Thymidin ( $^3\text{H-TdR}$ ) und als  $^{125}\text{IUdR}$  in die DNA von V79-Hamsterzellen inkorporiert wurden. Sie fanden im Koloniebildungstest eine deutlich stärkere Wirkung des  $^{125}\text{IUdR}$ , das zudem eine Überlebenskurve vom Hoch-LET-Typ aufwies. Dies wurde auf Effekte

durch AE zurückgeführt. Chan et al. (1976) unterstützten diese Aussage, da sie bei der gleichen Zelllinie eine viel stärkere Radiotoxizität des  $^{125}\text{IUdR}$ , sowohl bezogen auf den klonogenen Zelltod als auch auf Chromosomenaberrationen, gegenüber  $^3\text{H-TdR}$  fanden. Zu dem gleichen Schluß kamen Geselowitz et al. (1995) bei synchronisierten CHO-Hamsterzellen.  $^{125}\text{IUdR}$  wurde in weiteren Studien auch mit den  $\beta$ -Strahlern  $^{131}\text{I}$  als  $^{131}\text{IUdR}$  (Bradley et al., 1975) und  $^{14}\text{C}$  als  $^4\text{C-TdR}$  (LeMotte et al., 1984) verglichen, die ebenfalls eine deutlich geringere biologische Wirkung als  $^{125}\text{IUdR}$  zeigten.

➤  $^{125}\text{I}$ -induzierte DNA-Strangbrüche

Painter et al. (1974) konnten in der DNA von V79-Hamsterzellen 4-5 ESB pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall messen, von denen nur etwa 50% repariert wurden. Die Autoren folgerten daraus, daß die Toxizität des  $^{125}\text{IUdR}$  hauptsächlich auf nicht-reparierten DNA-Strangbrüchen beruht. LeMotte und Little (1984) sowie Radford und Hodgson (1985) berechneten nach der Methode der neutralen Filterelution bei gefrorenen Zellen 1 DSB pro  $^{125}\text{I}$  Zerfall.  $^{125}\text{I}$ -induzierte DNA-Strangbrüche wurden auch von Martin und Haseltine (1981) an Bakteriophagen-DNA und später an synthetischer DNA in Form von duplexbildenden Oligodesoxyribonukleotiden (ODN) per Gel-Elektrophorese untersucht. Der größte DNA-Schaden wurde innerhalb einer Distanz von 1,5 - 2,0 nm vom Zerfallsort gefunden. Kandaiya et al. (1996) sowie Lobachevsky und Martin (1996) stellten an ODN fest, daß jeder  $^{125}\text{I}$ -Zerfall einen Strangbruch hervorrief, wobei 90% der Brüche nicht weiter als 4-5 Nukleotide vom Zerfallsort entfernt waren. Es wurden auch Brüche in einer Entfernung bis zu 16 Nukleotiden gemessen. Geringe Abweichungen wurden von Karamychev et al. (1997) beschrieben, die am gleichen Modell 0,66 Strangbrüche pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall überwiegend im Umkreis von 10 Nukleotiden nachweisen konnten.

Durch den Einsatz von Radikalfängern (wie Dimethylsulfoxid (DMSO), Cysteamin und Vitamin C) zum Schutz vor DNA-Schädigungen während der  $^{125}\text{I}$ -Exposition scheint erwiesen,

- daß nicht nur die absolute Anzahl der DSB, die als wichtigste lethale Läsionen angesehen werden, sondern auch die Schädigung der Chromatinstruktur beim Zelltod eine Rolle spielt (Hofer und Bao, 1995; Hofer et al. 1996, 2000) und
- daß indirekte Effekte einen hohen Anteil an AE-induzierten Strahlenschäden haben. So fanden Walicka et al. (1998, 2000) einen Schutz der Zellen durch DMSO sowohl beim klonogenen Überleben als auch bei der Produktion von DSB nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition. Gleiches konnten Bishayee et al. (2000) mit Cysteamin feststellen, das allerdings einen geringeren Dosismodifikationsfaktor als DMSO hatte. Auch *in vivo* wurde ein Schutz durch Vitamin C und DMSO beim Überleben der Spermazellen von Mäusen nachgewiesen, die  $^{125}\text{IUdR}$  injiziert bekommen hatten (Narra et al. 1994, Goddu et al. 1996).

Die Untersuchungen mit Radikalfängern haben die Diskussion zur Berechnung der  $^{125}\text{I}$ -induzierten DSB erneut angeregt. Während Kassis et al. (2000 b) an isolierter Plasmid-DNA ebenfalls 1 DSB pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall nachwies und DMSO dabei keine Schutzwirkung zeigte, konnte das Chromatin von Hamsterzellen jedoch durch DMSO vor  $^{125}\text{I}$ -erzeugten DSB geschützt werden. Es wurde deshalb angenommen, daß DSB auch durch indirekte Effekte erzeugt wurden und mehr als ein DSB pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall eintrat. Computersimulationen von Nikjoo et al. (1996) und Pomplun et al. (1996) zeigten in diesem Zusammenhang, daß Direkttreffer hauptsächlich in der Nähe des  $^{125}\text{I}$ -Zerfalls stattfinden, während durch Radikale induzierte Schäden in weiterer Entfernung (>10 Basenpaare) vorkommen.

➤ Positionierungseffekte von  $^{125}\text{I}$  in der Zelle

Warters et al. (1977) verglichen die Wirkungen des  $^{125}\text{I}$ -Zerfalls im Zellkern ( $^{125}\text{IUdR}$ ) und in der Membran ( $^{125}\text{I}$ -Concanavalin A), wobei letzteres nur einen minimalen radiotoxischen Schaden bezüglich des klonogenen Überlebens aufwies. Ähnliches fanden auch Commerford et al. (1980) sowie Miyazaki und Shinohara (1993), die gleichmäßig in der Zelle verteiltes  $^{125}\text{I}$ -Antipyrin ( $^{125}\text{I}$ -AP) und extrazelluläres  $^{125}\text{I}$ -Albumin untersuchten. Dabei zeigte  $^{125}\text{I}$ -AP im Koloniebildungstest eine 5-10-fach höhere Effektivität als  $^{125}\text{I}$ -Albumin, das außerhalb der Zelle verblieb. Sie folgerten ebenso wie Bloomer et al. (1981), daß die Radiotoxizität des  $^{125}\text{I}$  von der subzellulären Lokalisation abhängt und mit zunehmender Nähe zur DNA ansteigt. Dies konnte von Kassis et al. (1987 a) und auch von Sedelnikowa et al. (1998) anhand von Überlebenskurven bestätigt werden. Die erstgenannten Autoren fanden beim Zellüberleben einen deutlichen Unterschied zwischen  $^{125}\text{IUdR}$  und dem im Zytoplasma lokalisierten  $^{125}\text{I}$ -Dihydrorhodamin, das eine Niedrig-LET-ähnliche Überlebenskurve hervorrief. Sedelnikowa et al. (1998) wiesen nach, daß auch im Zellkern lokalisierte  $^{125}\text{I}$ -ODN 3-fach weniger effektiv als  $^{125}\text{IUdR}$  wirkten, da sie nicht kovalent an die DNA gebunden waren.

Martin (1977, 1979) hatte bereits angenommen, daß die Radiotoxizität von  $^{125}\text{I}$  in unmittelbarer Nähe zur DNA (z.B. als interkalierendes  $^{125}\text{I}$ -Acridin) auf der Erzeugung von DSB beruht. Diese Ergebnisse wurden von Adelstein und Kassis (1996) sowie von Kassis et al. (1999) durch Untersuchungen an isolierter DNA in Form von Plasmiden bestätigt. Beim Vergleich von  $^{125}\text{I}$ -AP,  $^{125}\text{I}$ -Hoechst 33342 (lockere DNA-Bindung, „minor groove binding“) und  $^{125}\text{I}$ -Acridin war die Produktion von Strangbrüchen abhängig vom Abstand zur DNA.  $^{125}\text{I}$ -Hoechst 33342 produzierte 1,08 DSB pro Zerfall, während  $^{125}\text{I}$ -AP 0,16 DSB hervorrief.  $^{125}\text{I}$ -Acridin war sogar 7-fach effektiver als  $^{125}\text{I}$ -AP. Die Autoren bewerteten Versuche mit isolierter DNA jedoch als zu wenig aussagekräftig, um daraus biologische Schlußfolgerungen für die gesamte Zelle zu ziehen.

### 1.3 Dosimetrie und Relative Biologische Wirksamkeit

Die Dosis ist als absorbierte Energie einer ionisierenden Strahlung pro Masseinheit definiert und wird in Gy (J/kg) angegeben (vgl. 4.3.2). Gleiche Dosen verschiedener Strahlenarten müssen jedoch nicht den gleichen biologischen Effekt hervorrufen. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Strahlenarten ist über die Relative Biologische Wirksamkeit (RBW) möglich. Die RBW ist als Quotient aus der Dosis einer Referenzstrahlung (250 kV Röntgenstrahlung oder  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung) und der Dosis der untersuchten Strahlung, die den gleichen biologischen Effekt hervorruft definiert (s. z.B. Kiefer, 1989).

$$RBW = \frac{D_{\text{Referenzstrahlung}}}{D_{\text{untersuchte Strahlung}}} \quad (\text{bei gleichem biologischen Endpunkt})$$

RBW-Faktoren werden für die Aufstellung von Qualitätsfaktoren zur Bewertung unterschiedlicher Strahlenarten unter Strahlenschutzaspekten herangezogen (Tab. 2), die wiederum der Berechnung von Äquivalentdosen dienen (s. Alpen, 1990):

$$H = q \times D \quad \text{und} \quad q = Q \times N$$

(H = Äquivalentdosis, q = Bewertungsfaktor, D = Energiedosis, Q = Qualitätsfaktor und N = Modifikationsfaktor)

#### Tabelle 2

Qualitätsfaktoren verschiedener Strahlenarten  
(Strahlenschutzverordnung; Veith, 1996)

Strahlenart	Qualitätsfaktor
$\alpha$ -Strahlung aus Radionukliden	20
Neutronen nicht bekannter Energie	10
Röntgen- und $\gamma$ -Strahlen, $\beta$ -Strahlen, Elektronen und Positronen	1

Durch die Äquivalentdosis ist es im praktischen Strahlenschutz möglich, die durch unterschiedliche Strahlungsarten mit verschiedenen Energien verursachten Dosen zu vergleichen bzw. zu summieren. Die Werte für Q und N werden von der ICRP (International Commission on Radiological Protection) festgelegt, wobei Faktoren für AE-Emitter bislang nicht ermittelt werden konnten.

Es ist notwendig, bei der Bestimmung der RBW die Stärke des biologischen Effektes sowie den betrachteten Endpunkt genau zu definieren, da sich beispielsweise bei Überlebenskurven mit nicht-linearen Funktionen aufgrund des Schulterbereiches bedeutende Unterschiede ergeben können. So steigt die RBW einer Hoch-LET-

verglichen mit einer Niedrig-LET-Kurve zu kleineren Dosen hin an (s. z.B. Steel, 1997). Trotz dieser Problematik ist die RBW immer noch die einzige allgemein akzeptierte Vergleichsmöglichkeit für verschiedene Strahlenarten. Die für die Bestimmung der RBW benötigte Dosisangabe beruht auf einer homogenen Verteilung der Energie, wie sie bei Photonenstrahlung gegeben ist. Bei einer kovalenten Bindung von  $^{125}\text{I}$  an die DNA ergibt sich beispielsweise beim  $^{125}\text{IUdR}$  das Problem, daß die Energie nicht gleichmäßig im Zellkern deponiert wird und dadurch die Dosis in bestimmten DNA-Abschnitten nicht der Zellkerndosis entspricht (Humm, 1994). Es ist bis jetzt nicht möglich, die deponierten Energien entlang eines DNA-Stranges experimentell zu bestimmen, weshalb immer nur ein Vergleich zwischen modell-theoretisch ermittelten Dosiswerten und experimentellen biologischen Wirkungen stattfinden kann. Diesbezüglich stellt das Zerfallsspektrum eines AE emittierenden Radionuklids eine wichtige theoretische Grundlage für Energie- und Dosisangaben dar, die in der Strahlenbiologie, der Strahlentherapie und im Strahlenschutz verwendet werden.

In der Literatur bestehen besonders für mikrodosimetrische Bereiche von unter 50 nm große Differenzen zwischen den Autoren bei der Angabe einer kumulierten Dosis in Folge von  $^{125}\text{I}$ -Zerfällen in der Zelle (Tab. 3). Diese Unterschiede werden mit ansteigendem Volumen geringer und gleichen sich bei etwa 1  $\mu\text{m}$  aus. Mit einer Ausnahme (Pomplun, 1987) basieren alle Berechnungen auf dem gleichen mathematischen Näherungsverfahren für die kinetischen Energien von AE, weshalb die Differenzen z.B. zwischen Sastry und Rao (1984) und Howell (1992) geringer sind. Pomplun (1987) berechnete dagegen die kinetischen Elektronenenergien aus der Differenz der Gesamtenergie des Atoms vor und nach einem Übergang, wobei sich für die ganze Kaskade eine exakte Energiebilanz ergab.

**Tabelle 3**

Dosis pro akkumulierter Aktivität von  $^{125}\text{I}$  in Gy/Bq x h (n. Howell, 1992)

<b>Autoren</b>	<b>Volumen</b>	
	<b>d = 10 nm</b>	<b>d = 20 nm</b>
Sastry und Rao, 1984	$8,37 \times 10^8$	$1,59 \times 10^8$
Pomplun, 1987 <sup>a</sup>	$17,4 \times 10^8$	$2,68 \times 10^8$
Weber et al., 1989 (MIRD)	$2,32 \times 10^8$	$0,56 \times 10^8$
Howell, 1992	$8,55 \times 10^8$	$1,60 \times 10^8$

<sup>a</sup> Annahme, daß sämtliches Ladungspotential in einem betrachteten Kugelvolumen deponiert wird

### **1.4 Medizinischer Einsatz von Auger-Elektronen-Emittern**

Das grundsätzliche Ziel einer jeden Strahlentherapie von Tumoren liegt in der vollständigen Zerstörung des Tumors bei möglichst geringer Schädigung des Normalgewebes. Bei der konventionellen perkutanen Strahlentherapie von Tumoren kommt es häufig infolge der erforderlichen hohen Dosierung zu erheblichen Belastungen des Normalgewebes. Um diese unerwünschten Nebeneffekte zu minimieren, besteht die Möglichkeit, die konventionell applizierte Dosis zu reduzieren und dafür ergänzend eine stärker targetbezogene Behandlung hinzuzuziehen. Hierfür eignen sich AE emittierende Radionuklide, die durch ihre Vielzahl niederenergetischer AE mit kurzer Reichweite die Vorteile einer lokal begrenzten Strahlenbehandlung bieten. Durch spezifische Trägermoleküle kann sogar die Strahlenbelastung in unterschiedlichen Zellkompartimenten beeinflusst werden (Wheldon, 1994). Radionuklide sollten für einen gezielten Einsatz in der Strahlentherapie vier wesentliche Forderungen erfüllen (O'Donoghue und Wheldon, 1996):

- Spezifität; d.h. die radioaktive Substanz sollte ausschließlich auf Tumorzellen einwirken,
- Universalität; d.h. die radioaktive Substanz sollte auf alle Tumorzellen unabhängig von deren Lokalisierung einwirken,
- zytotoxisches Potential; d.h. die radioaktive Substanz sollte mit hoher Effektivität auf die Tumorzellen einwirken,
- Effekt der kurzen Reichweite; d.h. die radioaktive Substanz sollte umliegendes Normalgewebe nicht schädigen.

AE-Emitter würden die beiden letztgenannten Anforderungen erfüllen, während den beiden erstgenannten Punkten mit der richtigen Auswahl der Trägermoleküle Rechnung getragen werden könnte. Unter den für einen klinischen Einsatz verfügbaren AE-Emittern würde  $^{125}\text{I}$  aus strahlenhygienischen Gründen wegen seiner relativ langen Halbwertszeit nicht ohne weiteres ausgewählt werden. Da es aber ausschließlich durch Elektroneneinfang zerfällt und die Anzahl der emittierten AE, ebenso wie die pro Zerfall abgegebene Energie vergleichsweise hoch ist (Tab. 4), liegt eine beträchtliche Radiotoxizität in der Nähe des  $^{125}\text{I}$ -Zerfallsortes vor.

Die Wahl des geeigneten Trägermoleküls ist für die Wirkung und klinische Anwendung des  $^{125}\text{I}$  von ausschlaggebender Bedeutung. Da in der Radiotherapie die Aktivitätsaufnahme in das Tumorgewebe im Verhältnis zum Normalgewebe eine wichtige Rolle spielt, sind nur solche zytotoxischen Reagenzien klinisch relevant, von denen wesentlich mehr in die Tumorzellen als in die gesunden Zellen gelangt. Das Thymidinanalogon IUdR würde sich anbieten, da es ausschließlich von S-Phase-Zellen eingebaut wird und bei

schnell-proliferierendem Tumorgewebe ein selektives Targeting ermöglicht (Wheldon, 1994). Als weitere selektive Trägermoleküle wurden in den letzten Jahren Östrogene (Yasui et al, 1996, DeSombre et al., 2000) sowie tumorspezifische Antikörper und epidermale Wachstumsfaktoren untersucht (Humm, 1995).

**Tabelle 4**

Vergleich der Halbwertszeiten, AE-Anzahl und mittleren AE-Energien pro Zerfall von AE-Emittern (O'Donoghue und Wheldon, 1996)

Radionuklid	Physikalische Halbwertszeit	AE-Anzahl	mittlere AE – Energie (keV) *
<sup>51</sup> Cr	27,7 Tage	5,4	3,653
<sup>55</sup> Fe	2,76 Jahre	5,1	4,177
<sup>67</sup> Ga	3,26 Tage	4,7	6,264
<sup>75</sup> Se	120 Tage	7,4	5,740
<sup>77</sup> Br	2,38 Tage	6,7	5,218
<sup>99m</sup> Tc	6,01 Stunden	4,0	0,899
<sup>111</sup> In	2,8 Tage	14,7	6,750
<sup>113m</sup> In	1,66 Stunden	4,3	2,047
<sup>115m</sup> In	4,5 Tage	6,1	2,847
<sup>123</sup> I	13,2 Stunden	14,9	7,419
<sup>125</sup> I	60,1 Tage	24,9	12,241
<sup>193m</sup> Pt	4,33 Tage	26,4	10,353
<sup>195m</sup> Pt	4,02 Tage	32,8	22,526
<sup>201</sup> Tl	3,04 Tage	36,9	15,273
<sup>203</sup> Pb	2,16 Tage	23,3	11,630

\* Summe der mittleren AE- und CKE-Energien

AE-Emitter wie <sup>67</sup>Ga, <sup>75</sup>Se, <sup>111</sup>In, <sup>123</sup>I und <sup>201</sup>Tl eignen sich bei extrazellulärer Positionierung für die medizinische Diagnostik, da sie nur einen äußerst geringen, vernachlässigbaren Schaden auf zellulärer Ebene anrichten und szintigrafische Eigenschaften aufweisen (O'Donoghue und Wheldon, 1996). Bei einer Lokalisation im Zellkern würde sich aufgrund der starken Zytotoxizität dagegen ein Einsatz von AE-Emittern in der Tumorthherapie anbieten.

Mit <sup>123</sup>I und <sup>125</sup>I wurden diesbezüglich bereits Versuche an Mäusen, Ratten und Schweinen mit zum Teil erfolversprechenden Resultaten durchgeführt, die eine Anwendung von <sup>123</sup>IUdR und <sup>125</sup>IUdR in Diagnostik und Therapie rechtfertigen (Kassis und Adelstein, 1996). Es liegen auch Ergebnisse von ersten klinischen Studien mit <sup>123</sup>IUdR und <sup>125</sup>IUdR an Patienten mit Lebermetastasen, Gehirntumoren und Kolonkrebs vor, die eine positive klinische Tendenz zeigen (Mariani et al., 1996, Kassis et al., 1996).

Der praktische Einsatz des AE-Emitters  $^{125}\text{I}$  in der Strahlenmedizin befindet sich noch in der Versuchsphase und benötigt zudem die Angabe einer genauen volumenspezifischen Dosis. Mit der konventionellen Dosimetrie wird jedoch nicht die hohe lokale Energiedeposition bzw. die subzelluläre Positionierung des AE-Emitters berücksichtigt, wodurch die starken biologischen Effekte, z.B. von DNA-gebundenem  $^{125}\text{IUdR}$ , unterschätzt werden.

### **1.5 Zielsetzung**

Am Beispiel des  $^{125}\text{I}$  soll ein Beitrag zur Beurteilung der biologischen Wirksamkeit von AE emittierenden Radionukliden anhand von zwei menschlichen Zelllinien (Nieren-T1-Zellen und 86HG-39-Glioblastomzellen) geleistet werden. Es wird angestrebt,  $^{125}\text{I}$  mit geeigneten Trägermolekülen in verschiedenen Zellkompartimenten zu positionieren und gesamtzelluläre sowie molekulare Effekte zu bestimmen. Als  $^{125}\text{I}$ -markierte Trägermoleküle sind  $^{125}\text{I}$ iododesoxyuridin ( $^{125}\text{IUdR}$ ) für eine Inkorporation des  $^{125}\text{I}$  in die DNA,  $^{125}\text{I}$ -Antipyrin ( $^{125}\text{I}$ -AP) für eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zelle und  $\text{Na}^{125}\text{I}$  für eine extrazelluläre Lokalisation vorgesehen.

Als biologische Endpunkte nach  $^{125}\text{I}$ -Exposition sollen vor allem die Koloniebildungsfähigkeit der gesamten Zellpopulation (klonogenes Überleben) und Schädigungen der DNA dienen, die individuell durch den Comet Assay meßbar sind. Die gewonnenen Ergebnisse werden jeweils denjenigen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung gegenübergestellt. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung sollen alle geplanten Experimente unter physiologischen Bedingungen, d.h. mit nicht-synchronisierten Zellkulturen und Temperaturen von  $37^\circ\text{C}$  (ohne Akkumulation von  $^{125}\text{I}$ -Zerfällen in tiefgefrorenen Zellen) durchgeführt werden.

Durch die gleichmäßige Verteilung des  $^{125}\text{I}$ -AP in der Zelle mit einer annähernd homogenen Energiedeposition wird eine Dosisberechnung und ein Vergleich der radiotoxischen Wirkungen von  $^{125}\text{I}$ -AP mit denen von  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung am gleichen Zellmodell und bei Betrachtung der gleichen definierten biologischen Endpunkte angestrebt. Darüberhinaus soll auch eine Möglichkeit gefunden werden, die biologische Wirksamkeit von DNA-inkorporiertem  $^{125}\text{IUdR}$  zu quantifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Vermehrung

Als biologisches Modell dienen zwei als Monolayer wachsende humane Zelllinien. Die T1-Zellen stammten aus der gesunden Niere eines 8-jährigen Jungen und wurden seit 1957 kultiviert (Van der Veen et al., 1957). Die 86HG-39-Zellen wurden 1990 dem Hirntumor eines 56 Jahre alten Patienten entnommen und durch Bilzer et al. (1990) in Kultur gebracht. Beide Zelllinien wurden im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95% relative Luftfeuchtigkeit) in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> (T-25) bis zur Konfluenz vermehrt und 1-2x pro Woche passagiert. Dabei wurde der Zellrasen zunächst mit 5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen, dann mit 1-2 ml Trypsin-Lösung benetzt und für einige Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert, bis die Zellen begannen, sich abzulösen. Durch leichtes Klopfen am Flaschenboden konnte der Zellrasen vollständig abgelöst und nach Zugabe von 5 ml Medium durch wiederholtes Aufziehen mit der Pipette (60 - 100x) in Einzelzellsuspension gebracht werden. Die Zellen wurden elektronisch gezählt (Coulter Counter ZM, Coulter) und eine Anzahl von 0,5×10<sup>6</sup> - 1,0×10<sup>6</sup> Zellen erneut mit 10 ml Wachstumsmedium ausgesät. Die Zellen wurden höchstens 60x passagiert und dann verworfen, um eventuelle morphologische und zytogenetische Veränderungen zu vermeiden. Es wurden neue Zellen aus der gleichen Charge aufgetaut, die bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

#### Materialien:

Waschen der Zellen:	PBS-Dulbecco (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> Ionen
Ablösen der 86HG-39-Zellen:	Trypsin/ EDTA Lösung 0,05% / 0,02% (w/v) in PBS
Ablösen der T1-Zellen:	Trypsin 2,5% (w/v) in PBS auf 0,25% verdünnt
T1- Wachstumsmedium:	BME-Earle (1x) 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> ohne L-Glutamin + 1% N-acetyl-L-alanyl-L-Glutamin + 10% Serum neugeborener Kälber + 1% Penicillin-Streptomycin 1×10 <sup>4</sup> U/ 1×10 <sup>4</sup> µg/ml
86HG-39-Wachstumsmedium:	Basal Iscove-Medium (1x) 3,024 g/l NaHCO <sub>3</sub> +Glutamin +10% Fötale Kälberserum + 1% Penicillin-Streptomycin 1×10 <sup>4</sup> U/ 1×10 <sup>4</sup> µg/ml (alles Biochrom KG)
Kulturgefäße:	Zellkulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup> (T-25, TPP®) Leighton-Kulturröhrchen, 5 cm <sup>2</sup> (Nunc)

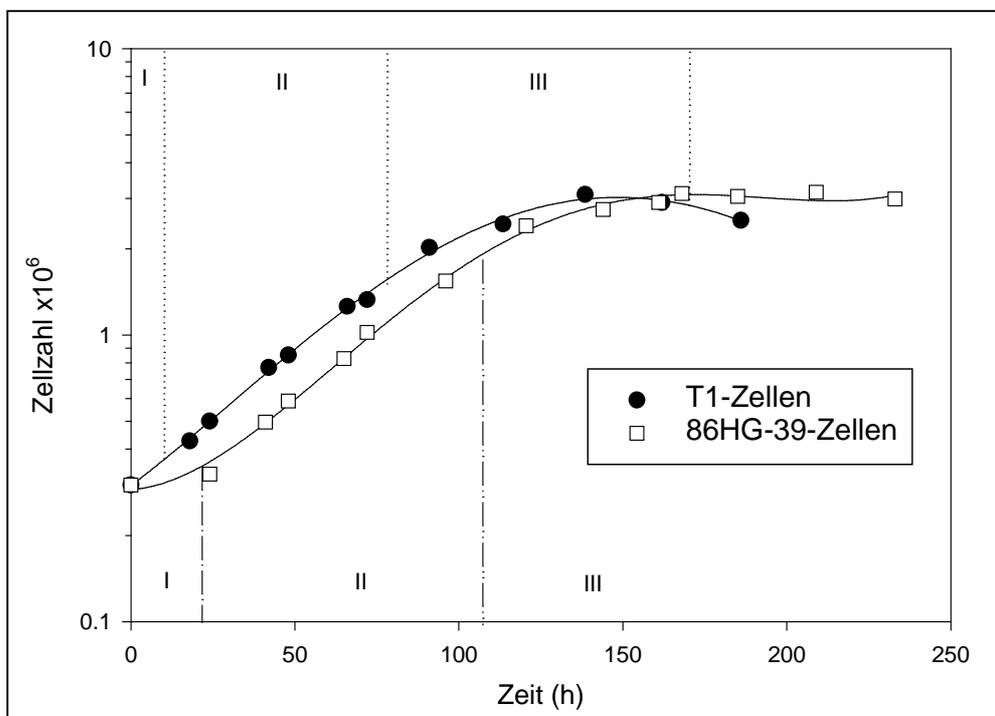
### 2.1.2 Wachstumskurven

Eine charakteristische Größe im Wachstum von Zellpopulationen ist die Verdopplungszeit, die als Abschätzung für die Dauer eines Zellzyklusses verwendet wird. Die Verdopplungszeit der T1- und 86HG-39-Zellen wurde durch die Erstellung einer Wachstumskurve ermittelt und aus der Mitte der exponentiellen Phase entnommen. Dabei gilt nach McAteer und Davis (1994):

$$t_d = \log 2 \times \frac{t_1 - t_0}{\log N_1 - \log N_0}$$

$t_d$  = Verdopplungszeit,  $N_0$  = Zellzahl zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $N_1$  = Zellzahl zum Zeitpunkt  $t_1$

Für die Wachstumskurven wurden  $0,3 \times 10^6$  T1- bzw. 86HG-39-Zellen in Leighton-Kulturröhrchen mit 3 ml Medium ausgesät und die Zellzahl zweimal pro Tag bestimmt. Nach 8 Tagen befanden sich die Zellpopulationen bereits in der stationären Phase. Die Verdopplungszeit der T1-Zellen betrug ungefähr 32 h und die der 86HG-39-Zellen 30 h, wobei letztere eine längere lag-Phase aufwies (Abb. 7). Die Einsaat bei den späteren  $^{125}\text{I}$ -Versuchen in T-25-Flaschen wurde so gewählt, daß die Verdopplungszeiten beibehalten werden konnten.



**Abbildung 7**

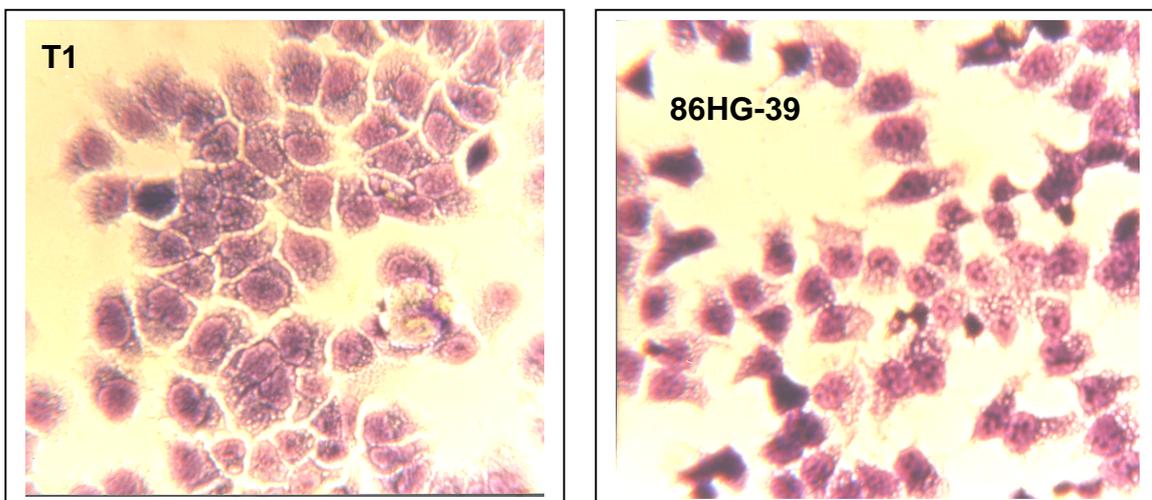
Wachstumskurven der T1- und 86HG-39-Zellen mit Phaseneinteilung (I = lag-Phase, II = exponentielle Phase, III = stationäre Phase)

### 2.1.3 Protein-/ DNA-Gehalt und Durchmesser der Zellen

- Um den Gesamtproteingehalt der Zellen zu erfassen, wurde die Methode nach Bradford mit einem fertigen Farbreagenz (Bioquant-Reagenz nach Bradford, Merck) angewandt. Als Standard diente Rinder-Serumalbumin (Fraktion V, Sigma).

In einer Küvette wurden 0,25 ml Standard- oder Probelösung und 2,5 ml Bradford-Reagenzlösung gründlich gemischt und die Extinktion nach 2 min bei 595 nm mit einem Spektrofotometer (DU<sup>®</sup>-50, Beckman) gemessen. Für die Zellproben wurden  $2 \times 10^6$  T1- oder 86HG-39-Zellen in serumfreiem Medium suspendiert und danach 10 min mit  $167 \times g$  zentrifugiert (900 U/min, Minifuge T, Heraeus/ Kendro). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1-2 ml NaOH (1N) gemischt. Nach 30 min Inkubation im Wasserbad bei 100°C ergab sich eine weitgehend klare Lösung. Aus dieser Stocklösung wurde eine Verdünnungsreihe aufgestellt, die Extinktionen gemessen und die Proteingehalte mit Hilfe der Serumalbumin-Eichkurve ermittelt. Als Durchschnittswert ergab sich für die T1-Zellen ein Gehalt von  $4,6 \times 10^{-7}$  mg Protein/ Zelle und für die 86HG-39-Zellen ein Gehalt von  $4,5 \times 10^{-7}$  mg Protein/ Zelle. Der Proteingehalt wurde später für die Angabe der Acetylcholinesterase-Aktivität verwendet (s. 2.3.2).

- Der DNA-Gehalt der Zellen wurde nach DNA-Isolation mit einem Kit (Nucleo Spin Blood Kit, Macherey-Nagel), der eine schnelle Durchführung ermöglichte, und anschließender Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt. Als Standard wurde DNA aus Kalbsthymus verwendet. Bei T1-Zellen ergab sich ein mittlerer Gehalt von 12 pg DNA/ Zelle.



**Abbildung 8**

Mit Giemsa und May-Grünwald-Lösung angefärbte T1- und 86HG-39-Zellrasen zur Bestimmung der Kerndurchmesser (Vergrößerung 400x)

- Der Durchmesser der Zellen wurde mit einem kalibrierten Skalenokular (10x, Objektiv 40x) mikroskopisch ermittelt (Invertmikroskop, Leica). Die Zellen befanden sich dabei in Suspension und entstammten verschiedenen Wachstumsphasen. Es ergaben sich mittlere Durchmesser von 18  $\mu\text{m}$  für T1-Zellen und von 15  $\mu\text{m}$  für 86HG-39-Zellen. Die Zellkerne wurden durch eine panoptische Färbung mit May-Grünwald Lösung in Kombination mit Giemsa-Lösung gefärbt (Zeile et al., 1983). Die Kerndurchmesser betragen 15,4  $\mu\text{m}$  bei T1-Zellen und 12,8  $\mu\text{m}$  bei 86HG-39-Zellen (Abb. 8). Unter Annahme eines Kugelvolumens wurde für T1-Zellen ein Volumen von 3054  $\mu\text{m}^3$  und für 86HG-39-Zellen ein Volumen von 1770  $\mu\text{m}^3$  berechnet.

#### 2.1.4 Durchflußzytometrie

Der Zellzyklus, den die Zellen während einer Verdopplung durchlaufen, teilt sich in folgende Phasen auf: die G1-Phase als postmitotische Neuordnungsphase, die S-Phase zur DNA-Synthese, die G2-Phase als prämitotischer Zeitraum und die sich anschließende M-Phase mit der Mitose. Neben der G1-Phase existiert noch die G0-Phase, bei der sich die Zellen in Ruhe befinden, jedoch jederzeit erneut in den Zellzyklus eingeschleust werden können (Lodish et al., 1996).

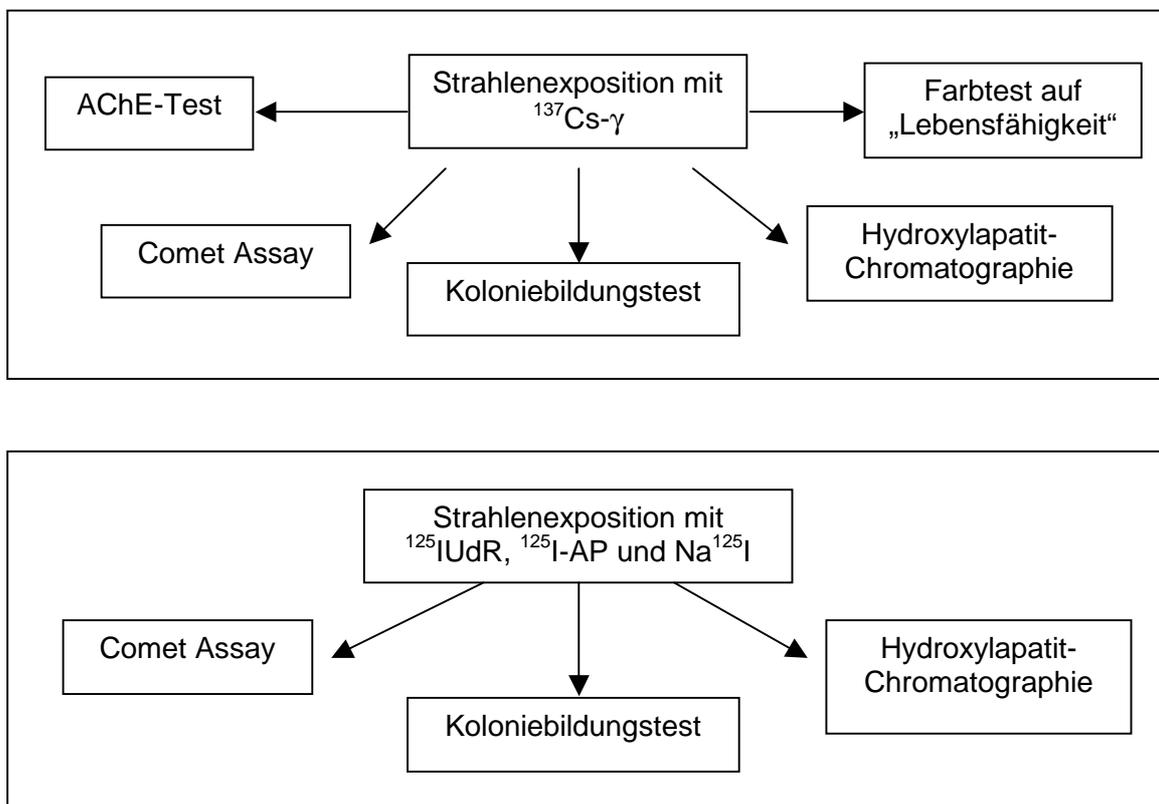
Das Durchflußzytometer bestimmt quantitativ die z.B. mit Propidiumiodid angefärbte zelluläre DNA und nimmt anhand des DNA-Gehaltes in den einzelnen Zellen eine Zuordnung zu den Zellzyklusphasen vor, die als G0/ G1-Phase, S-Phase und G2/ M-Phase zusammengefaßt werden (Ormerod, 1990). Die Verteilung ist abhängig von der Wachstumsphase, in der sich die Zellpopulation zum Zeitpunkt der Entnahme befindet. Idealerweise sollte innerhalb einer Zelllinie der Anteil einzelner Zellzyklusphasen konstant sein, sofern es sich um die gleiche Wachstumsphase der Population handelt. In der exponentiellen Wachstumsphase überwiegen S- und G2/ M-Phasen-Anteile, während in der stationären Phase der G1-Phasen-Anteil dominiert. Die größte Variabilität liegt in der G1-Phase, während die S-Phase und die G2/ M-Phase stabiler sind.

T1- und 86HG-39-Zellen in Leighton-Kulturröhrchen (Einsaat  $0,3 \times 10^6$  Zellen) wurden verschiedenen Wachstumsphasen entnommen. Davon wurden etwa  $1,5 \times 10^6$  Zellen für 10 min bei  $167 \times g$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann solange mit kaltem PBS gewaschen, bis alle Mediumreste entfernt waren. Anschließend wurden 2 ml Ethanol (70%) zum Pellet hinzugefügt, gut gemischt und die Zellen bei  $-20^\circ\text{C}$  für mindestens zwei Tage fixiert. Durch den Alkohol wurden die Zellmembranen derart permeabilisiert, daß die Zellkerne ohne einen weiteren Lysierschritt angefärbt werden konnten. Dies geschah nach erneutem Waschen des fixierten Pellets mit PBS durch Zugabe von 1 ml Propidiumiodidlösung (DNA-Prep-Stain, Coulter), die gleichzeitig

RNase enthielt, und einer anschließenden Inkubation für mindestens 30 min (optional 2 h) bei 37°C. Propidiumiodid war ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der eine Analyse des Zellkerns einzelner Zellen im Durchflußzytometer (Epics XL, Coulter) erlaubte. Die Zellen wurden einzeln durch eine Kapillare gesaugt, der Fluoreszenzfarbstoff durch einen Argon-Laser (488 nm) angeregt und die Lichtstreuung gemessen. Das optische Signal wurde dabei in ein elektrisches umgewandelt und per Computer ausgewertet.

## 2.2 Strahlenexposition

### 2.2.1 $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung



#### Abbildung 9

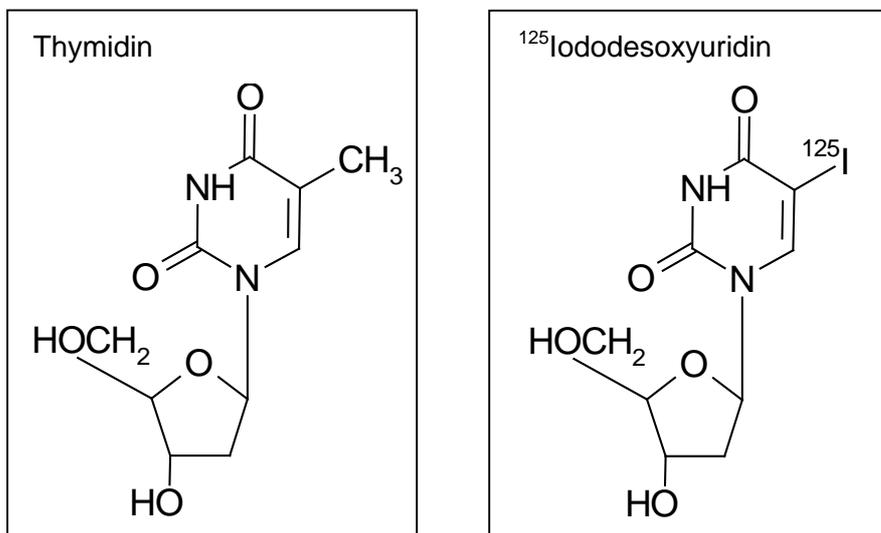
Schema zu den Zellversuchen mit Strahlenexposition und anschließender Untersuchung der biologischen Endpunkte

Um eine Referenzstrahlung zugrunde zu legen und die nachfolgend beschriebenen Methoden wie z.B. den Koloniebildungstest und den Comet Assay zu kalibrieren, wurden die Zellen mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung (Gammacell 40, Atomic Energy Canada; mittlere Dosisleistung 0,9 Gy/ Minute) exponiert: Suspensionen der T1- und 86HG-39-Zellen ( $1 \times 10^6$ / ml Medium) wurden auf Eis bestrahlt (0,5 - 20 Gy), wobei das Hauptinteresse dem

niedrigen und klinisch relevanten Dosisbereich bis maximal 4 Gy galt. Der Transport bzw. die Aufbewahrung bis zum Versuchsbeginn erfolgte ebenfalls auf Eis, um die Versuche reproduzierbar zu gestalten und Reparaturvorgänge in den Zellen zu unterdrücken. Während der Bestimmung der biologischen Endpunkte (Abb. 9) waren die Temperaturbedingungen mit denen der  $^{125}\text{I}$ -Versuchen identisch.

### 2.2.2 $^{125}\text{I}$ Iododesoxyuridin

Um bei den Versuchen mit  $^{125}\text{I}$  physiologische Bedingungen einzuhalten, wurden nicht-synchronisierte Zellpopulationen verwendet und die mehrstündigen  $^{125}\text{I}$ -Expositionen bei Körpertemperatur (37°C) durchgeführt. Sämtliche Inkubationen fanden deshalb im Brutschrank bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ -Begasung statt.



**Abbildung 10**  
Strukturformeln von Thymidin und  $^{125}\text{I}$ Iododesoxyuridin

$^{125}\text{I}$ Iododesoxyuridin ( $^{125}\text{IUdR}$ ) ist ein Thymidinanalogon, bei dem das  $^{125}\text{I}$ -Nuklid (Radius 0,215 nm) eine Methylgruppe (Radius 0,2 nm) an der Position 5 ersetzt (Abb. 10). Es wird anstelle des Thymidins in die DNA proliferierender Zellen eingebaut.  $^{125}\text{IUdR}$  wurde in einer wässrigen Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 74 TBq/mmol (2000 Ci/mmol, ICN) geliefert und in sterilem PBS verdünnt.

#### ➤ Inkorporationsstudien

Da  $^{125}\text{IUdR}$  nur von S-Phase-Zellen in die DNA inkorporiert wird, wurden für die  $^{125}\text{IUdR}$ -Versuche Zellen der exponentiellen Phase (3 Tage alte T1-Zellen und 4 Tage alte 86HG-39-Zellen mit einer Einsaat von  $1 \times 10^6$  bzw.  $0,8 \times 10^6$  Zellen in T-25-Flaschen) verwendet. Der Einbau von  $^{125}\text{IUdR}$  in die zelluläre DNA wurde sowohl in zeit- als auch in

konzentrationsabhängiger Hinsicht und unter Einfluß des Zusatzes FUdR (5'-Fluoro-2'-desoxyuridin, Fluka) untersucht, das durch Hemmung der *de novo*-Pyrimidinsynthese die Inkorporation von  $^{125}\text{IUdR}$  in die DNA förderte. Zur Komplettierung der Basen wurde außerdem CdR (2'-Desoxycytidin, Sigma) zugesetzt. Zellen der exponentiellen Phase wurden mit je 10 ml schwach radioaktivem Medium (0,74 - 1,9 kBq  $^{125}\text{IUdR}/\text{ml}$ ) und ansteigenden Konzentrationen an FUdR und CdR ( $10^{-12}\text{M}$  -  $10^{-4}\text{M}$ ) inkubiert. Über einen Zeitraum von 30 h wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Zellen von mehreren T-25-Flaschen abgelöst und deren Aktivität im Gammazähler (BF Gammszint 5300, Berthold) gemessen. Der Gammazähler (ein Szintillationszähler mit NaI-Kristall) ließ sich auf die Charakteristik des  $^{125}\text{I}$ -Zerfalls u.a. mit dem passenden Energiefenster (20-80 keV) einstellen. Aus den gemessenen Impulsen pro Minute wurden unter Berücksichtigung der Effizienz des Gerätes die Zerfälle pro Sekunde errechnet:

$$\frac{{}^{125}\text{I} - \text{Impulse pro Minute}}{(\text{Effizienz} \times 60)} = \text{Zerfälle} / \text{s} = \text{Bq}$$

Die Effizienz des Gammazählers wurde mit Hilfe eines  $^{129}\text{I}$ -Standards bestimmt, dessen Halbwertszeit mit  $1,57 \times 10^7$  Jahren so hoch war, daß keine Zerfallskorrektur berücksichtigt werden mußte. Es ergab sich eine Effizienz von 64%.

Die Lokalisation des  $^{125}\text{IUdR}$  in der Zelle wurde mittels Trichloressigsäure-Präzipitation überprüft (Kassis und Adelstein 1980): 100  $\mu\text{l}$  einer radioaktiven Zellsuspension (etwa  $5 \times 10^4$  Zellen) wurden auf jeweils zwei Glasfiber-Filter (Whatman GF/C) aufgetragen und diese bei Raumtemperatur getrocknet, bis alle Flüssigkeit verdunstet war. Von den Filterpaaren diente das eine zur Messung der Gesamtradioaktivität und das andere zur Messung der mit Säure ausfällbaren radioaktiven Nukleinsäuren. Letzteres wurde mit einer Pinzette in ein Becherglas mit eiskalter Trichloressigsäure (5%, Merck) und 20 mM Natriumpyrophosphat (tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat puriss. p.a., Fluka) übertragen, 2 min darin geschwenkt und in ein zweites Becherglas mit der gleichen Lösung eingetaucht. Bei diesem Waschvorgang wurde nicht-gebundene Aktivität von dem Filter entfernt, während die radioaktiven Nukleinsäuren (DNA- und RNA-Moleküle mit mehr als 50 Nukleotiden) darauf fixiert wurden. Der Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt und der Filter zum Schluß in ein Glas mit Ethanol (70%) kurz eingetaucht. Nach dem Trocknen wurden die gewaschenen und ungewaschenen Filter im Gammazähler gemessen, um die inkorporierte Aktivität zu bestimmen. Als Ergebnis waren stets 95 - 98% der Aktivität im gewaschenen Filter bzw. in der DNA enthalten.

➤ Standardverfahren zur  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation

Nicht-synchronisierte T1- oder 86HG-39-Zellen der exponentiellen Phase wurden für eine Verdopplungszeit mit  $^{125}\text{IUdR}$  exponiert, damit möglichst alle Zellen die S-Phase erreichten, um  $^{125}\text{IUdR}$  zu inkorporieren. Ein Versuchsansatz bestand aus vier Röhren mit Medium ansteigender  $^{125}\text{IUdR}$ -Aktivität (0,74 - 15 kBq  $^{125}\text{IUdR}/\text{ml}$ ), das zudem  $10^{-8}\text{M}$  FUdR und  $10^{-8}\text{M}$  CdR enthielt. Die Kontrolle war mit nicht-radioaktiven Zusätzen an FUdR, CdR und IUdR versetzt, und die Zellen wurden für 30 h inkubiert. Während der Inkubationsdauer wurde das radioaktive Medium zweimal komplett ausgetauscht, um einer Einbausättigung vorzubeugen, die nach 8 - 10 h nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 29, 3.3.1). Am Ende der  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition wurden die Zellen abgelöst, gezählt und aliquotiert. Ein Aliquot wurde stets zur Messung der zellulären Aktivität im Gammazähler verwendet.

➤ Anzahl der  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfälle pro Zelle

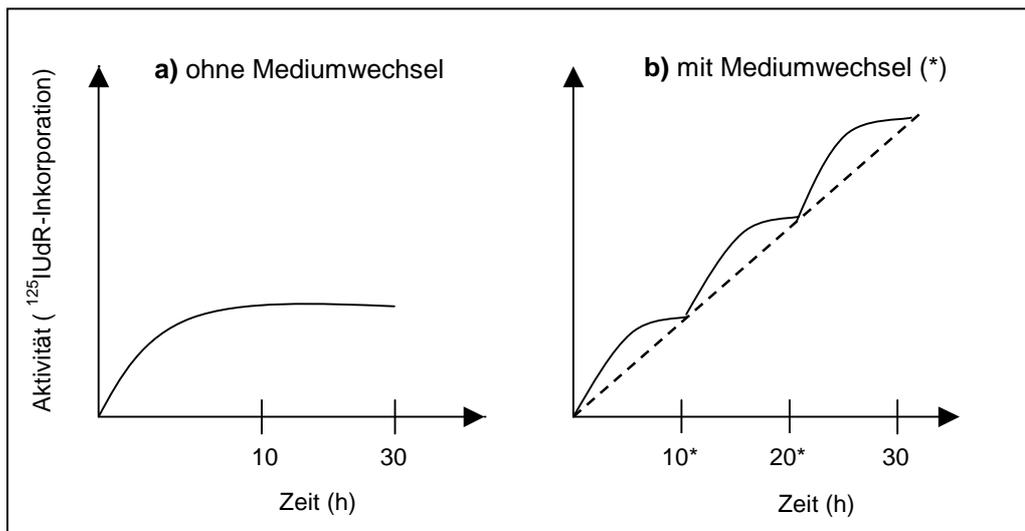
Die Zerfälle pro Zelle (d/c) nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation wurden anhand der Inkubationsdauer folgendermaßen berechnet:

$$d / c = \frac{{}^{125} I - \text{Impulse pro min} \times t_{\text{Ink}} \times F}{\text{Effizienz} \times N_z}$$

$t_{\text{Ink}}$  = Inkubationsdauer in min (im Falle der  $^{125}\text{IUdR}$ -Standardmethode 1800 min),  
 $N_z$  = Zellzahl, F = Ausgleichsfaktor (0,5)

Erläuterung zum Ausgleichsfaktor F:

Die Messung der Aktivität in den Zellen erfolgte zeitpunktbezogen am Ende der  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporationsperiode und hätte für die gesamte Dauer eine Überschätzung der eingetretenen Zerfälle pro Zelle dargestellt. Da die Inkorporation ein aktiver und zeitabhängiger Prozeß war, blieb die in den Zellen enthaltene Aktivität über diesen Zeitraum nicht konstant. Die eingetretenen Zerfälle pro Zelle wurden deshalb über einen Ausgleichsfaktor gemittelt. Durch den Mediumwechsel, der eine Sättigungserscheinung weitgehend verhinderte, ergab sich eine nahezu lineare Inkorporationsrate (Abb. 11). Aufgrund dieser Linearität konnte ein mittlerer Einbauwert von 50% angenommen und in der Zerfallskalkulation als Ausgleichsfaktor F (0,5) verwendet werden. Diese Kalkulation ist mit der von Liber et al. (1983) verwendeten Methode für die Berechnung von  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfällen pro Zelle vergleichbar.

**Abbildung 11**

Modell der zeitabhängigen  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation mit und ohne Mediumwechsel

➤  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation für  $1\frac{1}{2}$  Verdopplungszeiten:

Um die  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation zu erhöhen, wurde die Inkubationsdauer auf mehr als eine Verdopplungszeit der Zellen ausgedehnt und die T1- und 86HG-39-Monolayer für 49 h (ca.  $1\frac{1}{2}$  Verdopplungszeiten) mit  $^{125}\text{IUdR}$  inklusive FUDR- und CdR-Zusatz (beides  $10^{-8}\text{M}$ ) exponiert. Während dieser Zeit wurde das Medium dreimal ausgetauscht.

➤  $^{125}\text{I}$ -Akkumulation:

Für einen Vergleich mit Experimenten der Literatur wurden Versuche mit einer Akkumulation der  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfälle bei  $-196^\circ\text{C}$  durchgeführt. T1- und 86HG-39-Zellen wurden zur Inkorporation, wie im Standardverfahren, für 30 h mit  $^{125}\text{IUdR}$  sowie  $10^{-8}\text{M}$  FUDR- und CdR-Zusatz exponiert. Dabei wurde eine einzelne Konzentration von  $0,37\text{ kBq }^{125}\text{I}/\text{ml}$  Medium verwendet. Nach der Inkorporation wurden die Zellen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  bis zu 50 Tage eingefroren. Jede Woche wurden eine Kontrolle und eine radioaktive Probe entnommen, rasch bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut und für den Comet Assay verwendet. Die Bestimmung der akkumulierten  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfälle ( $d_t$ ) zum Zeitpunkt des Auftauens erfolgte nach der Gleichung:

$$d_t = A_0 \times \left(1 - e^{-\ln 2 \times \frac{t}{T_{1/2}}}\right) \times \frac{T_{1/2}}{\ln 2} \quad (\text{Walicka et al., 1998 b})$$

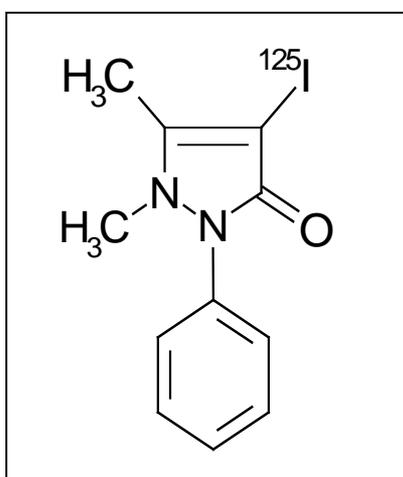
$A_0$  = Ausgangsaktivität (gemessen am Ende der Inkorporationsperiode in d/c pro Tag),  
 $t$  = Akkumulationszeit in Tagen und  $T_{1/2}$  = Halbwertszeit von  $^{125}\text{I}$  mit 60,14 Tagen

➤ Nicht-radioaktive Zusätze

Kontrollexperimente sollten die toxische Wirkung von FUdR und CdR sowie den chemischen Einfluß des Trägermoleküls IUdR (5'-Iodo-2'-desoxyuridin, Fluka) untersuchen. T1- und 86HG-39-Monolayer der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit Medium, das verschiedene Konzentrationen ( $10^{-4}$  -  $10^{-13}$ M) an den erwähnten nicht-radioaktiven Substanzen enthielt, für 30 h inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Medium korrespondierend zur  $^{125}\text{I}$ UdR-Standardmethode zweimal ausgetauscht. Die Substanzen wurden in diesen Versuchen teils einzeln, meist jedoch in Kombination zugesetzt.

### 2.2.3 $^{125}\text{I}$ -Antipyrin

$^{125}\text{I}$ -Antipyrin ( $^{125}\text{I}$ -AP) ist ein Dimethyl-iodo-phenyl-pyrazolin, bei dem das  $^{125}\text{I}$  am Fünfferring in Stellung 4 positioniert ist (Abb. 12). Im Gegensatz zur aktiven  $^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporation diffundiert  $^{125}\text{I}$ -AP frei durch die Zellmembran und verteilt sich innerhalb weniger Minuten gleichmäßig in der gesamten Zelle (Talso et al., 1955, Thompson et al., 1958).  $^{125}\text{I}$ -AP wurde als Sonderanfertigung der Firma ICN in 0,25% Na-Bicarbonat mit einer spezifischen Aktivität von 56 - 74 GBq/ mmol (1,5 - 2 Ci/ mmol) geliefert.



**Abbildung 12**  
Strukturformel des  $^{125}\text{I}$ -Antipyrins

➤ Expositionsverfahren

$0,5 \times 10^6$  Zellen wurden in 2 ml Medium verschiedener radioaktiver Konzentrationen (1,8 - 9,3 MBq  $^{125}\text{I}$ -AP) suspendiert. Die Kontrolle enthielt eine mittlere Konzentration an nicht-radioaktivem Antipyrin ( $10^{-7}$ M, Sigma) und Bicarbonat (0,02%, Biochrom KG). Für eine bessere Vergleichbarkeit mit den  $^{125}\text{I}$ UdR-Versuchen wurden Zellen der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die radioaktive Zellsuspension wurde in Leighton-Kulturröhrchen pipettiert und für 28 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung

der  $^{125}\text{I}$ -AP-Exposition wurde das radioaktive Medium entfernt, die Zellen mehrfach gewaschen, abgelöst und aliquotiert.

Am Beispiel der T1-Zellen wurde zusätzlich eine Akkumulation der  $^{125}\text{I}$ -AP-Zerfälle auf Eis ( $0^\circ\text{C}$ ) durchgeführt, um einen Vergleich zu den Comet Assay-Ergebnissen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung zu ermöglichen, die ebenfalls auf Eis erfolgte.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in einem Eppendorf-Tube in  $500 \mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$ -AP mit einer Gesamtaktivität von  $18,5 \text{ MBq}$  resuspendiert und nach 3 - 5 min auf Eis gestellt. Die Kontrolle enthielt gleiche Konzentrationen an nicht-radioaktivem Antipyrin und Bicarbonat. Alle 2 h wurden  $100 \mu\text{l}$  der Zellsuspension entnommen, die Aktivität durch mehrfaches Waschen entfernt und die Zellen für den Comet Assay in Agarose eingebettet. Die gesamte Inkubationsdauer betrug 8 h.

➤ Anzahl der  $^{125}\text{I}$ -AP-Zerfälle pro Zelle

Für die Berechnung der  $^{125}\text{I}$ -AP-Zerfälle lagen folgende Annahmen zugrunde:

- $^{125}\text{I}$ -AP verteilt sich homogen in der gesamten Zelle; d.h. intrazellulär und im umgebenden Medium ist die  $^{125}\text{I}$ -AP-Konzentration gleich.
- Die Verteilung von  $^{125}\text{I}$ -AP findet innerhalb weniger Minuten statt, und die Aktivität pro Zelle bleibt dann über den gesamten Inkubationszeitraum konstant.

Am Ende der Inkubation wird die Summe der eingetretenen Zerfälle (d) zunächst über die radioaktive Konzentration im Medium und die Zeitkomponente berechnet:

$$d / \mu\text{m}^3 = \frac{A \times t_{\text{Ink}}}{V_M}$$

A = eingesetzte Aktivität in Bq,  $t_{\text{Ink}}$  = Inkubationsdauer in s (also  $28 \times 60 \times 60$ ),

$V_M$  = Volumen des eingesetzten Mediums ( $2 \text{ ml} = 2 \times 10^{12} \mu\text{m}^3$ ).

Für die Berechnung der Anzahl der Zerfälle pro Zelle wurde mit dem Zellvolumen multipliziert:

$$d / c = \frac{A \times t_{\text{Ink}} \times V_Z}{V_M}$$

$V_Z$  = Zellvolumen (T1-Zellen =  $3054 \mu\text{m}^3$  und 86HG-39-Zellen =  $1770 \mu\text{m}^3$ ).

➤ Nicht-radioaktives Antipyrin

Um auch bei  $^{125}\text{I}$ -AP den chemischen Einfluß des Trägermoleküls auf die Zellen zu testen, wurde eine Inkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an nicht-radioaktivem Antipyrin ( $10^{-6}$  -  $10^{-8}\text{M}$ ) durchgeführt. Antipyrin wurde dafür in Aqua bidest. gelöst und dann in Medium verdünnt. Die weitere Prozedur einschließlich der Inkubationszeit entsprach genau den radioaktiven  $^{125}\text{I}$ -AP-Versuchen.

#### 2.2.4 Na<sup>125</sup>I

➤ 30 h-Exposition mit Mediumwechsel:

Die Exposition der T1- und 86HG-39-Monolayer mit extrazellulärem Na<sup>125</sup>I erfolgte durch eine 30-stündige Inkubation einschließlich Mediumwechsel, um einen direkten Vergleich zu den Ergebnissen der <sup>125</sup>IUdR-Standardmethode zu erhalten. Na<sup>125</sup>I (in NaOH, pH 10; ICN) wurde auf 1,9 - 15 kBq/ml Medium verdünnt und zu exponentiell wachsenden Zellen gegeben, wobei das Medium während der Inkubation zweimal ausgetauscht wurde. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen, abgelöst und gezählt.

➤ 28 h-Exposition ohne Mediumwechsel:

Für einen Vergleich mit den <sup>125</sup>I-AP-Versuchen wurden entsprechend  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 2 ml Medium mit Na<sup>125</sup>I (1,8 - 9,3 MBq) suspendiert und in Leighton-Kulturröhrchen ausgesät. Die Inkubationsdauer betrug ebenfalls 28 h. Da das Na<sup>125</sup>I-Molekül aufgrund seiner Anionenladung und –größe die Zellmembran nicht durchdringen konnte und deshalb extrazellulär verblieb, wurde die Effektivität des Na<sup>125</sup>I in Einheiten der Aktivitätskonzentration (Bq/ ml Medium) anstelle von Zerfällen pro Zelle bestimmt.

#### 2.2.5 <sup>3</sup>H/ <sup>125</sup>IUdR-Doppelmarkierung

Für die in 2.3.5 beschriebene Hydroxylapatit (HA) -Chromatographie wurden die Zellen zuvor mit <sup>3</sup>H-Thymidin ([Methyl-<sup>3</sup>H]-TdR, spezifische Aktivität 185 GBq/ mmol; Amersham Pharmacia) markiert. <sup>3</sup>H-TdR wird sehr gleichmäßig über die DNA verteilt eingebaut und ermöglicht verlässliche Aktivitätsmessungen der markierten DNA (Yasui et al., 1985). Für die <sup>137</sup>Cs- $\gamma$ -Versuche wurden Monolayer der exponentiellen Phase in T-25-Flaschen mit 10 ml tritiumhaltigem Wachstumsmedium (3,7 kBq <sup>3</sup>H-TdR / ml Medium) versetzt und für 24 h inkubiert. Das Medium enthielt je  $10^{-8}$ M FUdR und CdR zur Förderung des <sup>3</sup>H-TdR-Einbaus in die DNA. Dabei wurde ähnlich wie im <sup>125</sup>IUdR-Standardprotokoll verfahren, indem das radioaktive Medium zur Vorbeugung einer Inkorporationssättigung einmal nach 8-10 h erneuert wurde. Anschließend wurden die Zellen aliquotiert und als Suspension auf Eis mit <sup>137</sup>Cs- $\gamma$  bestrahlt (2 - 10 Gy). Bei den <sup>125</sup>IUdR-Versuchen erfolgte eine Doppelmarkierung der zellulären DNA mit <sup>125</sup>IUdR und <sup>3</sup>H-TdR, indem beide radioaktiven Substanzen in Medium verdünnt und gleichzeitig zu exponentiell wachsenden Monolayern gegeben wurden (3,7 - 30 kBq <sup>125</sup>IUdR und 3,7 kBq <sup>3</sup>H-TdR). Sowohl im Falle der einfachen <sup>3</sup>H-TdR-Markierung als auch im Falle der Doppelmarkierung wurde die Inkorporationsphase auf 24 h beschränkt, weil bei der sich anschließenden HA-Chromatographie eine Unterbrechung des Ablaufes ohne Genauigkeitseinbußen nicht möglich war.

## 2.3 Biologische Endpunkte

### 2.3.1 Farbttest auf „Lebensfähigkeit“

Der Farbttest auf „Lebensfähigkeit“ unterscheidet zwischen membran-ungeschädigten und membran-geschädigten Zellen, indem bei letzteren infolge von Membrandefekten das Zytoplasma und auch der Kern innerhalb einer definierten Zeit durch den Farbstoff Trypanblau angefärbt werden. Membran-ungeschädigte Zellen, die repräsentativ für „lebende“ Zellen stehen, nehmen diesen Farbstoff nicht auf (dies ist pH- und zeitabhängig). Durch Zählen der gefärbten und ungefärbten Zellen kann eine sogenannte Viabilitätsrate aufgestellt werden. Eine Schädigung nach Strahlenexposition äußert sich durch eine abnehmende Viabilitätsrate.

Trypanblau (0,4%-Lösung, Fluka) wurde 1:1 mit einer serumfreien Zellsuspension von  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml Medium gemischt und für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zählung der Zellen in einer Bürker-Zählkammer unter dem Mikroskop und die Berechnung des Prozentsatzes lebender Zellen:

$$\text{Anteil lebender Zellen (\%)} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{(\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen})} \times 100$$

### 2.3.2 Acetylcholinesterase-Test

Zelluläre Strahlenschäden können u.a. Membranschäden umfassen. Dabei treten neben Veränderungen in Fluidität, Membrantransport und Lipidperoxidation auch Proteinveränderungen auf, die sich beispielsweise auf die Aktivität membrangebundener Enzyme beziehen können. Von der Acetylcholinesterase (AChE) existiert eine membrangebunden Form, die extrazellulär durch eine Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Kette verankert ist. Es wurde angenommen, daß eine Bestrahlung von Zellen mit  $^{137}\text{Cs-}\gamma$  zu einer Ablösung (Durchtrennung des GPI-Ankers) der AChE führt, wodurch im Überstandsmedium Änderungen der Enzymaktivität fotometrisch mit der Methode nach Ellman (1961) nachgewiesen werden können. Bei dieser Methode wird das Substrat Acetylcholiniodid durch die AChE in Thiocholin (Choliniodid) und Acetat gespalten. Thiocholin bildet nach Zugabe von Ellman's Reagenz ein „gelbes Anion“. Es lagen bereits Ergebnisse zur Änderung der Enzymaktivität der AChE bei T1-Zellen nach Bestrahlung mit schweren Teilchen vor (Sharan et al., 1999).

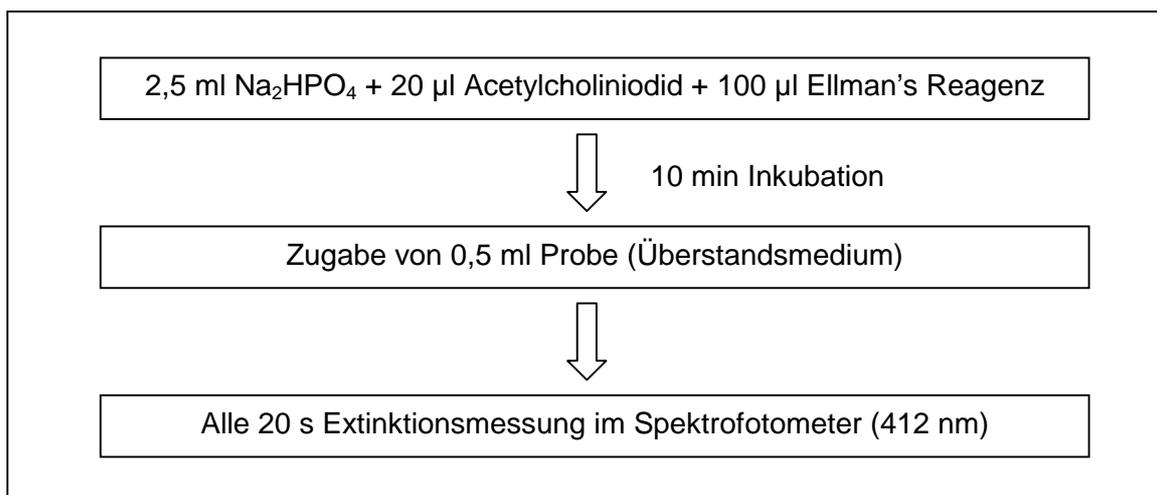
#### ➤ Probenvorbereitung

T1- und 86HG-39-Monolayer der stationären Phase in Leighton-Kulturröhrchen wurden mit PBS gewaschen, mit 2 ml serumfreiem Medium überschichtet und auf Eis mit  $^{137}\text{Cs-}\gamma$  bestrahlt. Das überstehende Medium wurde nach der Bestrahlung zentrifugiert (5 min,

167×g) und die AChE-Aktivität bestimmt. Als Standard diente membrangebundene AChE aus Rinder-Erythrozyten. Um ausschließlich die Aktivität der membrangebundenen AChE zu erhalten, wurde bei einigen Versuchen Ethopropazin (Fluka) zugesetzt, das die unspezifische Cholinesterase hemmt. Es ergaben sich dabei keine Veränderungen.

➤ Durchführung

Zwei Natriumphosphatpuffer-Lösungen mit 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck) in Aqua bidest. wurden auf die pH-Werte 7,0 und 8,0 eingestellt und bei 4°C gelagert. Ellman's Reagenz, bestehend aus 10 mM DTNB (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic-acid, Fluka) und 17,9 mM NaHCO<sub>3</sub> (Merck), wurde in 10 ml Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gelöst. Es wurde in einer dunklen Flasche maximal 3 Wochen aufbewahrt. Das Substrat, 75 mM Acetylcholiniodid (Fluka) gelöst in Aqua bidest., wurde alle 7 Tage neu angesetzt und bei 4°C gelagert.



**Abbildung 13**

Durchführung der AChE-Bestimmung mit Ellman's Reagenz

Zu 2,5 ml Natriumphosphatpuffer (pH 8,0) wurden 20 µl Acetylcholiniodid-Lösung und 100 µl Ellman's Reagenz in eine Makroküvette pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 0,5 ml Probe (überstehendes Medium oder reines Medium als Leerwert) hinzugefügt und bei 412 nm alle 20 s die Extinktionen im Spektrofotometer gemessen (Abb. 13). Die Aktivitätsrate (R) der AChE – ausgedrückt als Mol Substrat hydrolysiert pro Minute und g Protein – wurde folgendermaßen berechnet:

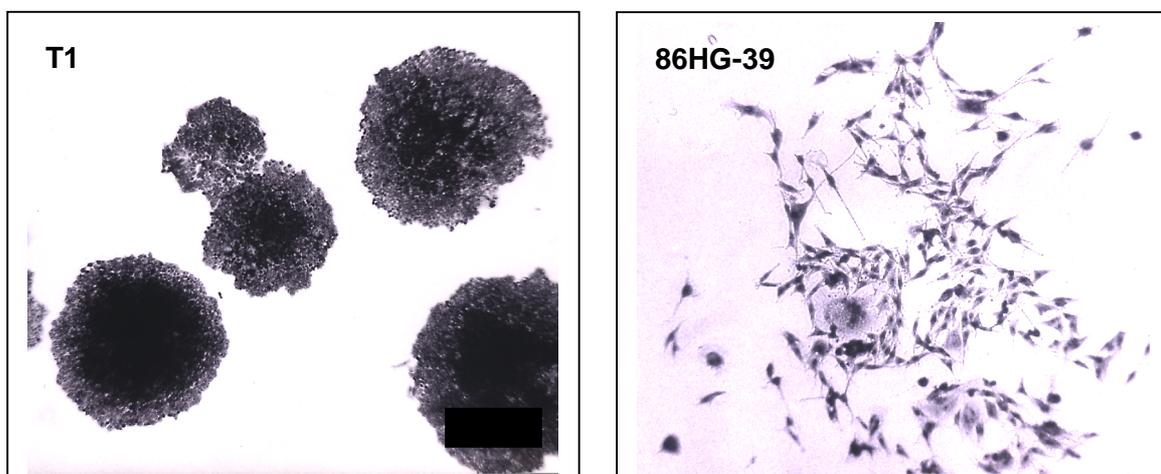
$$R = \left[ \frac{\Delta E / \text{min}}{1,36 \times 10^4 \times C_{\text{Prot}}} \right] \times F \quad (\text{Ellman, 1961})$$

Dabei beträgt der Extinktionskoeffizient des „gelben Anions“  $1,36 \times 10^4$  l pro Mol und cm, während  $C_{\text{Prot}}$  die Proteinkonzentration in g/l, bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Zellen, und F den Verdünnungsfaktor (Küvettenvolumen/ Probevolumen) darstellen.

### 2.3.3 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest ist eine gebräuchliche Methode, um den zellulären Gesamtschaden nach Strahlenexposition zu bestimmen. Es wird die nach Strahlenexposition verminderte Koloniebildungsfähigkeit einer Zellpopulation im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle untersucht. Diese Koloniebildungsfähigkeit wird als Überlebensfraktion, abhängig von der Dosis, in Form einer Überlebenskurve dargestellt.

Für den Koloniebildungstest wurden Zellsuspensionen nach Strahlenexposition in geeigneter Weise verdünnt und geringe Zellzahlen ( $500 - 1 \times 10^5$  Zellen) in T-25-Flaschen ausgesät. Für das Wachstum der 86HG-39-Kolonien wurden 20% Serumzusatz im Medium benötigt (anstatt 10%). Die T-25-Flaschen, von denen pro Dosis bzw. Konzentration je drei angesetzt waren, wurden für 9 - 11 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert und die Kolonien anschließend gefärbt. Dafür wurde das verbrauchte Wachstumsmedium aus den Flaschen entfernt, die Kolonien mit einer Kochsalzlösung (0,9%, 5 ml/ Flasche) gewaschen und mit Ethanol (70%, 5 ml/ Flasche) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach Abgießen des Alkohols wurden je 5 ml einer gebrauchsfertigen Hämatoxilinlösung nach Mayer (Fluka) für weitere 30 min bei Raumtemperatur hinzugefügt. Abschließend wurden die gefärbten Kolonien durch Zugabe von Leitungswasser 30 min lang „gebläut“ und danach getrocknet.



**Abbildung 14**

T1- und 86HG-39-Kolonien nach Hämatoxilinlösung (Vergrößerung 40x und 100x)

Die beiden Zelllinien zeigten eine sehr unterschiedliche Koloniebildung. Während die sogenannte Plating Efficiency (PE = Anzahl der Kolonien/ Anzahl der eingesäten Zellen) bei den Kontrollen der T1-Zellen meist über 90% lag, erreichten die 86HG-39-Zellen nur eine PE von maximal 30%. Auch morphologisch differierten die Kolonien der beiden Zelllinien stark: die T1-Zellen bildeten sehr runde, stark angehäufte und gut färbbare Kolonien, die 86HG-39-Zellen dagegen schlecht anfärbbare Kolonien von geringer Zelldichte und mit „ausgefranst“ Rändern (Abb. 14).

Die Auszählung der Kolonien erfolgte unter dem Invert-Mikroskop mit Hilfe einer transparenten Rasterunterlage, die auf dem T-25-Flaschenboden befestigt war. Zur Auswertung kamen nur Kolonien, die mindestens 50 Zellen enthielten.

Für die Überlebensfraktion nach Strahlenexposition gilt (Hall, 1994):

$$\text{Überlebensfraktion (\%)} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien pro Dosis bzw. Konzentration}}{\text{Anzahl der eingesäten Zellen}} \times \frac{PE}{100}$$

#### 2.3.4 Comet Assay

Der Comet Assay bietet die Möglichkeit, DNA-Schäden einzelner Zellen nach einer horizontalen Gel-Elektrophorese quantitativ zu erfassen. In der vorliegenden Arbeit wurde der alkalische Comet Assay mit einer modifizierten Methode nach Singh et al. (1988) eingesetzt, mit dem vor allem Einzelstrangbrüche detektiert werden. Bei der Messung der DNA-Schäden nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung auf Eis wurde direkt im Anschluß der Comet Assay mit den noch kalten Zellsuspensionen begonnen. Es wurden aber auch Untersuchungen zur Reparaturkinetik durchgeführt, um eine experimentelle Bestätigung zur Art der gemessenen Strangbrüche zu erhalten. In dem Fall wurden die Zellen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (4 Gy) und dem Transport auf Eis bis zu 30 min in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt und alle 2 min eine Probe für den Comet Assay entnommen.

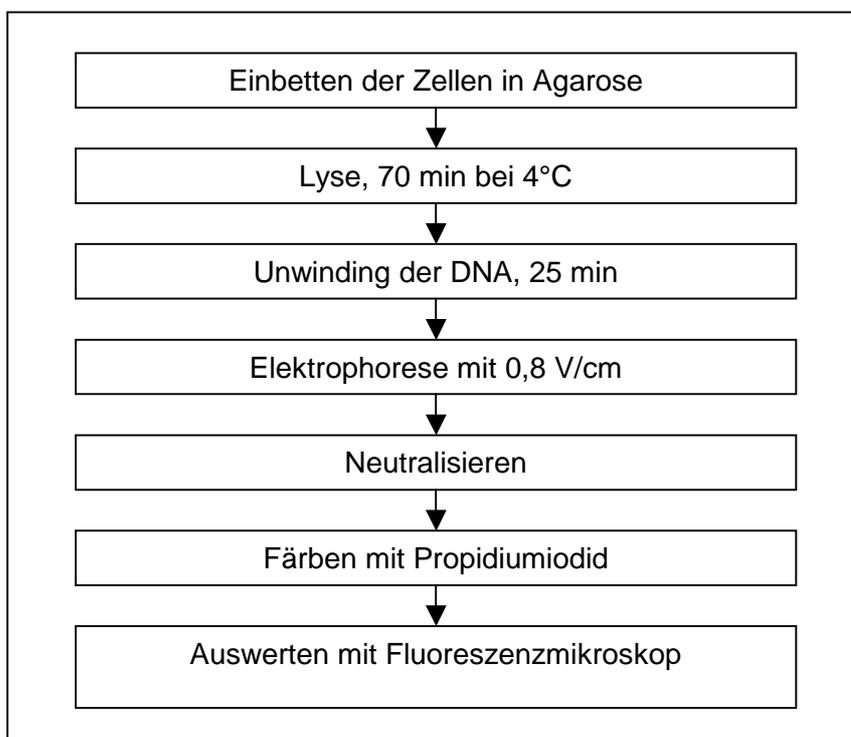
##### ➤ Vorbereitung

2,5 M NaCl (p.a., Merck), 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (Titriplex III p.a., Merck) und 10 mM Tris (Tri(hydroxymethyl)aminomethan p.a., Merck) wurden bei 95°C für ca. 45 min gelöst. Diese Lyselösung wurde nach dem Abkühlen mit NaOH auf pH 10,0 eingestellt und anschließend mit 1% Na-Sarcosinat (N-Laurylsarcosin-Natriumsalz, 30% Lösung, Serva) versetzt. Bei Raumtemperatur konnte die Lösung dann 5 - 6 Tage ohne Ausfällungen aufbewahrt werden. Kurz vor Gebrauch wurde 1% Triton-X (Triton® X-100, Merck) zur Lyse-Lösung hinzugefügt. Der Elektrophoresepuffer wurde aus 0,3 M NaOH (Natriumhydroxid-Plättchen p.a., Merck) und 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA hergestellt. Der Puffer wies stets einen pH >12 auf und konnte bei 4°C mehrere Wochen ohne Veränderungen

aufbewahrt werden. Für die Neutralisation wurden 0,4 M Tris-HCl (Merck) in Aqua bidest. gelöst, der pH-Wert auf 7,0 - 7,5 eingestellt und die Lösung bei 4°C gelagert. Handelsübliche Glasobjektträger (76 x 26 x 1 mm, Marienfeld) wurden mit einer normal-schmelzenden Agarose vorbeschichtet, indem 1% Agarose in PBS (Agarose für DNA-Elektrophorese, Serva) in einem Mikrowellengerät aufgelöst und davon 100 µl pro Objektträger ausgestrichen wurden. Die Objektträger wurden für mindestens 45 min zum Trocknen auf eine 50°C warme Platte gelegt.

➤ Versuchsablauf (Abb. 15)

Zellsuspensionen mit  $0,5 - 1,0 \times 10^6$  Zellen/ ml wurden 1:10 mit einer niedrig-schmelzenden Agarose (0,75% in PBS, low melting Agarose, Serva) verdünnt, die nach dem Lösen auf ca. 50°C heruntergekühlt worden war. Von dieser Agarosesuspension wurden 100 µl ( $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$  Zellen) als zweite Schicht auf je zwei der vorbereiteten Objektträger pipettiert und durch schnelles Abdecken mit einem Deckglas (24 x 50 mm, Marienfeld) verteilt. Die nun zweifach beschichteten Objektträger wurden für 10 min auf Eis gelegt, um die low melting Agarose zu verfestigen. Danach wurde das Deckglas wieder entfernt. Die Objektträger wurden in eine flache Schale gelegt und mit der vorbereiteten Lyselösung überschichtet (Überstand einige mm).

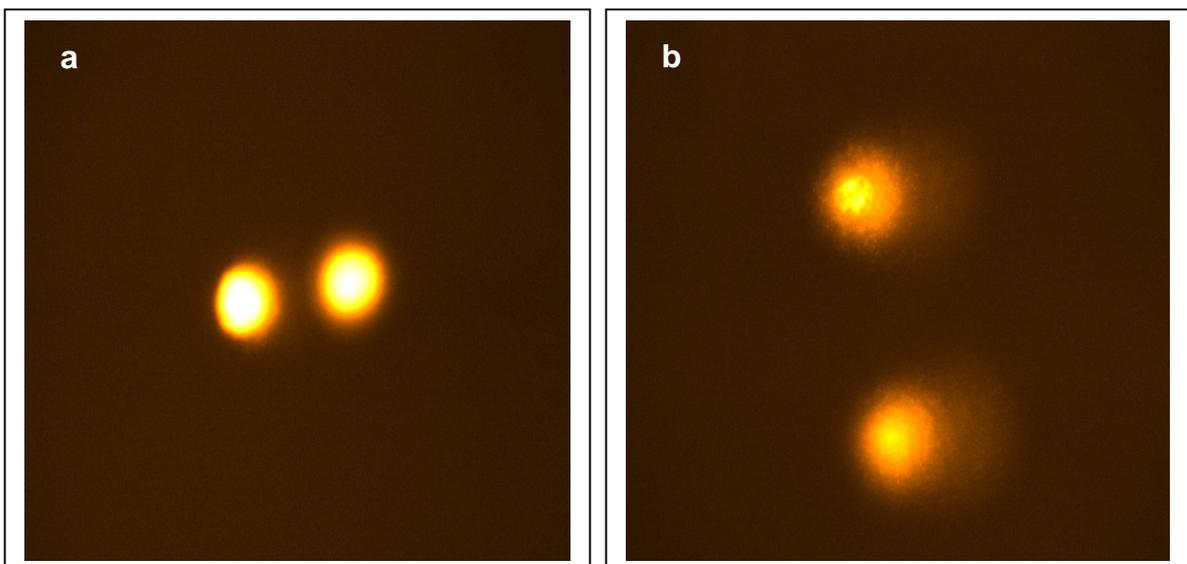


**Abbildung 15**

Ablauf des Comet Assays mit den wichtigsten Versuchsschritten

Während der Inkubation bei 4°C für 70 min wurden die in Agarose eingebetteten Zellen lysiert. Danach wurde die Lyselösung vorsichtig aus der Schale abgesaugt, um Bewegungen zu vermeiden, die zum Ablösen der Agarose vom Objektträger geführt hätten. Die Objektträger wurden in eine Horizontal-Elektrophorese-Apparatur (DNA Sub Cell™, Bio Rad) gelegt und einige Millimeter mit dem vorbereiteten alkalischen Elektrophoresepuffer bedeckt. Es folgte eine Inkubation für 25 min, die ein „Unwinding“ der DNA bewirken sollte. Dann wurde für 25 min die Elektrophorese mit 0,8 V/cm (Power Pac 3000, Bio Rad) durchgeführt, ohne dabei die Pufferlösung zu wechseln. Im elektrischen Feld wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung Anode und bildeten sogenannte Kometen.

Die Objektträger wurden anschließend vorsichtig entnommen und durch Waschen mit Tris-HCl-Lösung neutralisiert. Dabei wurde dreimal mit einigen Minuten Abstand je 1 ml Neutralisationslösung über die Objektträger pipettiert. Anschließend bestand die Möglichkeit, die beschichteten Objektträger bei 4°C in einer befeuchteten Kammer 1-2 Tage aufzubewahren, ohne daß die Agarose austrocknete. Bei den <sup>125</sup>IUdR-Inkorporationsversuchen mit anschließendem Comet Assay wurden die Objektträger über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Morgen ausgewertet. Die DNA wurde mit Propidiumiodid (Fluka) angefärbt, indem 20 - 25 µl einer Propidiumiodid-Lösung (20 µg/ ml Aqua bidest.) auf den Objektträger pipettiert und sofort mit einem Deckglas abgedeckt wurden.



**Abbildung 16**

Aufnahmen von 86HG-39-Kometen: a) ohne Bestrahlung, b) nach <sup>137</sup>Cs- $\gamma$ -Bestrahlung (8 Gy)

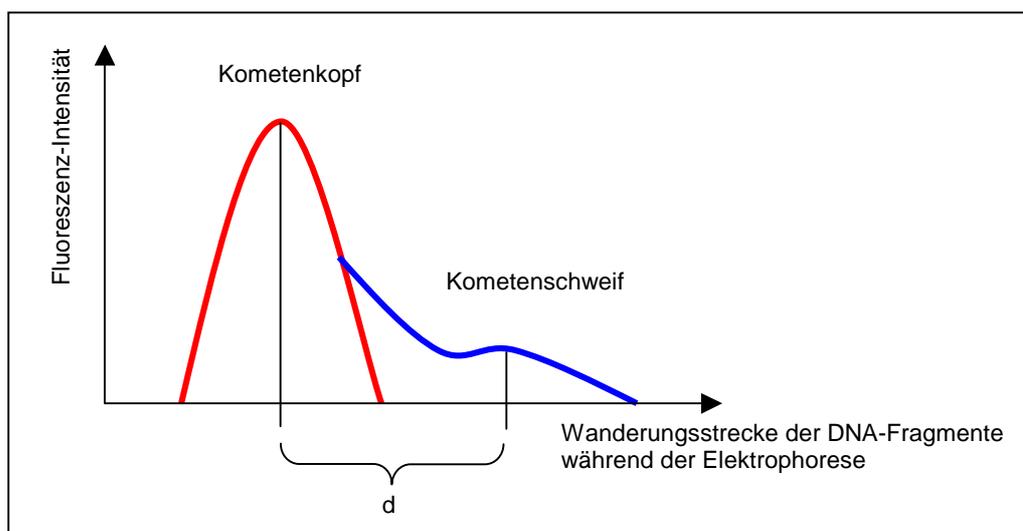
Die Kometen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (10 x 16, Filter BP 546, FT 580, LP 590, Zeiss) mit Hilfe einer Analysesoftware (Komet 3.1, Optilas) ausgewertet. Eine CCD-Kamera war am Mikroskop befestigt und übertrug das Bild der Kometen auf einen Monitor. Ungeschädigte DNA zeigte sich in Form heller, runder Kometen, während geschädigte DNA an einem deutlichen Kometenschweif geringerer Intensität zu erkennen war (Abb. 16). Für die Analyse wurden die Kometen einem visuellen Rahmen auf dem Monitor zugeordnet. Pro Dosis bzw. Konzentration wurden zwei Objektträger mit je 100 Einzelzellen ausgewertet und deren Daten gespeichert. Für die mikroskopische Auswertung wurden ca. 5 - 8 min pro Objektträger benötigt, wobei ein längeres Verweilen des Fluoreszenzlichtes auf einzelnen Kometen wegen des sogenannten „fading“ (Ausbleichen) vermieden werden mußte.

➤ Das Olive Tail Moment

Unter der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Parameter im Comet Assay wurde das dimensionslose Olive Tail Moment (OTM) zur Quantifizierung der DNA-Schädigung gewählt. Es setzt sich als Produkt aus dem Anteil der DNA-Fragmente im Kometenschweif und der Wanderungsstrecke  $d$  als Distanz von der Mitte des Kometenkopfes bis zur Mitte des Kometenschweifes zusammen (Abb. 17). Analog dazu ergibt sich die Formel:

$$OTM = d \times \text{DNA-Anteil}_{\text{Schweif}} \quad (\text{Olive et al., 1990})$$

Das OTM nimmt zu, wenn einerseits mehr Fragmente in den Schweif wandern und/ oder diese eine längere Strecke zurücklegen, indem sie kleiner werden.



**Abbildung 17**

Schematische Darstellung eines Kometen mit den Parametern des OTM

➤ Technische Erläuterungen

Grundsätzlich werden in der Software-Auswertung der Kometen die optischen Intensitäten gemessen, die durch den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid erzeugt werden. Zugrunde liegt eine Grauskala, mit der auch die Hintergrundfärbung berücksichtigt wird.

Der Abstand zwischen Kopf- und Schweifmitte entspricht nicht der Kometenschweiflänge. Sie können zufällig übereinstimmen, sind aber unterschiedlich definiert.

Kopf- und Schweifmitte sind jeweils die Leuchtdichteschwerpunkte des Kometenkopfes und des Kometenschweifes, die nach der physikalischen Schwerpunktsdefinition (Schwerpunkt = Summe der Massepunkte  $m_i$  an den Stellen  $x_i$  dividiert durch die Gesamtmasse  $M$ ) berechnet werden:

$$\text{Schweif - bzw. Kopfmitte} = \frac{\sum H_i \times x_i}{P}$$

Es wird die Summe aus Grauwerten  $H(i)$  gebildet, die jeweils mit dem Positionspixelwert  $i$  multipliziert wurden, wobei sich die Summe aller Grauwerte des Kopf- oder Schweifprofils ergibt. Dieses Produkt wird nochmals zur Normierung durch die einfache Summe der Grauwerte, auch Population  $P$  genannt, dividiert. Durch die relative Differenz zwischen Schweif- und Kopfmitte spielt die absolute Position auf der x-Achse keine Rolle. Das System muß deshalb nicht kalibriert sein und ist zudem unempfindlicher gegen Schweiflängenvariationen.

Der zweite Teil des OTM-Produktes, der Anteil der DNA im Kometenschweif, berechnet sich aus der optischen Intensität des Schweifes dividiert durch die optische Intensität des gesamten Kometen (Kopf und Schweif). Im Gegensatz zum geschädigten Anteil der DNA, der während der Elektrophorese in den Schweif gewandert ist, befindet sich der weitgehend ungeschädigte Anteil noch im Kometenkopf.

Um Kopf und Schweif eines Kometen zu erkennen und voneinander zu unterscheiden, ist von dem Auswertungssystem die Richtung der Kometen streng festgelegt. Der Kopf befindet sich stets links und der Schweif rechts. Dies ist auch beim Einlegen der Objektträger unter das Fluoreszenzmikroskop zu beachten. Das System arbeitet im Normalfall mit einer Kopfsymmetrie (abhängig von der Zellinie), d.h. ausgehend vom Leuchtdichteschwerpunkt des Kopfes wird zuerst links nach dem optischen Kopfende gesucht und diese Hälfte dann nach rechts herübergespiegelt. Dadurch sind die Abgrenzungen des Kopfes gegeben. Rechts davon gemessene Intensitäten zählen zum Kometenschweif.

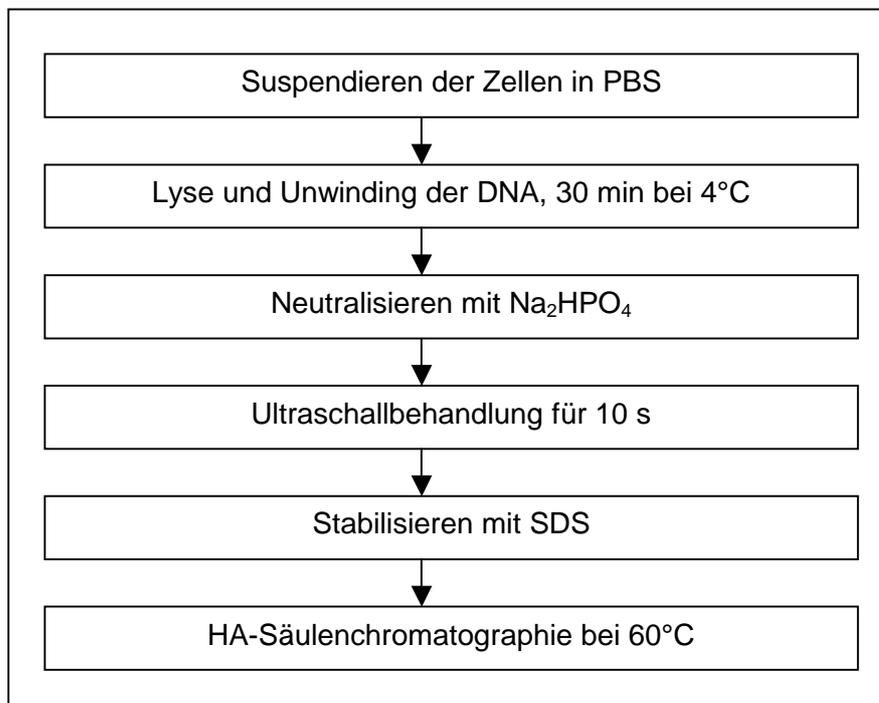
### 2.3.5 Hydroxylapatit-Chromatographie

Diese Methode ermöglicht die Auftrennung der DNA in einzelsträngige (es) und doppelsträngige (ds) Anteile nach Adsorption an Hydroxylapatit (HA) und Elution mit 0,125 M und 0,250 M Kaliumphosphatpuffer (KPP). Die Auswertung erfolgt durch Messung der radioaktiv ( $^3\text{H}$ -TdR oder  $^3\text{H}/^{125}\text{I}$ UdR) -markierten DNA-Bruchstücke.

➤ Probenvorbereitung (Abb. 18)

Von den einfach- oder doppelmarkierten Zellen (s. 2.2.5) wurden nach Strahlenexposition jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen bei  $4^\circ\text{C}$  für 5 min zentrifugiert ( $132 \times g$ ). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson) mit 5 ml Lyselösung (0,01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 0,9 M NaCl in einer 0,03 M Natronlauge, pH-Wert 12,0) pipettiert und sofort gemischt. Es ergab sich eine weitgehend homogene Lösung. In dieser stark alkalischen Salzlösung wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur lysiert, wobei gleichzeitig die DNA denaturiert wurde (Unwinding).

Während und nach dieser Behandlung zeigte sich die DNA äußerst anfällig für Scherkräfte, weshalb Bewegungen oder gar Schütteln vermieden wurde, um keine zusätzlichen Strangbrüche zu erzeugen.



**Abbildung 18**

Schematischer Ablauf der Probenvorbereitung für die HA-Säulenchromatographie

Nach der Lyse wurde die Suspension mit 2 ml einer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung (0,8 M) neutralisiert, wobei die Neutralisationslösung vorsichtig am Rand des Falcon-Röhrchens einlief und das Röhrchen zum Mischen einmal gewendet wurde. Da es während des Neutralisationsvorganges zur Gelbildung kam, mußte die Probe so schnell wie möglich weiterverarbeitet werden. Die gesamte Probe wurde in ein kleines Becherglas umgefüllt und für 10 s mit gepulstem Ultraschall (Sonifier, Cell Disruptor B15, Branson) auf der Energiestufe „2“ behandelt. Durch die Beschallung wurde sowohl eine Homogenisierung der zur Gelbildung neigenden Probe als auch eine Zertrümmerung der DNA in gleichgroße Teilstücke erreicht. Ebenfalls wurde es-DNA abgetrennt, die durch die Alkalibehandlung freilag. Anschließend wurden die DNA-Bruchstücke durch Zugabe von 3 ml SDS-Lösung (1%, Sodiumdodecylsulfat, Serva) stabilisiert, da SDS eine Renaturierung der DNA und die Bildung von DNA-Protein-Komplexen reduziert. Für eine bessere Reproduzierbarkeit wurden die Proben bis zur HA-Chromatographie bei 4°C aufbewahrt. Dabei kam es zur Ausfällung des SDS, das sich nach kurzem Erwärmen wieder auflöste.

➤ *HA-Säulenchromatographie*

Die unterschiedlich konzentrierten KPP (0,125 - 0,500 M) für die HA-Säulenchromatographie wurden äquimolar aus einer basischen  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und einer sauren  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  hergestellt, um einen neutralen pH-Wert zu erhalten. Alle Lösungen wurden stets einen Tag vorher angesetzt.

750 mg HA (DNA grade Biogel<sup>®</sup> HTP Gel, Bio Rad) konnte für 10 min in 0,01 M KPP (Startpuffer) quellen. In dieser Zeit sammelten sich sehr feine, störende HA-Partikel in der oberen Phase an und konnten dekantiert werden. Dieser Vorgang wurde gegebenenfalls wiederholt. Das HA wurde dann nochmals in etwas Startpuffer verdünnt auf die Säule (open-ended jacketed Column, 1 x 30 cm, Bio Rad) geladen, die bereits auf 60°C vorgeheizt war. Es wurde darauf geachtet, daß die Säule niemals austrocknete (wg. Luftblasen, Rißbildung). Dann wurden 2 ml der Probenlösung aufgegeben und mit 1 ml Startpuffer nachgespült, um nicht-gebundene Aktivität herunterzuwaschen. Im Probenüberstand und Startpuffer war jedoch bei allen Versuchen kaum  $^3\text{H}$ - und/ oder  $^{125}\text{I}$ -Aktivität vorhanden, was bewies, daß die gesamte Radioaktivität in die DNA inkorporiert und diese wiederum an das HA adsorbiert war. Zuerst wurde die es-DNA dreimal mit 3 ml 0,125 M KPP und anschließend die ds-DNA ebenfalls dreimal mit 3 ml 0,250 M KPP eluiert. Danach wurde die HA-Säule mit 3 ml 0,50 M KPP nachgewaschen und mit 2 ml NaCl-Lösung (1 M) gereinigt, um eventuelle Aktivitätsreste zu entfernen. Nach jeweils zwei kompletten Durchläufen wurde das HA erneuert.

Die Eluate wurden 1:10 mit Szintillationscocktail gemischt und im Flüssigkeits-szintillationszähler (Tri-Carb 2550, Packard) gemessen. Im Eluat der es-DNA fiel nach Erkalten das SDS aus, was für die radioaktive Messung jedoch keine Rolle spielte.

➤ Berechnung der DNA-Fractionen

Die Gesamtaktivität der es- und ds-Eluate wurde gleich 100% gesetzt (Dikomey et al., 1998). Eine zunehmende DNA-Schädigung spiegelt sich in der Abnahme der ds-DNA-Fraktion wieder, welche die ungeschädigte DNA darstellt. Kontrollen sollten Werte von etwa 80-90% ds-DNA-Fractionen aufweisen. Im Falle der  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung wurden reine  $^3\text{H}$ -Aktivitäten gemessen, während nach  $^3\text{H}/^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporation die Aktivitäten der Radionuklide auseinanderdividiert werden mußten.

Für das Gemisch  $^3\text{H}/^{125}\text{I}$  wurden am Tri-Carb (automatisch) folgende Energiebereiche gewählt: Region A = 0-12 keV und Region B = 12-70 keV.  $^3\text{H}$  war dabei das energieärmerere Nuklid.

Bei der Messung einer Probe mit zwei verschiedenen Radionukliden gilt für die Berechnung der einzelnen Bestandteile:

$$Y = \frac{(BE_1 - AE_2)}{(E_1E_4 - E_2E_3)} \quad \text{und} \quad X = \frac{(AE_4 - BE_3)}{(E_1E_4 - E_2E_3)}$$

mit:

- $E_1$  = Effizienz von  $^3\text{H}$  in der Region A (betrug 64,3%)
- $E_2$  = Effizienz von  $^3\text{H}$  in der Region B
- $E_3$  = Effizienz von  $^{125}\text{I}$  in der Region A (betrug 42,2%)
- $E_4$  = Effizienz von  $^{125}\text{I}$  in der Region B (betrug 28,3%)
- A= Zählrate (Messwert des Gemisches) in der Region A
- B= Zählrate (Messwert des Gemisches) in der Region B
- X= Zerfallsrate des energieärmeren Nuklids; also  $^3\text{H}$
- Y= Zerfallsrate des energiereicheren Nuklids; also  $^{125}\text{I}$

Da  $^3\text{H}$  im zweiten Energiebereich (12-70 keV) keine Zählrate mehr aufwies, vereinfachte sich die Formel, da  $E_2 = 0$  und damit:

$$Y = \frac{B}{E_4} \quad \text{und} \quad X = \frac{(A - E_3Y)}{E_1}$$

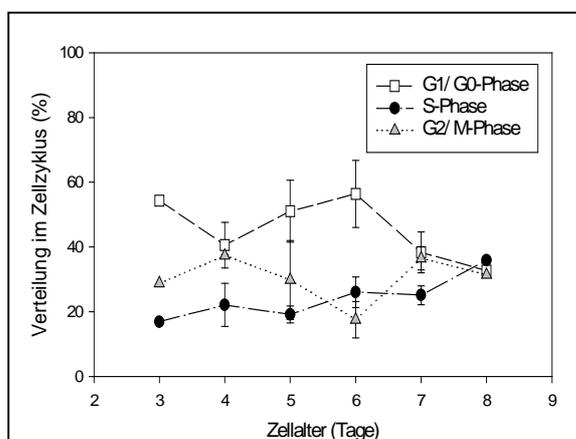
Für X bzw.  $^3\text{H}$  wurden die ds-DNA-Anteile (%) errechnet und verglichen.

### 3 Ergebnisse

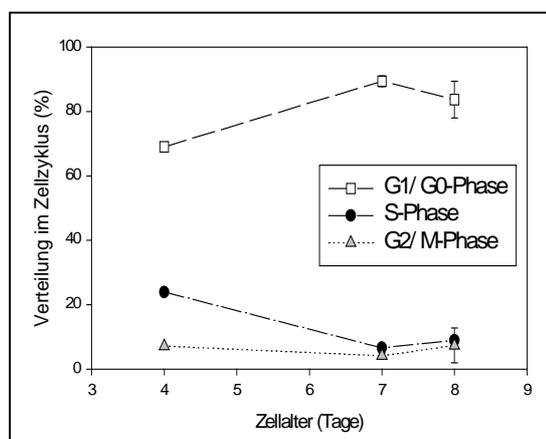
Die grafische Darstellung der Ergebnisse – meist in Form von Kurven – und die zugehörigen Regressionsrechnungen wurden mit der Software Sigma Plot 4.01 für Windows durchgeführt. Die statistischen Tests (t-Test) und die Korrelationsanalysen wurden mit Hilfe von Sigma Stat 2.0 angefertigt. Für den Signifikanz-Test wurde eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha \leq 0,05$  angenommen. In einigen Grafiken wird der Fehlerbalken durch das Symbol verdeckt.

#### 3.1 Anteile an den Zellzyklusphasen

Mit den durchflußzytometrischen Analysen wurde die DNA-Verteilung von Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen ermittelt. Diese Messungen waren für die spätere Inkorporation von  $^{125}\text{I}$ UdR in die zelluläre DNA von Bedeutung, da dieses nur von S-Phase-Zellen eingebaut wird. Der Anteil von S-Phase-Zellen sollte dementsprechend in der für diese Versuche benutzten Zellpopulation möglichst hoch sein. Es war bei den Messungen ein deutlicher Unterschied in der altersabhängigen Zellzyklusverteilung zwischen den T1- und 86HG-39-Zellen zu erkennen (Abb. 19+20).



**Abbildung 19**  
Verteilung der Zellzyklusphasen von T1-Zellen im Alter von 3 bis 8 Tagen



**Abbildung 20**  
Verteilung der Zellzyklusphasen von 86HG-39-Zellen im Alter von 4, 7 und 8 Tagen

Für den Vergleich der Zellzyklusverteilung von Zellen verschiedener Wachstumsphasen wurden die Mittelwerte aus den Messungen 4 und 7 Tage alter Zellen als Beispiele für die exponentielle und die stationäre Wachstumsphase gegenübergestellt (Tab. 5). Bei den 86HG-39-Zellen wiesen 4 Tage alte Zellen mit 23,9 % einen deutlich höheren S-Phase-Gehalt auf als 7 Tage alte Zellen mit nur 6,6%. Gleichzeitig stieg der G1-Anteil von 69%

auf 89,4 % an, und der G2/ M-Phase-Anteil nahm leicht von 7,1% auf 4,1% ab. Es ergab sich somit bei den 86HG-39-Zellen eine vom Wachstumsalter der Zellpopulation abhängige Zellzyklusverteilung. Bei T1-Zellen konnte diese Zuordnung zu den Wachstumsphasen dagegen nicht gefunden werden, da die Zellen trotz unterschiedlichen Alters eine ähnliche Verteilung im Zellzyklus zeigten. Der S-Phase-Anteil nahm bei 7 Tage alten T1-Zellen der stationären Phase um 3% von 22,1% auf 25,1% zu, während der G1-Phase-Anteil entsprechend von 40,6% auf 38,3% abnahm. Der G2/ M-Phase-Anteil blieb in etwa gleich.

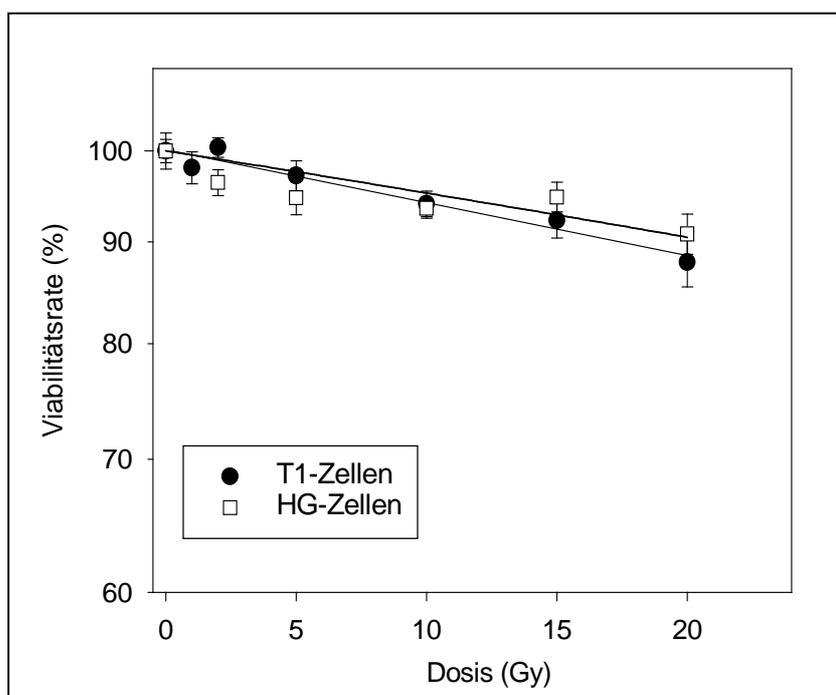
**Tabelle 5**

Zellzyklusphasenanteile (%) von T1- und 86HG-39-Zellen nach 4 und 7 Tagen Wachstum in Leighton-Kulturröhrchen (n = 1-3; ± SE)

	Alter	G1/ G0-Phase	S-Phase	G2/ M-Phase
<b>T1-Zellen</b>	4 Tage	40,6 ± 5,0	22,1 ± 4,7	37,4 ± 0,3
	7 Tage	38,3 ± 5,2	25,1 ± 2,4	36,5 ± 2,9
<b>86HG-39-Zellen</b>	4 Tage	69,0	23,9	7,1
	7 Tage	89,4 ± 1,4	6,6 ± 0,8	4,1 ± 0,8

## 3.2 <sup>137</sup>Cs-γ-Strahlung

### 3.2.1 Viabilitätsraten

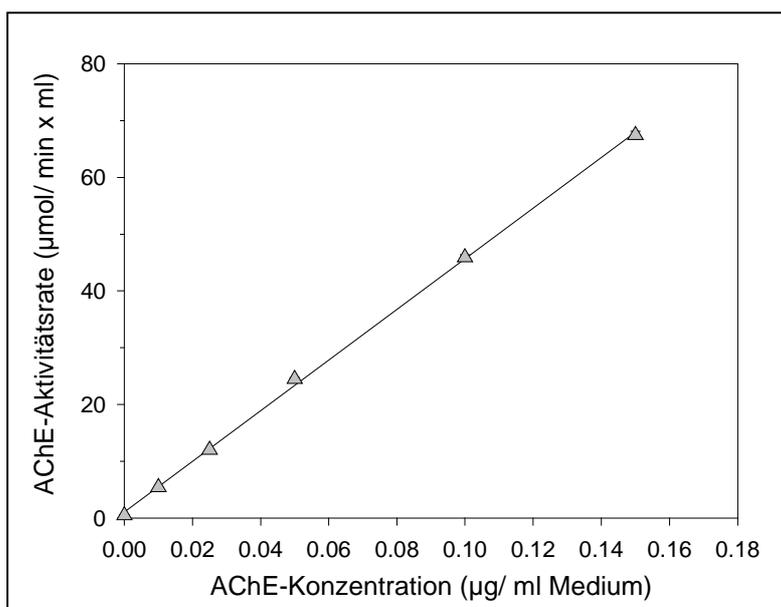
**Abbildung 21**

Viabilitätsraten der T1- und 86HG-39-Zellen nach <sup>137</sup>Cs-γ-Bestrahlung (n = 10; ± SE)

Nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (1 - 20 Gy) zeigte sich sowohl bei T1- als auch bei 86HG-39-Zellen eine leichte Abnahme der Viabilitätsrate von 100% auf 88% bzw. 91% (Abb. 21). Obwohl bei beiden Zelllinien mit zunehmender Dosis eine lineare Funktion aufgestellt werden konnte, zeigten die Werte bei den 86HG-39-Zellen im Gegensatz zu den T1-Zellen keine eindeutige Dosisabhängigkeit. Ab einer Dosis von 5 Gy waren bei T1-Zellen die Unterschiede zur Kontrolle signifikant. Bei den 86HG-39-Zellen waren alle mittleren Viabilitätsraten nach Bestrahlung signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

### 3.2.2 Acetylcholinesterase-Aktivitätsraten

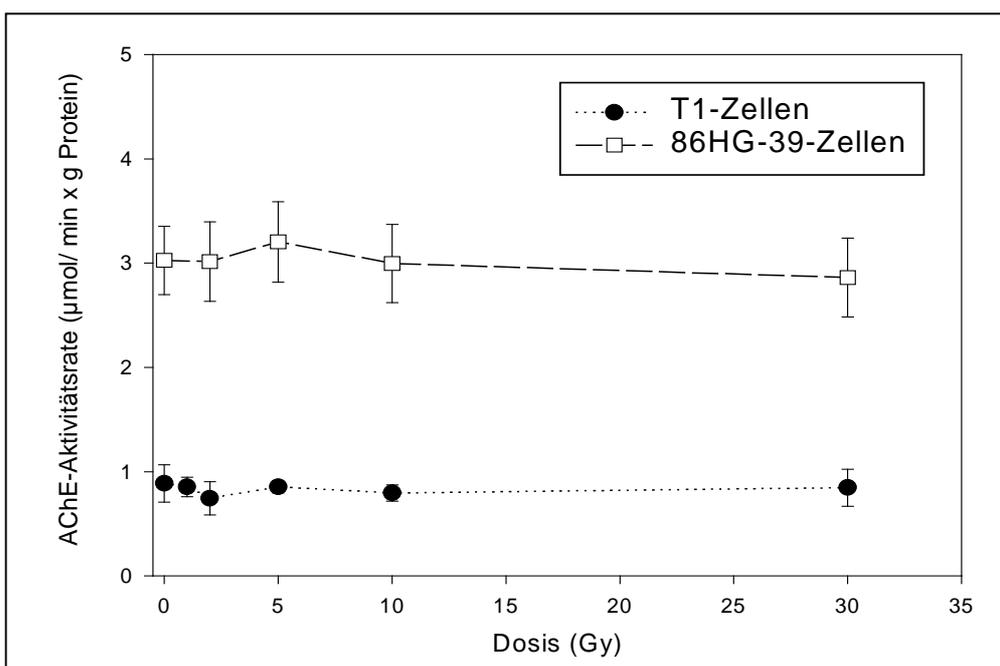
Die kolorimetrische Methode nach Ellman (1961) wurde zunächst mit einem AChE-Standard aus Rinder-Erythrozyten überprüft. Mit ansteigender Konzentration des in Medium verdünnten Standards wurde proportional eine Zunahme der AChE-Aktivität ( $\mu\text{Mol}$  Substrat hydrolysiert pro Minute und ml Probe) gefunden (Abb. 22).



**Abbildung 22**

AChE-Aktivitätsrate des Standards aus Rinder-Erythrozyten

Im Vergleich der Zelllinien wiesen die 86HG-39-Zellen, unabhängig von der Dosis, einen 3-fach höheren Enzymgehalt an AChE auf als T1-Zellen (Abb. 23). Ein Ablösen des Enzyms bzw. ein Ansteigen der Enzymaktivität durch  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung konnte jedoch an beiden Zelllinien nicht festgestellt werden, da sich trotz ansteigender Dosis (1 - 30 Gy) keine signifikanten Abweichungen von den Kontrollwerten ergaben. Bei der Berechnung wurden die AChE-Aktivitätsraten auf den Gesamtproteingehalt (pro Zelle) der jeweiligen Zelllinie bezogen.

**Abbildung 23**

AChE-Aktivitätsraten der T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung ( $\mu\text{Mol}$  Substrat hydrolysiert pro Minute und g Protein,  $n = 10$ ;  $\pm$  SE)

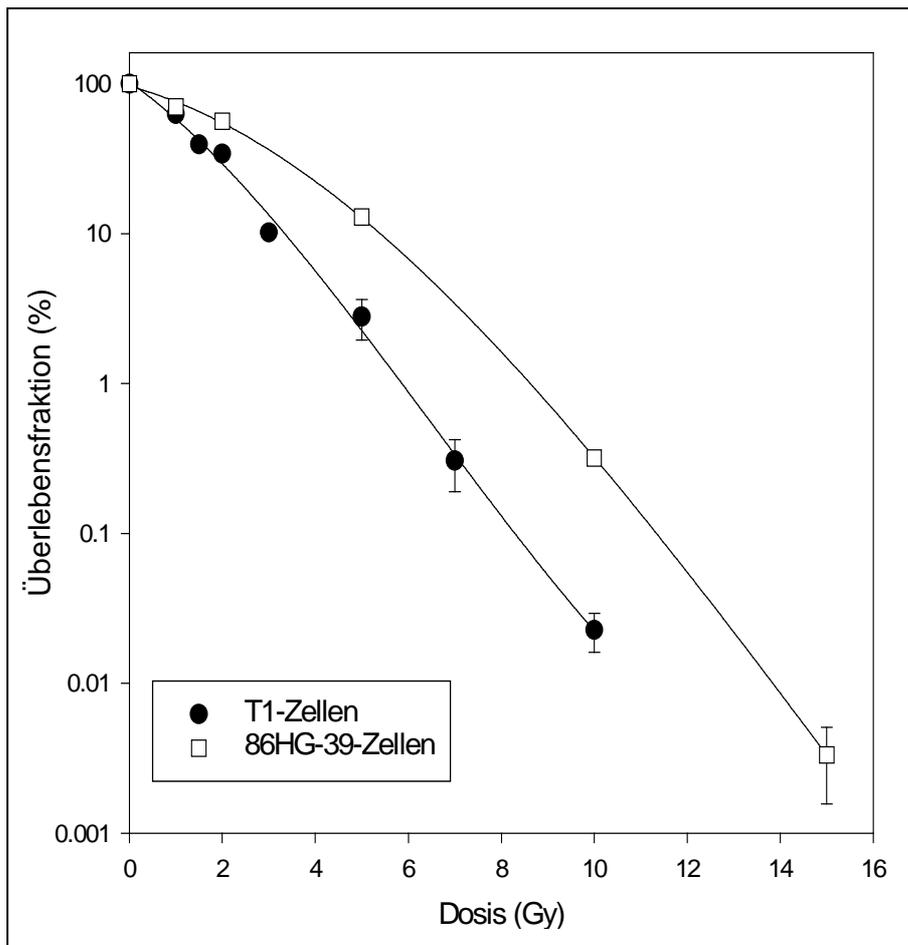
### 3.2.3 Klonogenes Überleben

Die Überlebenskurven der T1- und 86HG-39-Zellen wiesen beide nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung eine typische Niedrig-LET-Form mit einer leichten Schulter im Anfangsbereich auf und fielen dann bis in die 4. bzw. 5. Dekade ab (Abb. 24). Bei den 86HG-39-Zellen ergab sich eine etwas breitere Schulter, da die anfängliche negative Steigung im Vergleich zu T1-Zellen schwächer ausfiel. Ab einer Dosis von etwa 6 Gy verliefen die Kurven der beiden Zelllinien im linearen Teil fast parallel. Der  $D_0$ -Wert für die Charakterisierung der Überlebenskurven betrug bei den T1-Zellen 0,9 Gy und bei den 86HG-39-Zellen 1,2 Gy (Tab. 6). Die Überlebensfraktion bei 2 Gy (SF 2), einem klinischen Parameter, ergab bei T1-Zellen 40,5% und bei 86HG-39-Zellen 51%. Die T1-Zellen zeigten demnach im Vergleich der Zelllinien eine höhere Strahlensensitivität.

**Tabelle 6**

Charakteristische Kennzahlen der T1- und 86HG-39-Überlebenskurven nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung

Biol. Parameter	T1-Zellen	86-HG-39-Zellen
$D_0$	0,9 Gy	1,2 Gy
SF 2	40,5 %	51 %
$D_{37}$	1,6 Gy	2,7 Gy

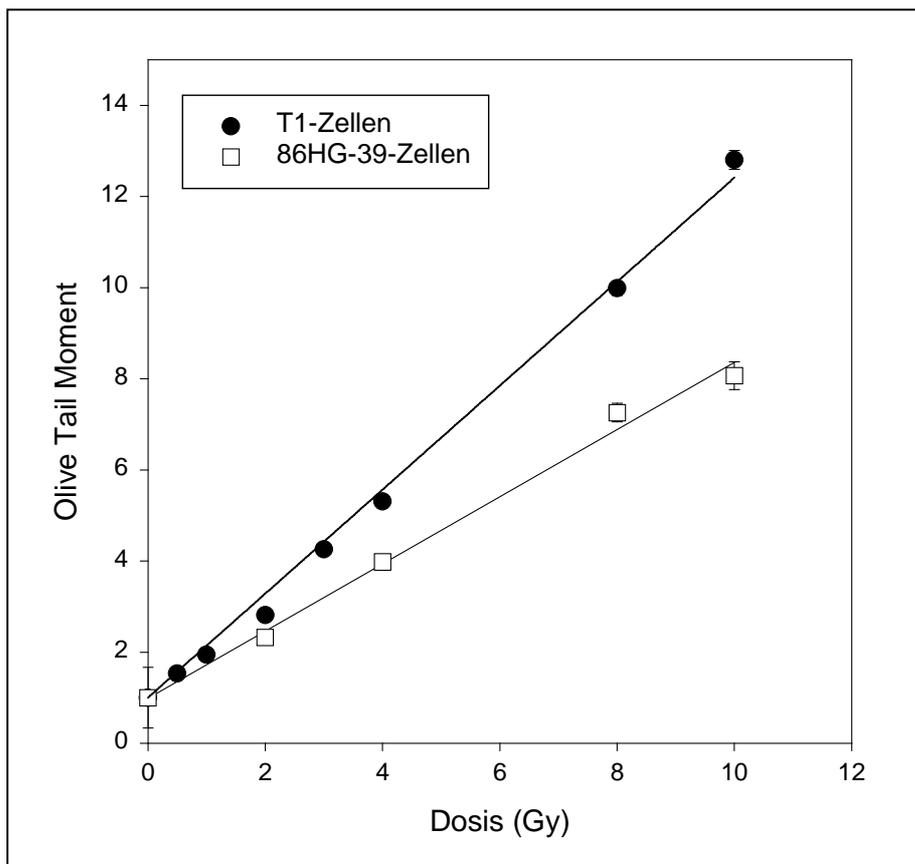
**Abbildung 24**

Überlebenskurven nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung der T1- und 86HG-39-Zellen ( $n = 6-9; \pm \text{SE}$ )

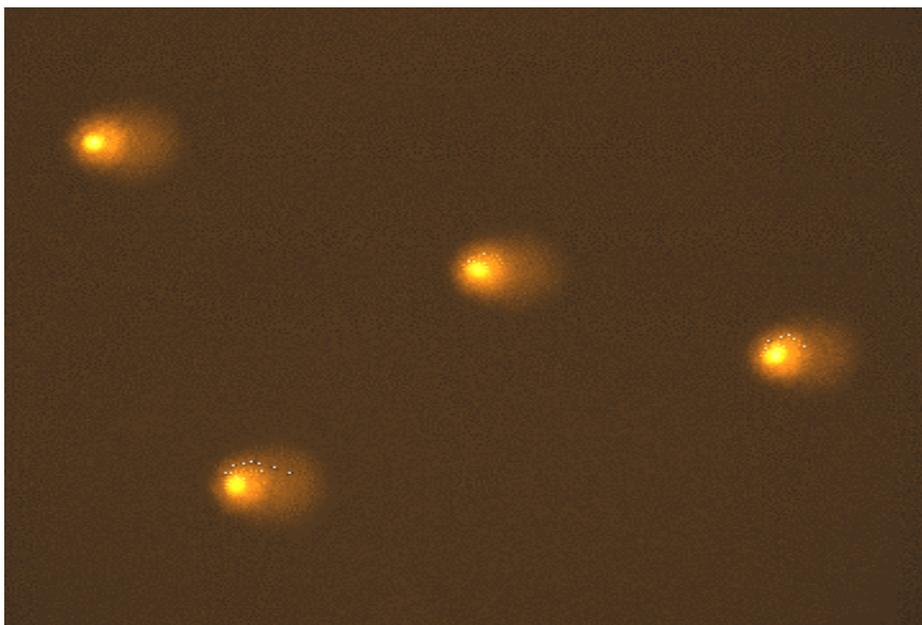
### 3.2.4 Bestimmung von DNA-Schäden mit dem Comet Assay

#### ➤ Comet Assay ohne DNA-Reparatur

Der Comet Assay zeigte bei beiden Zelllinien nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung auf Eis einen vollkommen linearen Anstieg des Olive Tail Moments (OTM) mit zunehmender Bestrahlungsdosis (Abb. 25), wobei sich die T1-Zellen, wie schon im Koloniebildungstest, als sensitiver erwiesen. Die Steigung der OTM-Funktion fiel bei den T1-Zellen mit 1,15 höher aus als bei den 86HG-39-Zellen mit 0,7. Die DNA-Schädigung nach beispielsweise 4 Gy zeigte sich in OTM-Werten von 3,8 bei den 86HG-39-Zellen und 5,3 bei den T1-Zellen. Die Kometen hatten unter dem Mikroskop nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung ein sehr homogenes Aussehen (Abb. 26) und wiesen bei gleicher Dosis eine relativ einheitliche Schweiflänge auf, die mit ansteigender Dosis proportional zunahm.

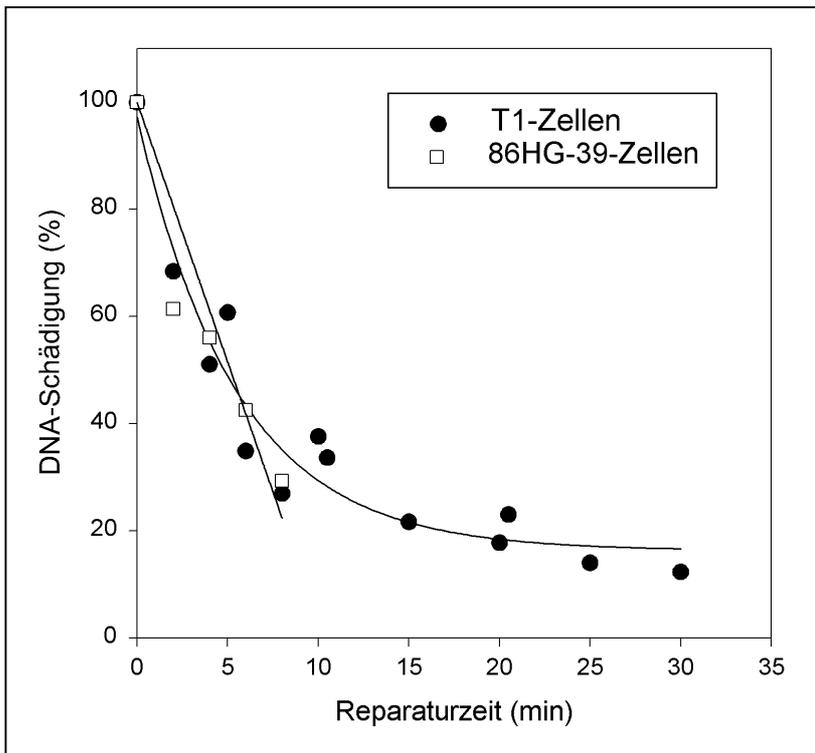
**Abbildung 25**

Comet Assay nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung der T1- und 86HG-39-Zellen  
( $n = 200-600$ ;  $\pm$  SE)

**Abbildung 26**

Aufnahme von 86HG-39-Kometen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (8 Gy)

➤ Comet Assay mit DNA-Reparatur



**Abbildung 27**

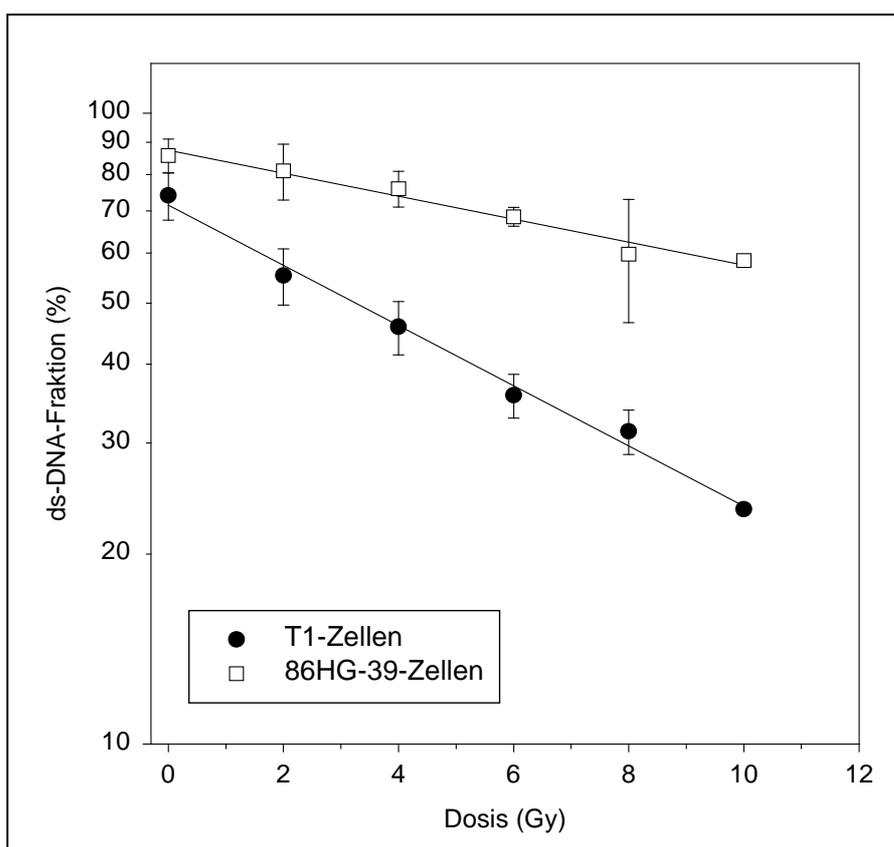
Comet Assay nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (4 Gy) der T1- und 86HG-39-Zellen und anschließender Reparatur bei 37°C (n = 200;  $\pm$  SE)

Zusätzlich wurde nach 4 Gy die Reparatur von DNA-Schäden bei 37°C mit dem Comet Assay ausgewertet. Es zeigte sich bereits in den ersten Minuten ein starke Abnahme der DNA-Schädigung auf 30 - 40%, was auf eine schnelle Reparatur von DNA-Strangbrüchen hinwies (Abb. 27). Nach etwa 6 min verlangsamte sich die Reparaturtätigkeit der Zellen und die Schädigung nahm bei den T1-Zellen nur noch um weitere 10 - 15% ab. Die Reparaturkinetik wies dadurch einen biphasischen Verlauf auf. Aufgrund der kurzen Reparaturzeit scheint es sich bei den mit dem Comet Assay gemessenen DNA-Schäden überwiegend um Einzelstrangbrüche zu handeln (Schneeweiss et al., 1987).

### 3.2.5 Strangbruchmessung mittels Hydroxylapatit-Chromatographie

Die Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mittels HA-Chromatographie wurde nach Markierung der Zellen mit  $^3\text{H}$ -TdR und anschließender  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung durchgeführt. Durch die Tritiummarkierung konnten es- und ds-DNA-Fractionen gemessen und berechnet werden. Mit ansteigender Dosis wurde eine Zunahme der Strangbrüche und daher eine Abnahme der ds-DNA-Fraktion erwartet, welche die ungeschädigte DNA repräsentiert.

Beide Zelllinien zeigten eine signifikante lineare Abnahme der ds-DNA-Fraktion (Abb. 28). Die T1-Zellen, mit einem Kontrollwert von 74%, wiesen eine stärkere Steigung auf. Die 86HG-39-Zellen starteten mit einem Kontrollwert von 86% und zeigten sich bei zunehmender Bestrahlungsdosis weniger sensitiv als T1-Zellen. Bei 10 Gy lag die ds-DNA-Fraktion der T1-Zellen bei 24%, die der 86HG-39-Zellen dagegen bei 58%.



**Abbildung 28**

HA-Chromatographie nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung der T1- und 86HG-39-Zellen ( $n = 3$ ;  $\pm$  SE)

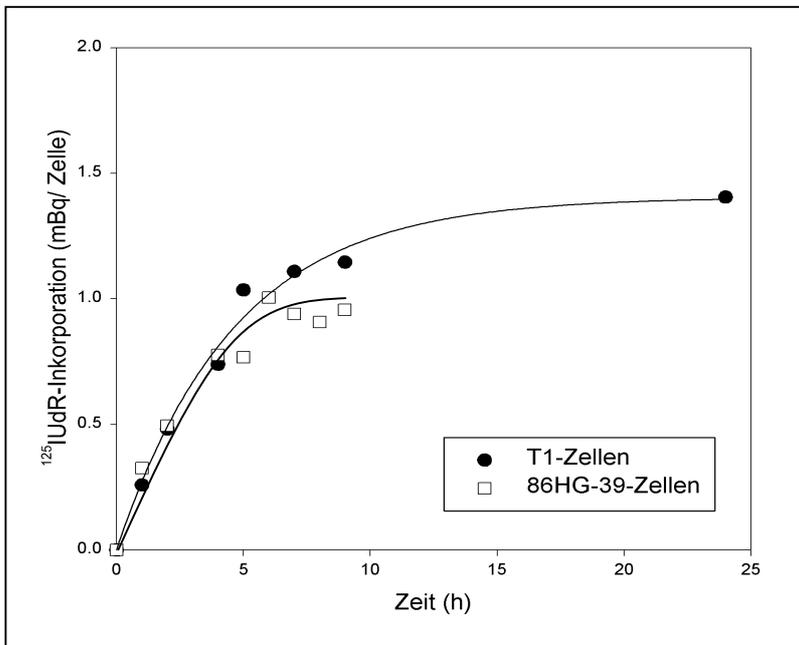
### 3.3 $^{125}\text{I}$ iododesoxyuridin

#### 3.3.1 Inkorporationsstudien

##### ➤ Zeitkomponente

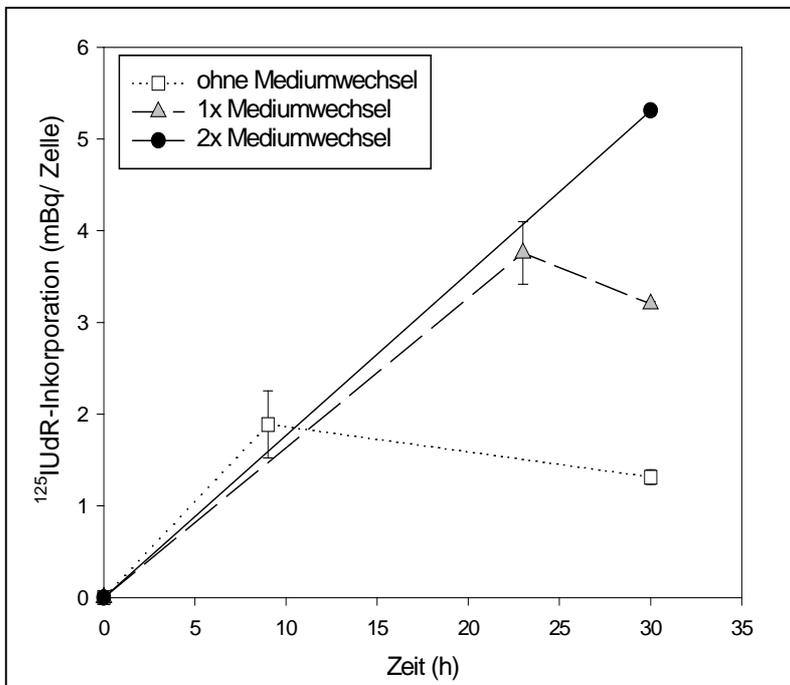
Um die Inkorporationskinetik von  $^{125}\text{I}$ UdR in T1- und 86HG-Zellen zu untersuchen, wurden Monolayer der exponentiellen Phase mit radioaktivem Medium (0,74 kBq  $^{125}\text{I}$ UdR/ml, sowie  $10^{-6}\text{M}$  FUdR und  $10^{-6}\text{M}$  CdR) versetzt und die aufgenommene Aktivität pro Zelle zu bestimmten Zeitpunkten gemessen. Nach einem steilen Anstieg der Aktivitätsaufnahme in die Zellen innerhalb der ersten 5 h folgte ein Sättigungsbereich, der bei 86HG-39-Zellen etwas früher einsetzte als bei T1-Zellen (7 h vs. 8 h, Abb. 29). Von diesem Zeitpunkt an nahmen die Zellen kein zusätzliches  $^{125}\text{I}$ UdR mehr auf. Die  $^{125}\text{I}$ UdR-Aktivität pro Zelle

blieb bis 24 h konstant bzw. verringerte sich sogar aufgrund fortschreitender Zellteilung. Die Sättigung trat unabhängig von FUdR und CdR auf, das zur Steigerung der  $^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporation zugesetzt wurde.



**Abbildung 29**

$^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporationskinetik von T1- und 86HG-39-Zellen



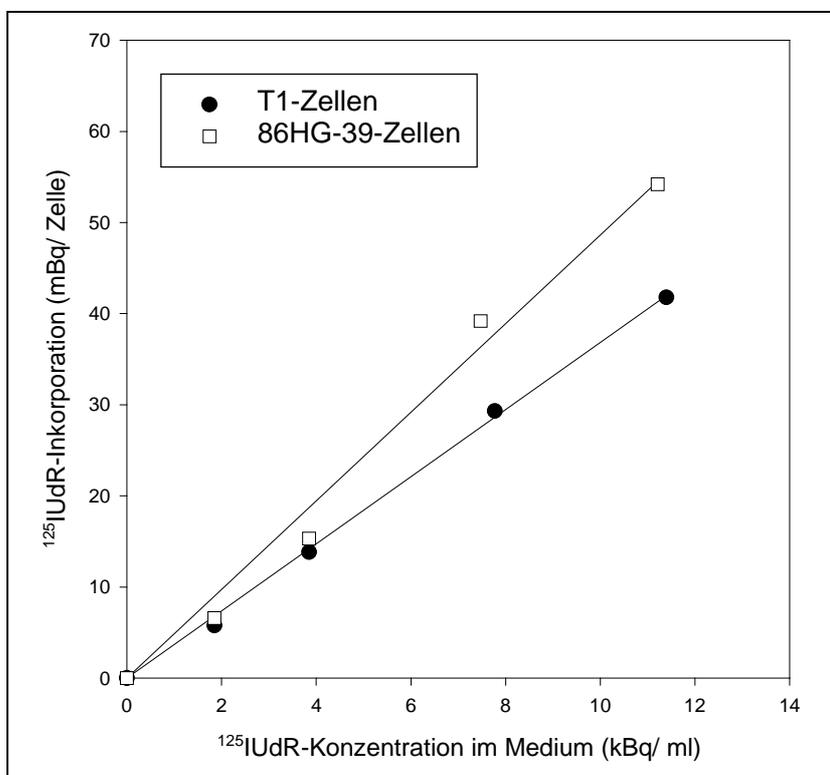
**Abbildung 30**

$^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporationskinetik am Beispiel der T1-Zellen mit Mediumwechsel nach 8 h und 23 h ( $n = 1-3; \pm \text{SE}$ )

Um diese Einbausättigung zu vermeiden, wurde im nächsten Versuch das radioaktive Medium (2,5 kBq  $^{125}\text{IUdR}$ / ml sowie  $10^{-8}\text{M}$  FudR und CdR) im Verlauf der Inkubationsphase nach 8 h vollständig ausgetauscht. Dies bewirkte, daß der Prozeß der  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in die zelluläre DNA erneut einsetzte. Nach weiteren 10 h lag wiederum eine Sättigung vor, die durch ein zweites Austauschen des radioaktiven Mediums aufgehoben werden konnte. Durch das insgesamt zweimalige Austauschen des Mediums während der Inkubation von 30 h ( $^{125}\text{IUdR}$ -Standardverfahren) nach ca. 8 h und 23 h, wurde bei beiden Zelllinien eine lineare  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in Abhängigkeit von der Zeit erreicht (Abb. 30).

➤ Konzentrationsabhängigkeit

Im Gegensatz zu den inkorporationskinetischen Studien (mit einer einzigen radioaktiven Konzentration) wurden bei den  $^{125}\text{IUdR}$ -Standardversuchen vier verschiedene Konzentrationen an  $^{125}\text{IUdR}$  eingesetzt. Nach 30 h Inkubation mit zweifachem Mediumwechsel wurde die  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation durch Messung der Aktivität pro Zelle überprüft. Es zeigte sich bei beiden Zelllinien eine lineare Abhängigkeit des  $^{125}\text{IUdR}$ -Einbaus, d.h. mit ansteigenden radioaktiven Konzentrationen nahm auch die Inkorporation proportional zu (Abb. 31). Eine Sättigung des  $^{125}\text{IUdR}$ -Einbaus konnte bis zu einer Konzentration von 15 kBq  $^{125}\text{IUdR}$ / ml Medium nicht festgestellt werden.

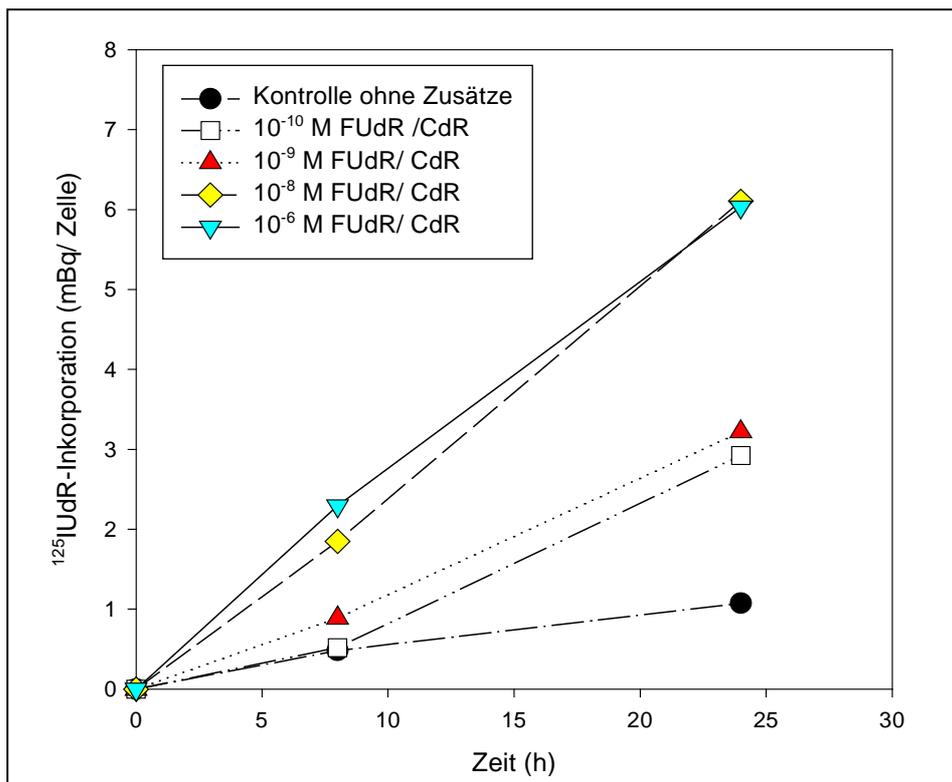


**Abbildung 31**

$^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in Abhängigkeit von der radioaktiven Konzentration im Medium

➤ Einfluß von FUdR und CdR

FUdR hemmt die Eigensynthese von zellulärem Thymidin (Danenberg, 1977) und bewirkt deshalb eine verstärkte Inkorporation des im Medium angebotenen Thymidinanalogs  $^{125}\text{IUdR}$  in die DNA. Um eine maximale Einbaurrate zu erzielen, wurde zunächst die Wirkung verschiedener FUdR-Konzentrationen auf das zelluläre Inkorporationsverhalten überprüft. CdR wurde stets zur Komplettierung der Basen in gleicher Konzentration hinzugefügt, obwohl es auf die  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in die Zellen keinen Einfluß hatte.



**Abbildung 32**

$^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in 86HG-39-Zellen bei verschiedenen FUdR- und CdR-Konzentrationen

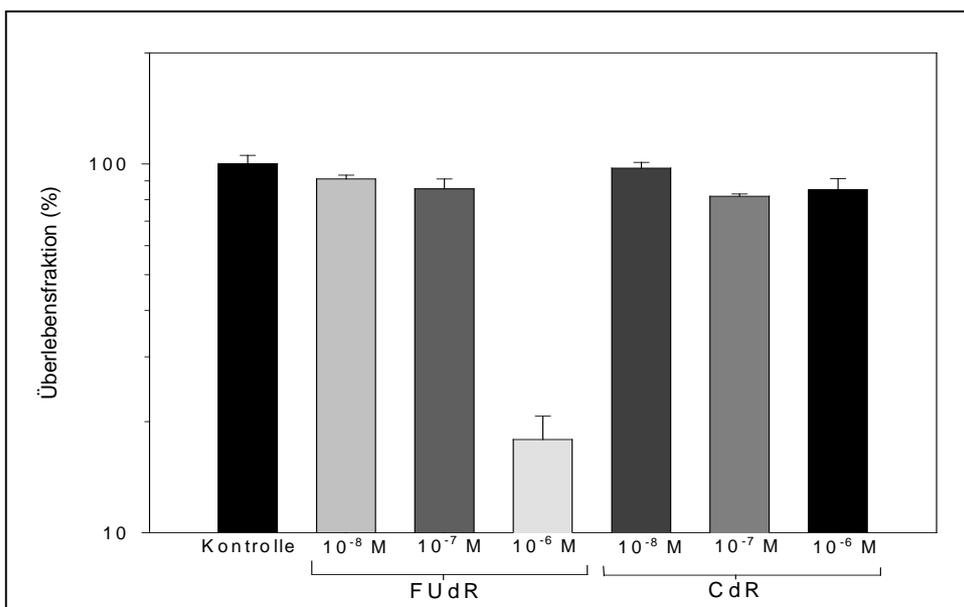
Das Beispiel der 86HG-39-Zellen zeigte eine deutliche Steigerung der  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation (2 kBq  $^{125}\text{IUdR}$ / ml Medium) bei zunehmender FUdR- und CdR-Konzentration nach 24-stündiger  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition mit einmaligem Mediumwechsel (Abb. 32). Bereits  $10^{-10}\text{M}$  FUdR und CdR bewirkten, daß etwa dreimal mehr  $^{125}\text{IUdR}$  in die DNA eingebaut wurde als bei den Kontrollzellen, die mit Medium ohne Zusätze inkubiert worden waren. Der Zusatz von  $10^{-9}\text{M}$  erhöhte diesen Wert nur minimal. Dagegen stieg bei  $10^{-8}\text{M}$  FUdR und CdR die Inkorporation noch einmal stark an. Mit einer höheren Konzentration als  $10^{-8}\text{M}$  konnte keine weitere Steigerung der  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation erzielt werden, da die Aktivität pro Zelle nach  $10^{-8}\text{M}$  sowie nach  $10^{-6}\text{M}$  FUdR und CdR gleich

hoch ausfiel. Durchschnittlich wurde bei  $10^{-8}$  -  $10^{-6}$ M FUdR und CdR im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusätze eine 5,5-fache Steigerung des  $^{125}\text{IUdR}$ -Einbaus in die DNA erreicht. Es wurden ähnliche Ergebnisse mit den T1-Zellen erzielt (nicht dargestellt), wobei die  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation bei Zusatz von  $10^{-8}$  -  $10^{-6}$ M FUdR und CdR sogar um den Faktor 11,6 im Vergleich zu T1-Kontrollzellen ohne Zusätze gesteigert werden konnte.

### 3.3.2 Klonogenes Überleben und DNA-Schädigung (Comet Assay)

#### ➤ Kalte Zusätze

Nachdem eine Steigerung der  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation durch FUdR-/ CdR-Zusatz im radioaktiven Medium gefunden worden war, wurde anschließend der toxische Einfluß dieser Substanzen auf die Zellen untersucht. Der Koloniebildungstest und der Comet Assay wurden nach Inkubation der Zellen mit nicht-radioaktiven Zusätzen (als Einzelgabe und in Kombination) durchgeführt. Die Methode entsprach dem  $^{125}\text{IUdR}$ -Standardverfahren, da das Medium während der 30-stündigen Inkubation zweimal ausgetauscht wurde. Bei Einzelgabe von  $10^{-6}$ M FUdR wurde im Koloniebildungstest bei T1-Zellen eine starke toxische Wirkung gefunden, die das Überleben auf 18% reduzierte (Abb. 33). Konzentrationen an  $10^{-8}$ M und  $10^{-7}$ M FUdR sowie der Zusatz von  $10^{-8}$  -  $10^{-6}$ M CdR verminderten die Überlebensfraktion nur leicht und überwiegend nicht signifikant auf durchschnittlich 88%.

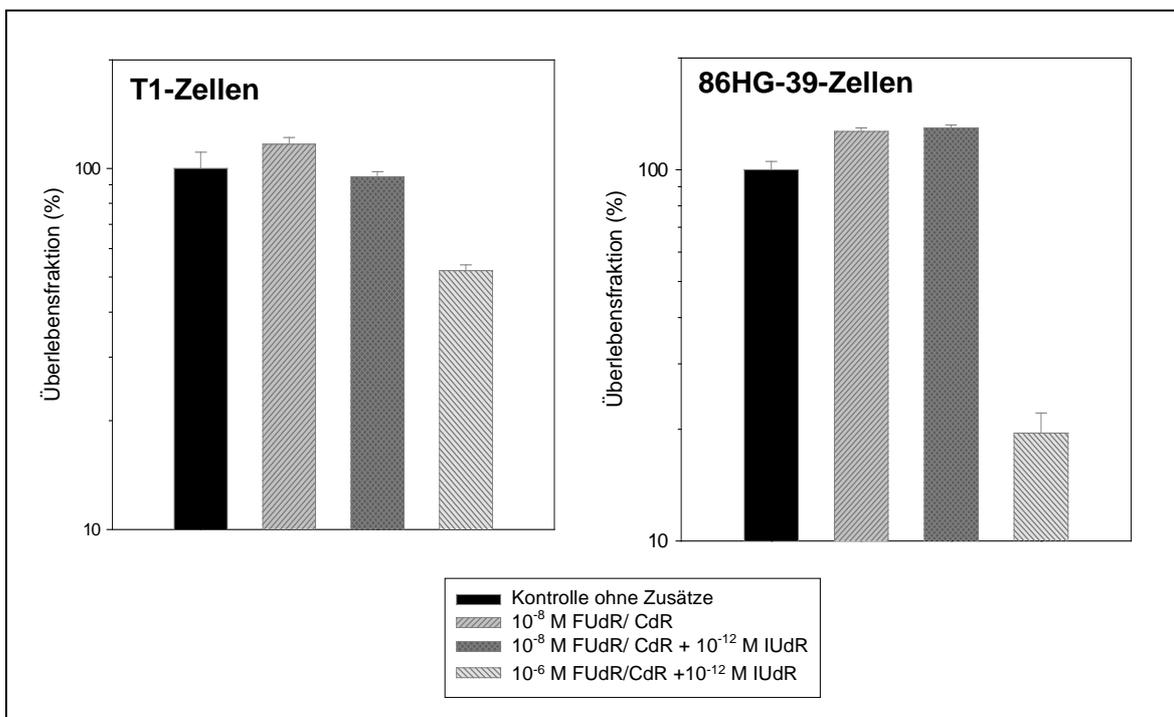


**Abbildung 33**

Koloniebildungstest nach Inkubation der T1-Zellen mit verschiedenen FUdR- und CdR-Konzentrationen (n = 3;  $\pm$  SE)

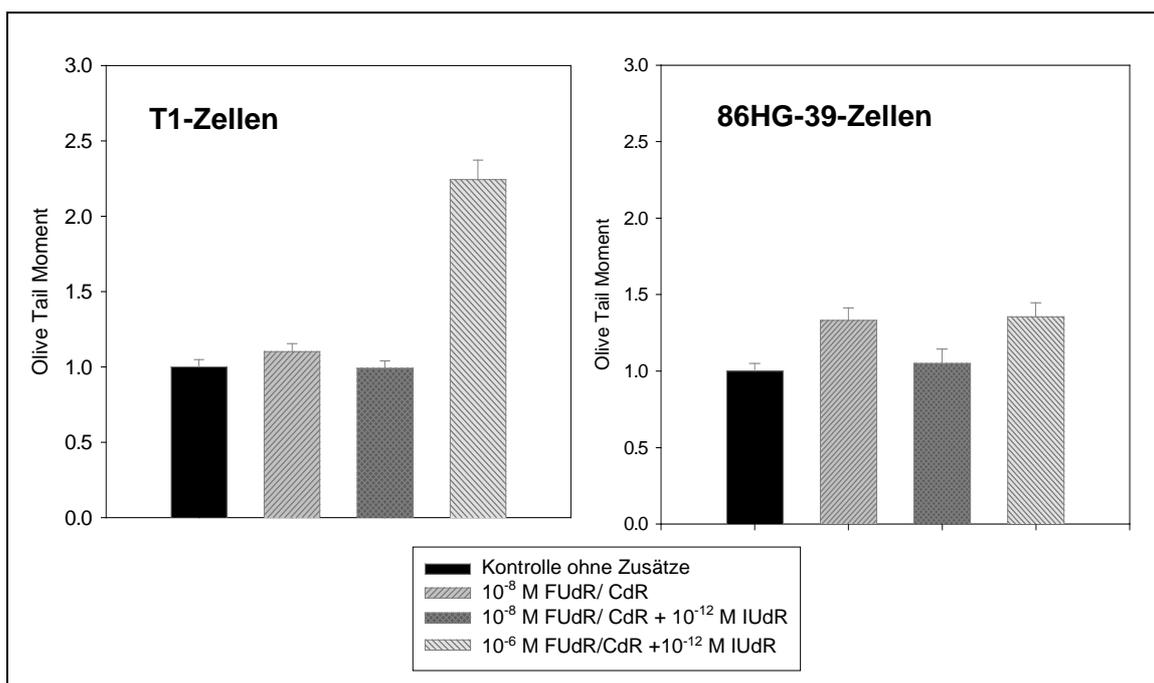
Die nachfolgenden Versuche wurden in Kombination mit IUdR durchgeführt, welches stets in nicht-radioaktiver Form zur Kontrolle hinzugefügt wurde. Es wurde dabei eine Konzentration von  $10^{-12}$ M IUdR gewählt, da die chemische Konzentration an  $^{125}$ IUdR bei den radioaktiven Versuchen maximal bei  $2 \times 10^{-12}$ M, meistens jedoch im Bereich von  $10^{-13}$ M lag. Es wurde festgestellt, daß bei Hemmung der zellulären *de novo*-Pyrimidinsynthese durch FUdR ein entsprechender Pyrimidin-Ersatz (Thymidin oder ein Analogon wie z.B. IUdR) die toxische Wirkung mindert (Ergebnis nicht dargestellt).

Die Überlebensfraktion im Koloniebildungstest blieb sowohl nach Exposition der Zellen mit  $10^{-8}$ M FUdR und CdR wie auch in Kombination mit  $10^{-12}$ M IUdR für 30 h mit zweifachem Mediumwechsel unverändert (Abb. 34). Bei einer Konzentration von  $10^{-6}$ M FUdR und CdR (inklusive  $10^{-12}$ M IUdR) wurde die Überlebensfraktion der Zelllinien auf 52% (T1-Zellen) und 20% (86HG-39-Zellen) gesenkt. Dieses Ergebnis spiegelte sich im Comet Assay wieder (Abb. 35), da das OTM der T1-Zellen erst bei  $10^{-6}$ M FUdR und CdR (inklusive  $10^{-12}$ M IUdR) signifikant von 1,0 auf 2,2 zunahm. Die 86HG-39-Zellen zeigten sich darüber hinaus sensitiv bei alleiniger Inkubation mit  $10^{-8}$ M FUdR und CdR, nach der das OTM, ebenso wie nach Exposition mit  $10^{-6}$ M FUdR und CdR in Kombination mit  $10^{-12}$ M IUdR, von 1,0 auf 1,4 anstieg.



**Abbildung 34**

Koloniebildungstest nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit verschiedenen FUdR- und CdR-Konzentrationen sowie  $10^{-12}$ M IUdR ( $n = 3; \pm$  SE)

**Abbildung 35**

Comet Assay nach Exposition von T1- und 86HG-39-Zellen mit verschiedenen FUDR- und CdR-Konzentrationen sowie  $10^{-12}$  M IUdR (n = 200;  $\pm$  SE)

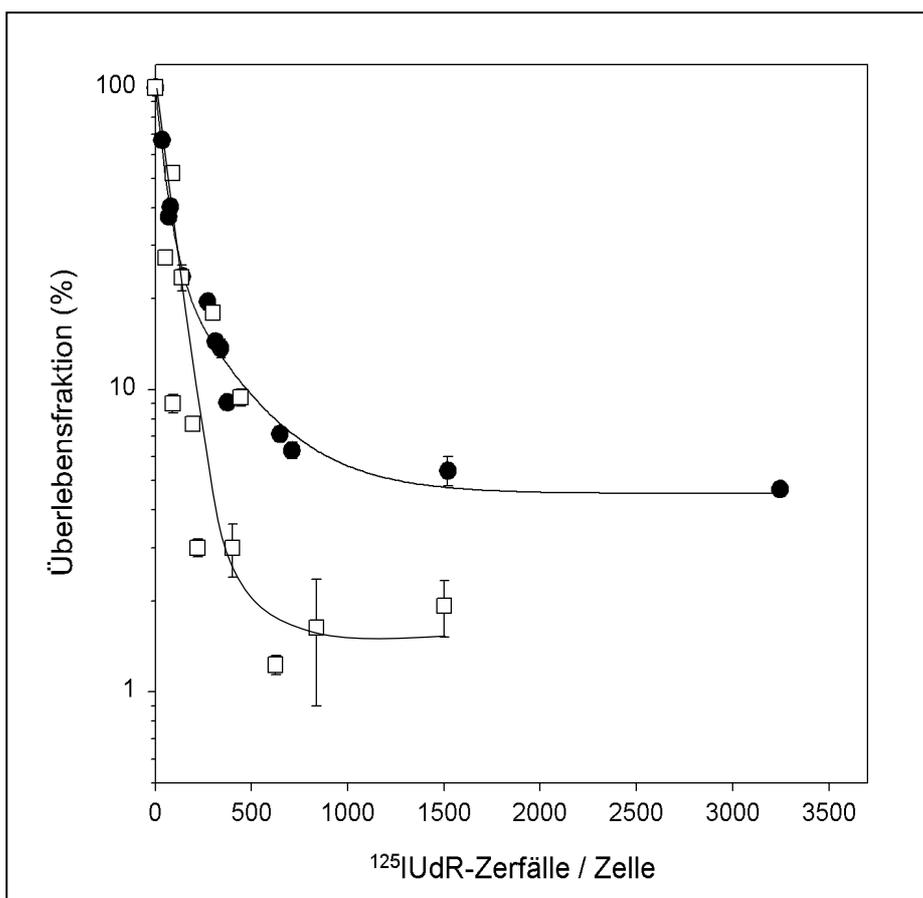
In einer separaten Versuchsreihe wurde der Einfluß des IUdR getestet (nicht dargestellt), indem die Zellen für 30 h mit  $10^{-12}$  M,  $10^{-8}$  M oder  $10^{-4}$  M IUdR im Medium inkubiert wurden. Die Konzentrationen an FUDR und CdR blieben mit  $10^{-8}$  M konstant. Das IUdR zeigte sowohl im Koloniebildungstest als auch im Comet Assay erst bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Eine toxische Wirkung des IUdR in den radioaktiven  $^{125}$ IUdR-Versuchen konnte daher ausgeschlossen werden.

#### ➤ Standardverfahren zur $^{125}$ IUdR-Inkorporation

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse wurde im Standardverfahren mit  $10^{-8}$  M FUDR und CdR gearbeitet, wodurch eine maximale Inkorporation von  $^{125}$ IUdR in die DNA erreicht wurde und gleichzeitig toxische Einflüsse auf die Zellen weitgehend vermieden wurden. Außerdem wurde ein zweifacher Mediumwechsel durchgeführt, um einer Einbausättigung vorzubeugen. Die T1- und 86HG-39-Monolayer wurden für 30 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit verschiedenen radioaktiven Konzentrationen an  $^{125}$ IUdR inkubiert und die Effekte mit dem Koloniebildungstest und dem Comet Assay erfaßt.

Die Überlebenskurven beider Zelllinien zeigten bereits nach wenigen  $^{125}$ IUdR-Zerfällen pro Zelle einen steilen Abfall ihrer Überlebensfraktionen, gingen jedoch ab etwa 700 d/c in einen reproduzierbaren Sättigungsbereich über (Abb. 36). Dadurch erreichten beide Kurven nur die 2. Dekade, wobei die 86HG-39-Zellen niedrigere Überlebensfraktionen von

etwa 1,5% im gesättigten Teil der Kurve aufwiesen. Die Sättigung, die auch als „Tailing“ bezeichnet wird (Roots et al., 1971) war bei den T1-Zellen besonders deutlich sichtbar, da trotz zunehmender  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfälle pro Zelle ein konstanter Anteil von etwa 5% an überlebenden Zellen verblieb. Für T1-Zellen betrug der  $D_{37}$ -Wert ca. 90 d/c und für 86HG-39-Zellen 80 d/c. (Obwohl  $D_{37}$  eine Dosis bezeichnet, erfolgte bei  $^{125}\text{I}$  die Angabe der  $D_{37}$ -Werte in Zerfällen pro Zelle, wie es auch in der Literatur üblich ist).

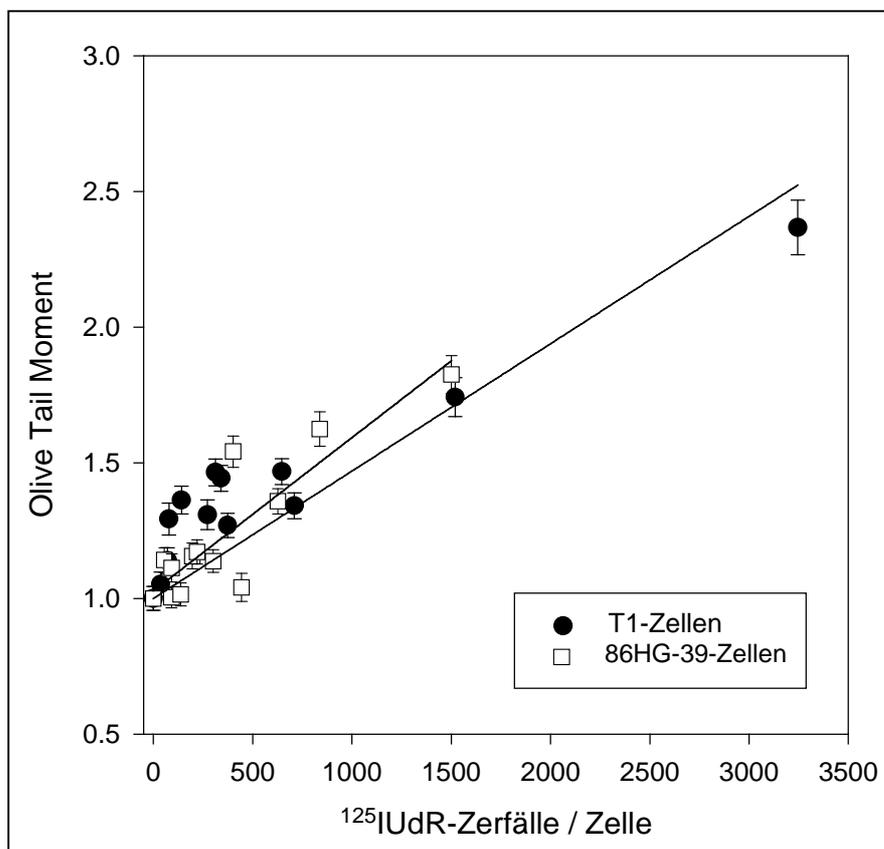


**Abbildung 36**

Überlebenskurven nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in T1- und 86HG-39-Zellen im Standardverfahren ( $n = 3; \pm \text{SE}$ )

Mit zunehmenden  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfällen pro Zelle stieg auch im Comet Assay die DNA-Schädigung in Form des Olive Tail Moments an (Abb. 37). Trotz der Streuung der Werte im Anfangsbereich bis 500 d/c wurde vor allem bei höheren Zerfallszahlen eine lineare Abhängigkeit gefunden. Im Vergleich der Zelllinien fiel die Steigung der 86HG-39-Zellen etwas höher aus: bei 1000 d/c wiesen die T1-Zellen durchschnittlich ein OTM von 1,47 auf, die 86HG-39-Zellen dagegen ein OTM von 1,58. Damit ergab sich nach  $^{125}\text{IUdR}$ -

Inkorporation sowohl beim Koloniebildungstest als auch beim Comet Assay eine etwas ausgeprägtere Radiosensitivität der 86HG-39-Zellen.

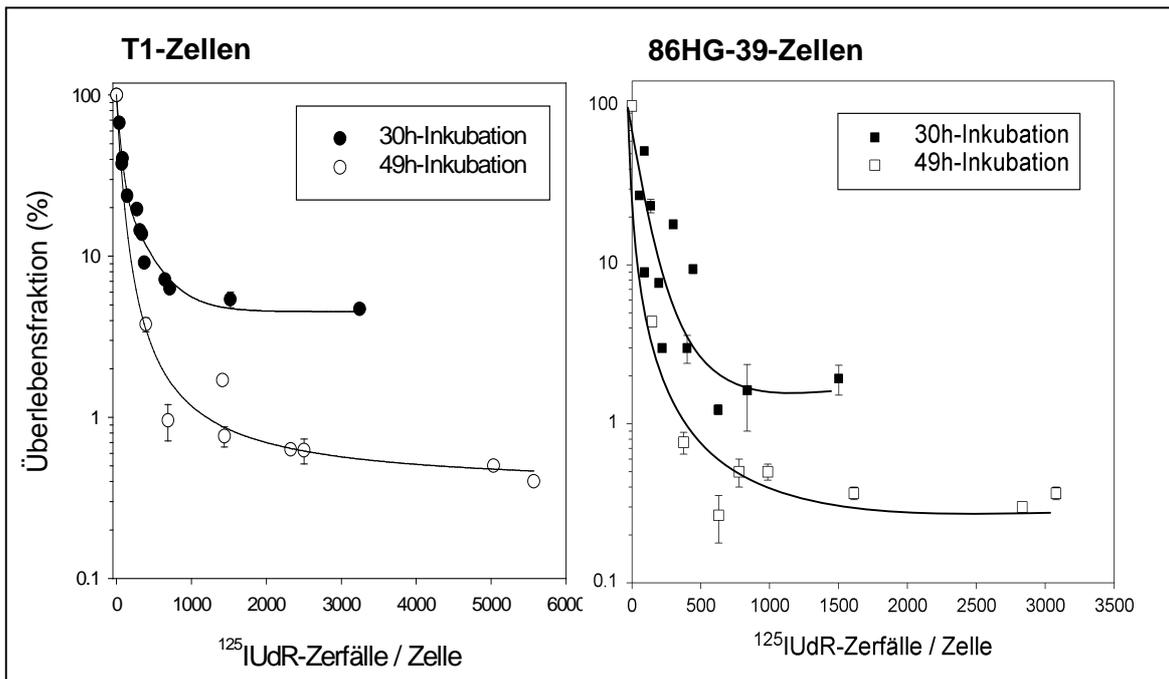


**Abbildung 37**

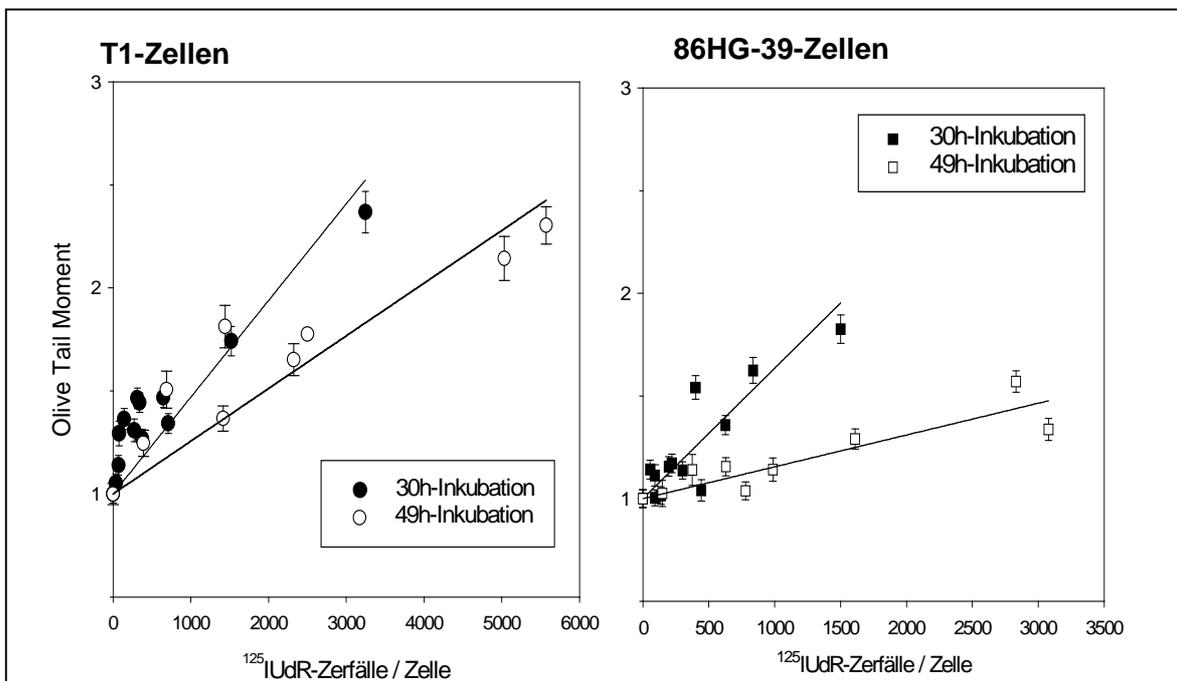
Comet Assay nach <sup>125</sup>IUdR-Inkorporation in T1- und 86HG-39-Zellen im Standardverfahren (n = 200; ± SE)

➤ <sup>125</sup>IUdR-Inkorporation für 1½ Verdopplungszeiten

Durch eine Verlängerung der radioaktiven Inkubation von 30 h auf 49 h (1 ½ Verdopplungszeiten) wurde versucht, möglichst alle Zellen der asynchronen Kultur zur Inkorporation von <sup>125</sup>IUdR zu bewegen. Dabei wurde das Medium, das wiederum 10<sup>-8</sup>M FUdR und CdR enthielt, während der Inkubation insgesamt dreimal ausgetauscht. Der Koloniebildungstest zeigte, daß die Überlebensrate im Sättigungsbereich leicht gesenkt werden konnte, ein Tailing jedoch weiterhin bei beiden Zelllinien auftrat (Abb. 38). Da die Kolonieausbeute bei dieser Methode zu gering war, wurde sie nicht als Standardmethode verwendet. Im Comet Assay wurden linear ansteigende OTM-Funktionen in Abhängigkeit von der Zerfallszahl gefunden, deren Steigungen jedoch, verglichen mit der 30-stündigen Inkubation im Standardverfahren, geringer ausfielen (Abb. 39).

**Abbildung 38**

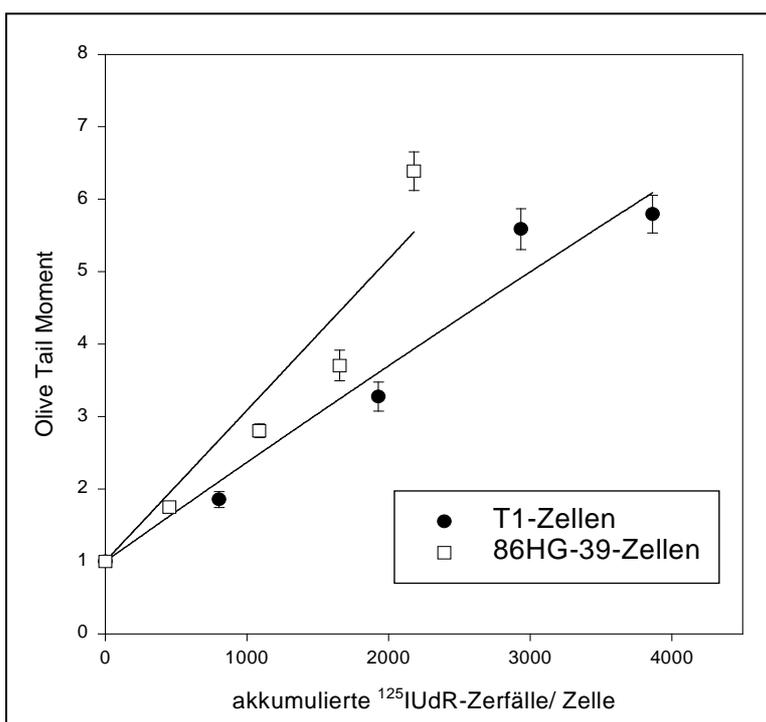
Vergleich der Überlebenskurven von T1- und 86HG-39-Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit  $^{125}\text{IUdR}$

**Abbildung 39**

Vergleich der OTM-Funktionen von T1- und 86HG-39-Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit  $^{125}\text{IUdR}$

➤ <sup>125</sup>IUdR-Akkumulationsverfahren

Die Ergebnisse des Comet Assays nach <sup>125</sup>IUdR-Exposition bei 37°C wurden mit denen nach Akkumulation der <sup>125</sup>IUdR-Zerfälle in T1- und 86HG-39-Zellen bei -196°C verglichen. Das OTM stieg in gefrorenen Zellen mit zunehmender Zerfallszahl steil an (Abb. 40), wobei die Steigung bei den 86HG-39-Zellen stärker als bei den T1-Zellen ausfiel. Bei 1000 akkumulierten <sup>125</sup>IUdR-Zerfällen pro Zelle erreichten die 86HG-39-Zellen ein OTM von 3,1 und die T1-Zellen ein OTM von 2,4.



**Abbildung 40**

Comet Assay nach Akkumulation der <sup>125</sup>IUdR-Zerfälle in T1- und 86HG-39-Zellen bei -196°C

### 3.3.3 Hydroxylapatit-Chromatographie nach Doppelmarkierung

Zunächst wurde bei der HA-Chromatographie der Einfluß von FUdR und CdR untersucht. T1- und 86HG-39-Monolayer wurden für 24 h mit <sup>3</sup>H-TdR (für die Markierung) sowie 10<sup>-8</sup>M oder 10<sup>-6</sup>M FUdR und CdR inkubiert, wobei das Medium einmal gewechselt wurde. Anschließend wurden mit der HA-Chromatographie die ds-DNA-Fractionen bestimmt. Es zeigte sich, daß die DNA beider Zelllinien durch den Zusatz von 10<sup>-6</sup>M FUdR und CdR stark geschädigt wurde, da der ds-DNA-Anteil auf unter 50% reduziert wurde (Tab. 7). Die Konzentration von 10<sup>-8</sup>M FUdR und CdR bewirkte bei den T1-Zellen keine durch HA-Chromatographie messbare DNA-Schädigung (die ds-DNA-Fraktion stieg vielmehr an), rief jedoch bei den 86HG-39-Zellen eine Abweichung von der Kontrolle ohne Zusätze um

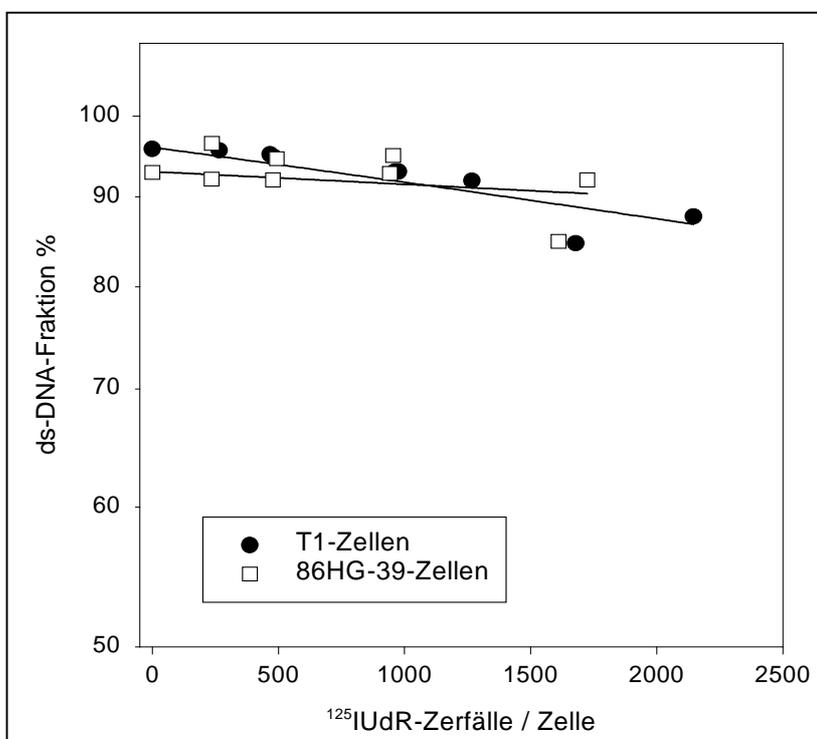
25% hervor. Ein Anteil von mindestens 75,4% ungeschädigter DNA als Ausgangswert für die Bestrahlungsversuche wurde akzeptiert.

**Tabelle 7**

ds-DNA-Fractionen nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit FUdR und CdR

	<i>T1-Zellen</i>	<i>86HG-39-Zellen</i>
<b>Kontrolle ohne Zusätze</b>	85,7%	90,6%
<b>10<sup>-8</sup>M FUdR/CdR</b>	91,4%	75,4%
<b>10<sup>-6</sup>M FUdR/CdR</b>	49,4%	37,0%

Mittels HA-Chromatographie wurde zusätzlich zum Comet Assay eine Analyse der DNA-Strangbrüche nach <sup>125</sup>IUdR-Exposition (24 h Doppelmarkierung mit <sup>125</sup>IUdR und <sup>3</sup>H-TdR sowie 10<sup>-8</sup>M FUdR/ CdR, mit einfachem Mediumwechsel) durchgeführt. Die ds-DNA-Fraktion, als Maß der unversehrten DNA, nahm mit zunehmender <sup>125</sup>IUdR-Zerfallszahl bei beiden Zelllinien leicht ab (Abb. 41). Sie sank durchschnittlich bei den T1-Zellen von 96% (Kontrolle) auf 88% (bei 2200 d/c) und bei den 86HG-39-Zellen von 93% (Kontrolle) auf 90% (bei 1700 d/c).



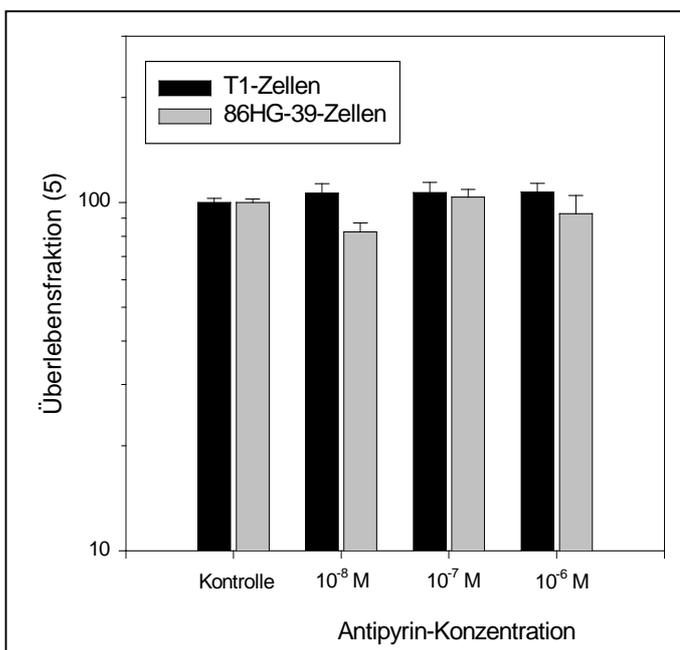
**Abbildung 41**

HA-Chromatographie nach <sup>125</sup>IUdR-Inkorporation in T1- und 86HG-39-Zellen

### 3.4 <sup>125</sup>I-Antipyrin

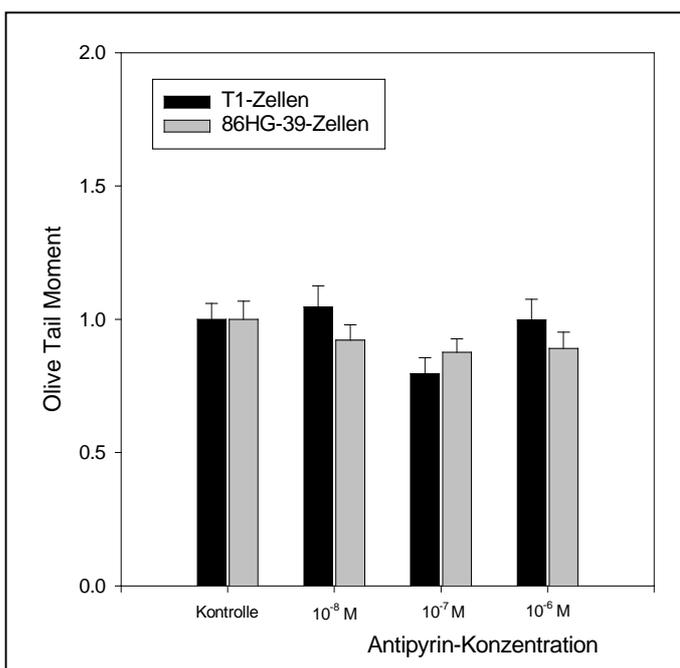
#### 3.4.1 Effekte durch nicht-radioaktives Antipyrin

Es wurde untersucht, ob sich durch bestimmte Konzentrationen an nicht-radioaktivem Antipyrin ein zellulärer Schaden bei T1- oder 86HG-39-Zellen ergeben würde. Da bei den radioaktiven <sup>125</sup>I-AP-Versuchen eine maximale Konzentration von  $5 \times 10^{-7}$  M Antipyrin vorlag, wurden Zellsuspensionen entsprechend mit  $10^{-8}$  M -  $10^{-6}$  M Antipyrin für 28 h in Leighton-Kulturröhrchen inkubiert und anschließend der Koloniebildungstest und der Comet Assay durchgeführt.



**Abbildung 42**

Koloniebildungstest nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit verschiedenen Antipyrin-Konzentrationen (n = 3; ± SE)



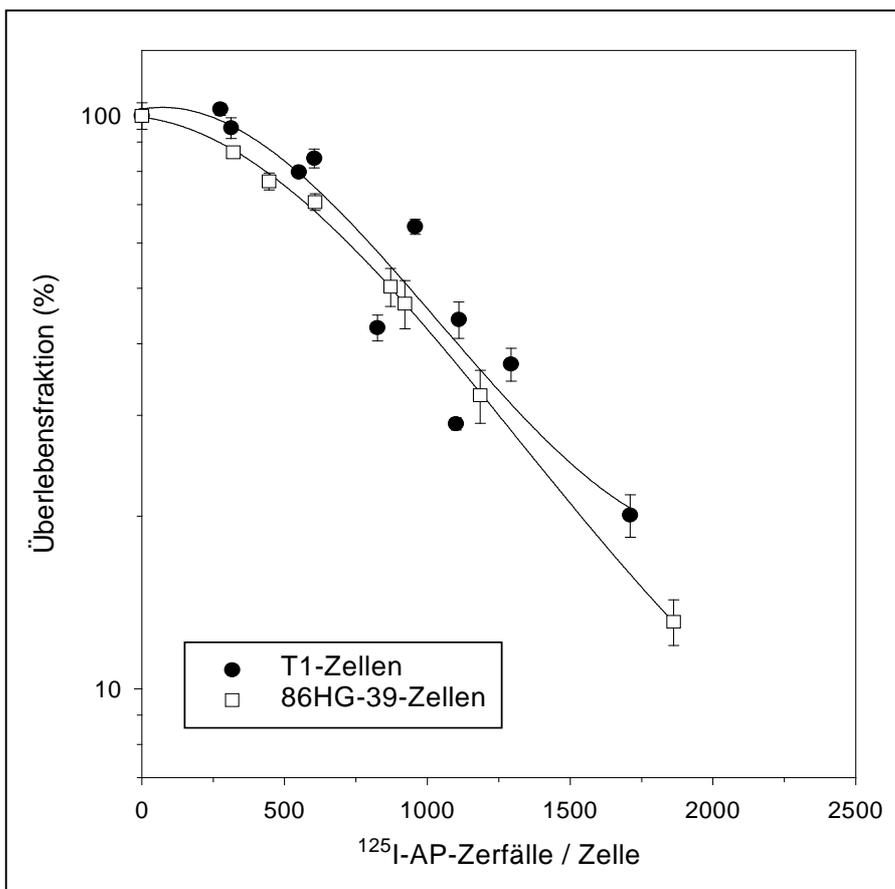
**Abbildung 43**

Comet Assay nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit verschiedenen Antipyrin-Konzentrationen (n = 200; ± SE)

Sowohl im Koloniebildungstest als auch im Comet Assay lagen bei Exposition der Zellen mit  $10^{-8}$  -  $10^{-6}$ M Antipyrin kaum Abweichungen von den Werten der Kontrollen vor, die mit Medium ohne Zusätze inkubiert worden waren (Abb. 42+43). Bis auf eine Ausnahme (bei Exposition der T1-Zellen mit  $10^{-7}$ M Antipyrin lag das OTM niedriger als die Kontrolle) waren die Abweichungen nicht signifikant. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine zytotoxische Wirkung des Antipyrins für die in den radioaktiven Versuchen benutzten chemischen Konzentrationen ausgeschlossen werden.

### 3.4.2 Effekte nach $^{125}\text{I}$ -AP-Exposition

Bei den  $^{125}\text{I}$ -AP-Expositionen mußten hohe Aktivitäten (mehrere MBq) eingesetzt werden, um eine mit den  $^{125}\text{IUdR}$ -Versuchen vergleichbare Anzahl an Zerfällen pro Zelle zu erreichen. Die Zellen wurden in diesem Fall nicht als Monolayer, sondern als Suspension mit verschiedenen radioaktiven Konzentrationen für 28 h inkubiert, damit das frei diffundierende  $^{125}\text{I}$ -AP die Zellen von allen Seiten durchdringen konnte.

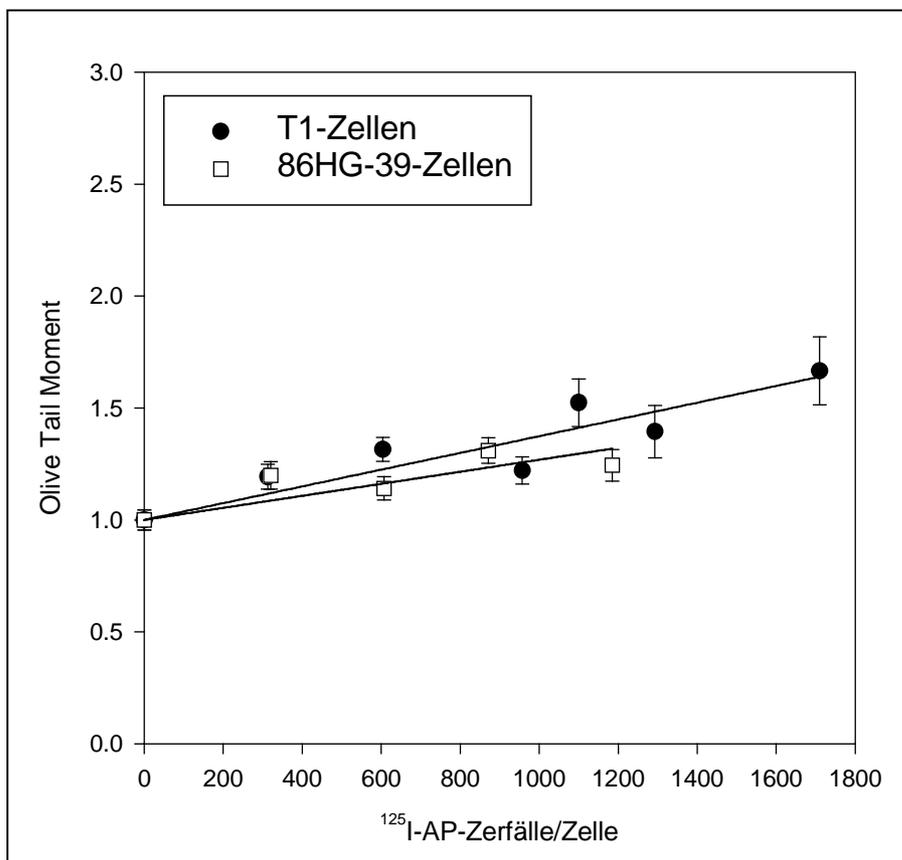


**Abbildung 44**

Überlebenskurven nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit  $^{125}\text{I}$ -AP (n=3;  $\pm$  SE)

Der Koloniebildungstest resultierte bei beiden Zelllinien in schulterförmige Überlebenskurven, die Niedrig-LET-Kurven ähnelten (Abb. 44). Die T1-Zellen wiesen eine etwas ausgeprägtere Schulter auf als die 86HG-39-Zellen, und insgesamt verliefen die Kurven beinahe parallel. Der  $D_{37}$ -Wert lag bei T1-Zellen mit 1160 d/c etwas höher als bei 86HG-39-Zellen mit 1130 d/c, die sich somit leicht radiosensitiver nach  $^{125}\text{I}$ -AP-Exposition zeigten.

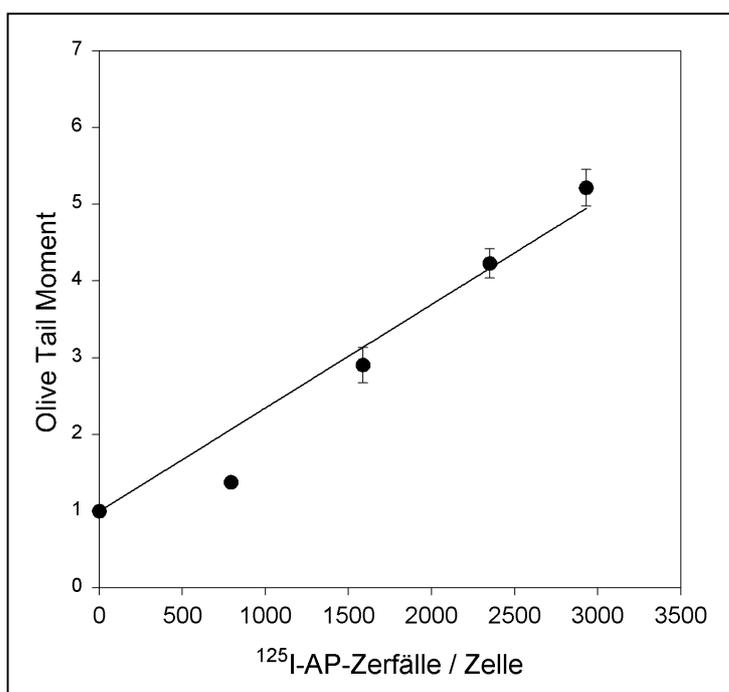
Die Ergebnisse des Comet Assays zeigten sowohl bei den T1- als auch bei den 86HG-39-Zellen einen leichten, linearen Anstieg der OTM-Funktionen mit zunehmenden  $^{125}\text{I}$ -AP-Zerfällen pro Zelle (Abb. 45). Die DNA-Schädigung fiel insgesamt bei den T1-Zellen geringfügig stärker aus als bei den 86HG-39-Zellen, da bei 1000 d/c die T1-Zellen durchschnittlich ein OTM von 1,37 erreichten und die 86HG-39-Zellen ein OTM von 1,28.



**Abbildung 45**

Comet Assay nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit  $^{125}\text{I}$ -AP (n = 200;  $\pm$  SE)

Ähnlich wie beim  $^{125}\text{IUdR}$  wurde bei der  $^{125}\text{I}$ -AP-Exposition am Beispiel der T1-Zellen eine Akkumulation der Zerfälle auf Eis ( $0^\circ\text{C}$ ) durchgeführt. Unter diesen Temperaturbedingungen fiel der Anstieg der OTM-Funktion beim Comet Assay deutlich höher aus als nach einer Inkubation bei physiologischer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  (Abb. 46). Bei 1000 d/c ergab sich ein mittlerer OTM-Wert von 1,9.



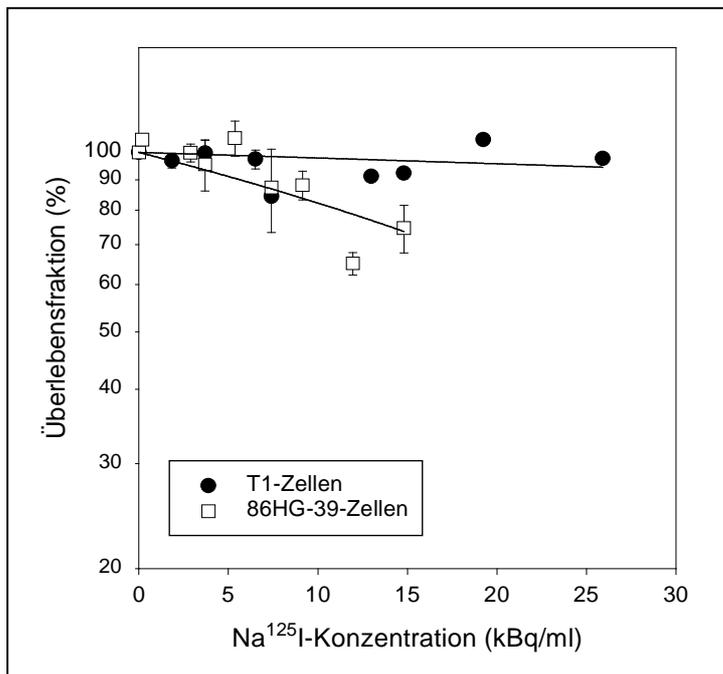
**Abbildung 46**  
Comet Assay nach  $^{125}\text{I}$ -AP-Exposition der T1-Zellen auf Eis (n = 100-200;  $\pm$  SE)

### 3.5 $\text{Na}^{125}\text{I}$

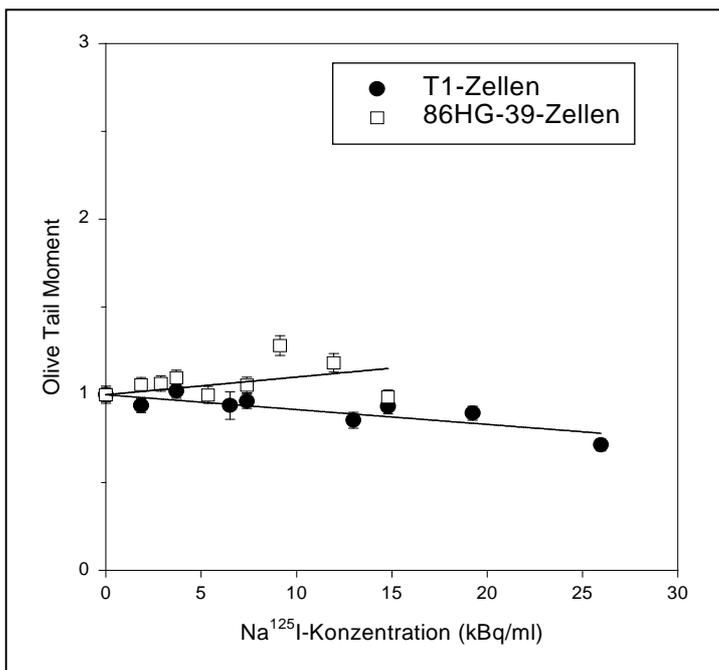
#### 3.5.1 30 h-Exposition mit Mediumwechsel

Für einen direkten Vergleich mit  $^{125}\text{IUdR}$  wurden die T1- und 86HG-39-Monolayer mit extrazellulärem  $\text{Na}^{125}\text{I}$  nach dem Schema der  $^{125}\text{IUdR}$ -Versuche und vergleichbaren Aktivitäten exponiert. Dies schloß eine 30-stündige Inkubation mit zweifachem Mediumwechsel ein. Anschließend wurden der Koloniebildungstest und der Comet Assay durchgeführt. Da  $\text{Na}^{125}\text{I}$  nicht durch die Zellmembranen eindringen konnte, wurde die Aktivität anstelle von Zerfällen pro Zelle als radioaktive Konzentration im Medium (Bq/ml) angegeben.

Während die Überlebensfraktion der T1-Zellen mit ansteigender  $\text{Na}^{125}\text{I}$ -Konzentration auf einem Niveau von 90 - 100% verblieb, sank die Überlebensfraktion der 86HG-39-Zellen bis zu höchsten radioaktiven Konzentration von 15 kBq/ml auf durchschnittlich 75% (Abb. 47). Dieser Abfall der 86HG-39-Überlebenskurve war, im Gegensatz zu den unveränderten Überlebensfraktionen der T1-Zellen, signifikant.

**Abbildung 47**

Überlebenskurven nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit Na<sup>125</sup>I für 30 h (n = 3; ± SE)

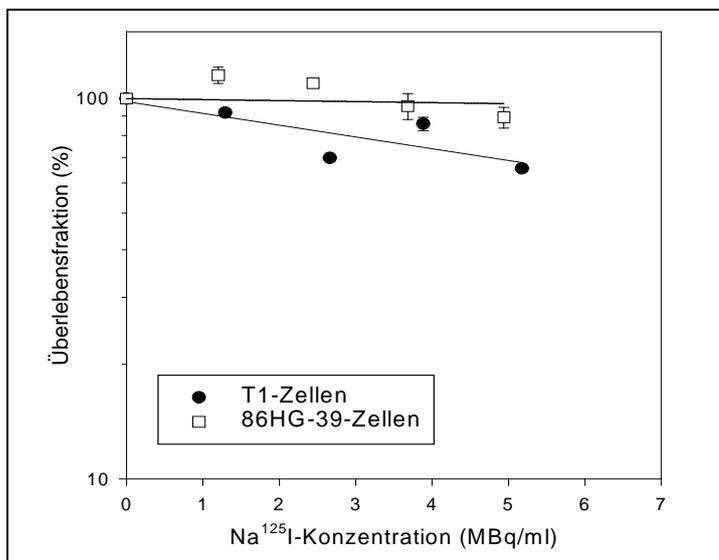
**Abbildung 48**

Comet Assay nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit Na<sup>125</sup>I für 30 h (n = 200; ± SE)

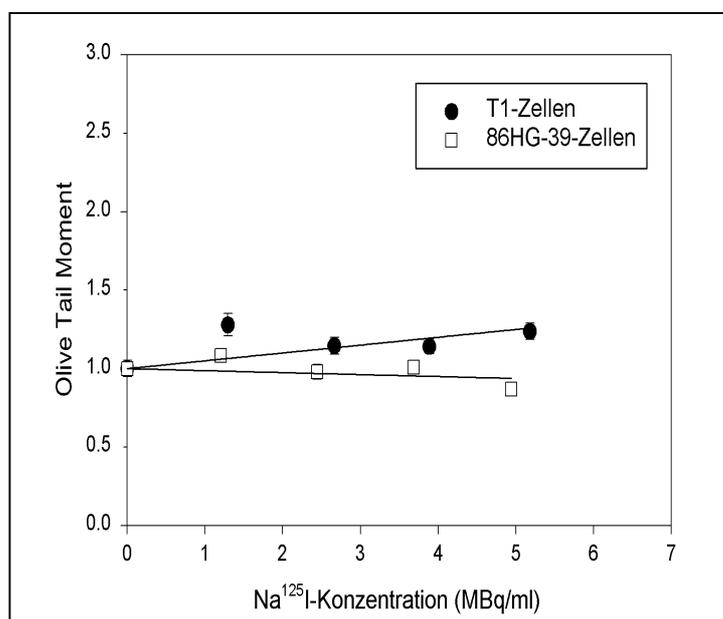
Parallel zum Koloniebildungstest stieg ebenfalls die mit dem Comet Assay gemessene DNA-Schädigung der 86HG-39-Zellen leicht mit zunehmender radioaktiver Konzentration an (Abb. 48). Die Unterschiede zur Kontrolle waren überwiegend nicht signifikant. Bei der höchsten radioaktiven Na<sup>125</sup>I-Konzentration (15 kBq/ml) lag ein OTM von durchschnittlich 1,15 vor. Die T1-Zellen zeigten im Comet Assay bei ansteigenden Na<sup>125</sup>I-Konzentrationen keine signifikanten Veränderungen zum Kontrollwert. Die lineare OTM-Funktion der T1-Zellen schwächte sich stattdessen geringfügig ab.

### 3.5.2 28 h-Exposition ohne Mediumwechsel

Um die Wirkung von  $\text{Na}^{125}\text{I}$  auf die Zellen mit  $^{125}\text{I}$ -AP vergleichen zu können, wurde eine  $\text{Na}^{125}\text{I}$ -Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen nach dem Schema der  $^{125}\text{I}$ -AP-Versuche mit entsprechend hohen Aktivitäten durchgeführt. Zellsuspensionen wurden für 28 h in Leighton-Kulturröhrchen mit verschiedenen Konzentrationen an  $\text{Na}^{125}\text{I}$  inkubiert. Die Überlebensfraktionen der 86HG-39-Zellen, die sich im Vergleich zum Kontrollwert nicht signifikant veränderten, zeigten eine leichte Abwärtstendenz (Abb. 49). Die Überlebenskurve der T1-Zellen fiel dagegen bis zur höchsten Konzentration (5,2 MBq  $\text{Na}^{125}\text{I}$ / ml) auf 65% ab. Im Comet Assay zeigten sich bei den 86HG-39-Zellen keine signifikanten Änderungen zur Kontrolle, während bei T1-Zellen ein leichter Anstieg des OTM in Abhängigkeit von der  $\text{Na}^{125}\text{I}$ -Konzentration gefunden wurde (Abb. 50). Bei 5,2 MBq  $\text{Na}^{125}\text{I}$ /ml ergab sich bei den T1-Zellen ein OTM von 1,24.



**Abbildung 49**  
Überlebenskurven nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit  $\text{Na}^{125}\text{I}$  für 28 h  
(n = 3;  $\pm$  SE)



**Abbildung 50**  
Comet Assay nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit  $\text{Na}^{125}\text{I}$  für 28 h  
(n = 200;  $\pm$  SE)

### 3.6 Korrelation zwischen Koloniebildungstest und Comet Assay

Um den zellulären Gesamtschaden (untersucht mit dem Koloniebildungstest) zum molekularen DNA-Schaden der Zelle (gemessen mit dem Comet Assay) in Beziehung zu setzen, wurden Überlebensfraktionen und OTM-Werte korreliert. Da die Ergebnisse in Form intervallskalierter Meßwerte vorlagen, wurde in der Korrelationsanalyse der Pearson'sche Maßkorrelationskoeffizient  $r$  berechnet. Dieser setzte einen linearen Zusammenhang der Funktion voraus (Köhler et al., 1992), so daß die Überlebensfraktionen logarithmiert werden mußten ( $SF_2 = \ln SF_1$ ). Für jede Zelllinie und Strahlenart bzw. Trägermolekül wurden die Koeffizienten und deren Irrtumswahrscheinlichkeiten berechnet (Tab. 8).

Bei  $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Strahlung wurde eine starke und nach  $^{125}\text{IUdR}$ - sowie  $^{125}\text{I-AP}$ -Exposition eine gute Korrelation gefunden (s. Bewertungskriterien). Aufgrund einer zu geringen Anzahl von Datenpaaren ( $n = 5$ ) war die Korrelation bei  $^{125}\text{I-AP}$  nicht signifikant. Bei  $\text{Na}^{125}\text{I}$  lag, bis auf eine Ausnahme (86HG-39-Zellen nach 28 h  $\text{Na}^{125}\text{I}$ -Exposition, nicht signifikant), nur eine schwache oder keine Korrelation vor, wobei sich sowohl nach 30 h als auch nach 28 h Exposition bei beiden Zelllinien keine Signifikanzen ergaben.

**Tabelle 8**

Korrelationsanalyse zwischen Koloniebildungstest und Comet Assay (mit Pearson'schem Maßkorrelationskoeffizient  $r$  und Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ )

	T1-Zellen	86HG-39-Zellen	Anzahl der Datenpaare	Bewertung
$^{137}\text{Cs-}\gamma$	$r = -0,998$ ( $\alpha \leq 1,63 \times 10^{-10}$ )	$r = -0,984$ ( $\alpha \leq 1,09 \times 10^{-5}$ )	10 bzw. 8	starke negative Korrelation
$^{125}\text{IUdR}$ (37°C)	$r = -0,748$ ( $\alpha \leq 3,28 \times 10^{-3}$ )	$r = -0,775$ ( $\alpha \leq 1,87 \times 10^{-3}$ )	13	gute negative Korrelation
$^{125}\text{I-AP}$ (37°C)	$r = -0,745$ ( $\alpha \leq 0,149$ )	$r = -0,724$ ( $\alpha \leq 0,167$ )	5	gute negative Korrelation, keine Signifikanz!
$\text{Na}^{125}\text{I}$	30 h	$r = -0,0144$ ( $\alpha \leq 0,971$ )	9	keine Korrelation, keine Signifikanz
	28 h	$r = -0,442$ ( $\alpha \leq 0,456$ )	5	schwache bis gute Korrelation, keine Signifikanz

Bewertungskriterien:  $r = 1$  ideale Korrelation,  $r = 0,8 - 0,99$  starke Korrelation,  $r = 0,5 - 0,8$  gute Korrelation,  $r = 0,3 - 0,5$  schwache Korrelation,  $r < 0,3$  keine Korrelation.

## 4 Diskussion

### 4.4 Biologische Endpunkte nach $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung

#### 4.4.1 Acetylcholinesterase-Test

Obwohl sich die Untersuchungen zellulärer Strahlenschäden v.a. auf die DNA fokussierten, sind auch an Membranen strahleninduzierte Effekte wie die Veränderung von Oberflächenladungen und Transportmechanismen, sowie die Peroxidation ungesättigter Fettsäuren nachgewiesen worden (Edwards et al., 1984). Hinsichtlich der Membranproteine wurde u.a. eine Wirkung auf die Funktion von Rezeptorproteinen und die Aktivität membrangebundener Enzyme festgestellt (Köteles, 1979). Zu den membrangebundenen Enzymen zählt neben der  $\text{NAD}^+$ -Glycohydrolase, ATP-ase und Adenylatcyclase auch die spezifische Acetylcholinesterase (AChE).

Die spezifische AChE, die als Schlüsselenzym im cholinergen Nervensystem gilt, findet sich im Zentralnervensystem, in neuromuskulären Synapsen und außerhalb des Nervensystems hauptsächlich als Bestandteil der Zellmembran von Erythrozyten. Sie wird von der im Serum vorkommenden unspezifischen Cholinesterase unterschieden. In den Erythrozyten, deren Membranen sehr häufig untersucht wurden, ist die spezifische AChE, wie andere Glykoproteine auch, über eine Glycosylphosphatidylinositol (GPI) -Kette in der Membran verankert. Dieser GPI-Anker kann eine asymmetrische oder eine globuläre Form ( $G_n$ ) haben, wobei letztere noch in löslich ( $_1$ ) und unlöslich ( $_2$ ) unterteilt wird. Bei humanen Erythrozyten wurde eine  $G_2$ -Form des GPI-Ankers nachgewiesen (Roberts und Rosenberry, 1985), die nur mit speziellen Proteasen gespalten werden kann. Welche Funktion der AChE in den Erythrozyten zukommt, ist bislang ungeklärt; mit 0,01% des Proteingehalts humaner Erythrozytenmembranen liegt ihr Gehalt in diesen Zellen jedoch relativ hoch (Rosenberry et al., 1990).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung humaner T1- und 86HG-39-Zellen zu einem Ablösen des GPI-Ankers der membrangebundenen AChE führt und eine erhöhte Aktivität im überstehenden, serumfreien Medium gemessen werden kann. Palecz und Leyko (1983) fanden z.B. bei isolierten humanen Erythrozytenmembranen eine ansteigende AChE-Aktivität nach  $\gamma$ -Bestrahlung bis 30 Gy. Zwischen 30 und 100 Gy sank die Aktivität dann wieder auf den Kontrollwert ab, um ab 100 Gy deutlich darunter zu fallen. Die Autoren schlossen daraus, daß bei Bestrahlung bis zu 30 Gy ein Ablösen des Enzyms und ab 100 Gy eine Inaktivierung erfolgt. In der vorliegenden Arbeit konnte ein solches Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden, da bei beiden Zelllinien keine Dosisabhängigkeit der AChE-Aktivität bei 1 - 30 Gy festgestellt werden konnte und kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen auftrat (vgl. 3.2.2). Es sollte jedoch erwähnt

werden, daß isolierte Membranen, wie sie bei Palecz und Leyko (1983) verwendet wurden, nachweislich radiosensitiver als lebende Zellen sind (Kong, 1981). Es wurde in dieser Arbeit ein Unterschied zwischen den Zelllinien deutlich, da die 86HG-39-Zellen dreifach stärkere Aktivitätsraten (ca. 3  $\mu\text{Mol/ min x g Protein}$ ) als die T1-Zellen aufwiesen (ca. 1  $\mu\text{Mol/ min x g Protein}$ , vgl. Abb. 23).

Möglicherweise war der Enzymgehalt in beiden Zelllinien zu gering, um signifikante Strahlenwirkungen feststellen zu können. Zudem war die Form und Untereinheit der AChE in T1- und 86HG-39-Zellen nicht bekannt. Es wurde im Hinblick auf die Blutzellen ein globulärer GPI-Anker vermutet. Spindler-Barth (1991) bewies die Festigkeit des globulären GPI-Ankers der AChE von nicht-neuronalen Epithelzellen, der nicht mit Heparin oder Kollagenase, sondern ausschließlich mit Phospholipase C zu zerstören war.

Es ist fraglich, ob in dem Dosisbereich von 1 - 30 Gy eine Wirkung auf die AChE eintreten konnte, da Effekte auf Zellmembranen in anderen Studien erst bei sehr viel höheren Dosen nachgewiesen wurden. Cividalli (1963) konnte einen exzessiven Verlust an Kaliumionen bei humanen Erythrozyten nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit 100 - 400 Gy messen. Shapiro und Kollman (1968) fanden einen Anstieg der Natriumionen in humanen Erythrozyten aufgrund einer veränderten Membranfluidität nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit 20 - 150 Gy, und Konings und Drijver (1979) verfolgten Lipidperoxidationen an Leberzellmembranen Vitamin E-defizienter Mäuse nach Bestrahlung mit 30 und 60 Gy. Im Gegensatz dazu wies Stegemann (1992) im Niedrig-Dosisbereich von 0,1 - 1,0 Gy eine Dosisabhängigkeit der Aktivität membrangebundener AChE in Knochenmarkzellen von Mäusen nach.

Die Aktivität der AChE scheint somit stark vom Gehalt, der molekularen Form und der Bindung des Enzyms abzuhängen, die wiederum gewebespezifisch sind. In den Membranen von T1- und 86HG-39-Zellen ist der Gehalt dieses Enzyms entweder zu niedrig, um signifikante Differenzen zur Kontrolle nach Bestrahlung nachweisen zu können, oder der in diesen Zellen vorkommende GPI-Anker ist durch eine Dosis bis zu 30 Gy nicht zu beschädigen, so daß keine Aktivitätsänderung der AChE im Medium gemessen werden konnte. Eine Inaktivierung der AChE in diesem Dosisbereich wurde nicht erwartet, da eine Studie an isolierter Rinder-AChE erst ab 300 Gy  $\gamma$ -Strahlung eine Inaktivierung des Enzyms zeigte (Nayar und Srinivasan, 1975). Dem steht entgegen, daß bei T1-Zellen im Überstandmedium eine Reduktion der Enzymaktivität der AChE nach Bestrahlung mit schweren Teilchen ( $^{11}\text{Boron-Partikel}$ ) nachgewiesen wurde (Sharan et al., 1999).

### 4.1.2 Koloniebildungstest

Nach Photonenbestrahlung ergeben sich üblicherweise Niedrig-LET-Überlebenskurven mit einer anfänglichen Schulter und einem nachfolgenden linearen Abschnitt (Puck und Marcus, 1956). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der Überlebenskurven der T1- und 86HG-39-Zellen nach Bestrahlung mit  $^{137}\text{Cs-}\gamma$  nachvollzogen werden, da beide Zelllinien in monoton abfallende Kurven mit Schulterbereich resultierten (vgl. Abb. 24, 3.2.3). Die T1-Zellen zeigten sich im Vergleich zu 86HG-39-Zellen etwas radiosensitiver ( $D_0$ -Werte: 0,9 Gy bei T1-Zellen und 1,2 Gy bei 86HG-39-Zellen). Diese Ergebnisse stimmen gut mit *in vitro* -Experimenten der Literatur überein, von denen nur einige erwähnt werden sollen: Sakai und Okada (1984) fanden für V79-Hamsterzellen und L5178Y- Mausezellen nach Bestrahlung mit 230 kV-Röntgenstrahlen  $D_0$ -Werte von 1,8 bzw. 0,9 Gy. Einen breiten Vergleich von Kennzahlen aus Überlebenskurven stellten Deschavanne und Fertil (1996) auf, die Überlebenskurven von knapp 700 Zelllinien nach Photonenbestrahlung verglichen. Humane Glioblastomzellen hatten beispielsweise einen durchschnittlichen SF 2- Wert von 58%, was den 86HG-39-Zellen in dieser Arbeit mit einem SF 2 von 51% sehr nahe kommt.

Überlebenskurven werden mit unterschiedlichen mathematischen Modellen beschrieben, von denen zwei besonders relevant sind. Das Multi-Target-Modell geht in der Treffertheorie davon aus, daß es in jeder Zelle zwei oder mehr Ziele gibt, die jeweils durch einen Einzeltreffer inaktiviert werden (s. z.B. Hall, 1994). Erst wenn eine bestimmte Anzahl dieser Ziele getroffen wurde, kommt es zum Zelltod. Dieses Modell berücksichtigt die unterschiedlichen Steigungen im anfänglichen Schulterbereich und im nachfolgenden linearen Teil der Kurve. Beim Linear-Quadratischen (LQ)-Modell wird angenommen, daß die Lethalität durch Strahlung auf zwei Komponenten beruht (s. Alpen, 1990). Die eine Komponente ist proportional zur Dosis (Anfangsneigung) und die andere proportional zum Quadrat der Dosis (Kurvenkrümmung), wobei die Kurve sich kontinuierlich weiter neigt. In dieser Arbeit trifft für die T1-Zellen und für die 86HG-39-Zellen das Multi-Target Modell zu, da beide Kurven nach anfänglicher Schulter (Akkumulation der Schäden) im hohen Dosisbereich linear bis in die 5. Dekade verlaufen.

### 4.1.3 Comet Assay

Östling und Johanson (1984) entwickelten eine Technik, mit der DNA-Schäden einzelner Zellen durch Einbetten in Agarose, Lysieren und elektrophoretischer Auftrennung der zurückbleibenden Zellkerne gemessen werden konnten. Singh et al. (1988) modifizierten diese Methode durch alkalische Versuchsbedingungen bei Lyse und Unwinding, wodurch die Sensitivität erhöht wurde. Der Comet Assay gewann rasch an Bedeutung, da sein

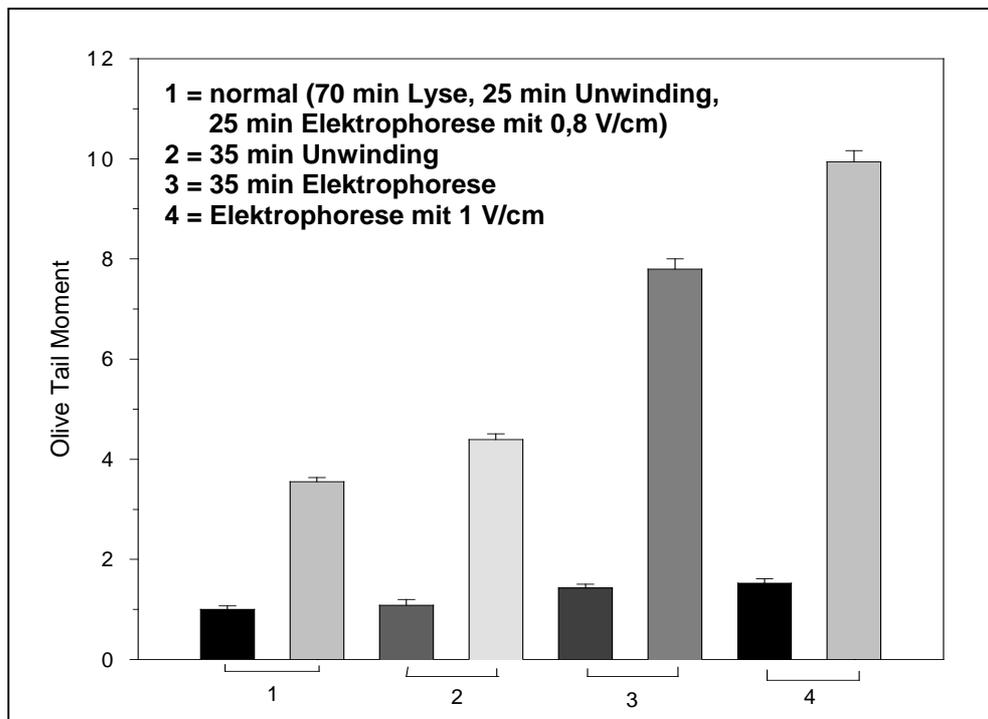
Vorteil in der schnellen Analyse von Einzelzellen liegt, die mit einer hohen Stichprobenanzahl bei geringem methodischen Aufwand durchgeführt werden kann. Es wird grundsätzlich zwischen der alkalischen Form des Comet Assays, mit der hauptsächlich ESB nachgewiesen werden, und der neutralen Version unterschieden, die ab ca. 5 Gy vor allem DSB mißt (Olive, 1999). Durch die alkalischen Bedingungen (Lyse bei pH 10 und Unwinding bei pH >12) wird eine Denaturierung des Chromatins erreicht, die durch Auftrennung der Basenpaare bis zur Separation einzelner DNA-Stränge führt. Die durch Strahlung erzeugten alkali-labilen Läsionen werden unter alkalischen Bedingungen als Strangbrüche offengelegt. So können entstandene einzelsträngige DNA-Fragmente während der Elektrophorese in Richtung Anode wandern (Klaude, 1996). Beim neutralen Comet Assay fällt das Unwinding weg, und die Lyse erfolgt bei pH < 10.

In der vorliegenden Arbeit wurde die alkalische Form des Comet Assays (modifiziert nach Singh et al., 1988) gewählt, um auch im niedrigen Dosisbereich von 1 - 5 Gy möglichst sensitiv DNA-Schädigungen messen zu können. Eine Unterscheidung zwischen ESB und DSB ist im Grunde nicht möglich, da auch DSB im alkalischen Comet Assay zu einer Erhöhung des OTM führen. Dennoch wird geschätzt, daß mit dem alkalischen Comet Assay zu 95% ESB gemessen werden und der Anteil der DSB nur 5% beträgt (Olive, 1999). Ein indirekter Nachweis kann durch zeitabhängige Reparaturstudien geführt werden, da für die Reparatur von ESB nur wenige Minuten benötigt werden, die Reparatur von DSB dagegen wesentlich länger dauert und im Bereich von ca. 2 h liegt (Schneeweiss et al., 1987). In dieser Arbeit wurde mit dem alkalischen Comet Assay bei T1- und 86HG-39-Zellen innerhalb von 5 Minuten eine Reparatur von über 60% der DNA-Schäden gefunden, was die Annahme unterstützt, daß vorwiegend ESB gemessen wurden (vgl. Abb. 27, 3.2.4).

Viele Labors haben eigene Versuchsvorschriften für die Durchführung des Comet Assays entwickelt, die sowohl zellspezifisch als auch dem Ziel angepaßt sind. Daher treten Unterschiede auf:

- bei der Präparation der Objektträger bezüglich der Agarosekonzentration und der Anzahl der Agaroseschichten,
- bei der Lyse bezüglich des pH-Wertes, der Dauer und Temperatur sowie der Zusammensetzung der Lösung,
- bei dem Unwinding der DNA bezüglich Dauer und Temperatur,
- bei der Elektrophorese bezüglich pH-Wert, Zusammensetzung des Puffers, der Dauer und der angelegten Spannung,
- bei der Wahl des Fluoreszenzfarbstoffs und der verwendeten Konzentration sowie
- bei der Auswertung hinsichtlich der Wahl der Software und der Parameter.

Ausführliche Übersichten über die verschiedenen veröffentlichten Modifikationen des Comet Assays geben die Arbeiten von McKelvey-Martin et al. (1993), Fairbairn et al. (1995) und Olive (1999).



**Abbildung 51**

Comet Assay mit T1-Zellen (jeweils Kontrolle und mit 4 Gy bestrahlte Probe) nach methodischen Modifikationen (n = 200;  $\pm$  SE)

In der vorliegenden Arbeit ist der Einfluß methodischer Modifikationen auf die Quantifizierung der DNA-Schädigung untersucht worden, indem die Dauer des alkalischen DNA-Unwindings und der Elektrophorese verlängert sowie die Spannung während der Elektrophorese erhöht wurde (Abb. 51). Es wurden stets eine Kontrolle und eine mit 4 Gy bestrahlte Probe untersucht und verglichen. Den deutlichsten Unterschied ergab die Erhöhung der Elektrophoresespannung mit einem Faktor von 9,9. Bei der Wahl der in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen wurde ein Ausgleich zwischen der Sensitivität in niedrigen und hohen Dosisbereichen vorgenommen, da es bei hohen Dosen zu Sättigungserscheinungen kommen kann.

Es gibt bis heute keinen einheitlichen Parameter zur Quantifizierung der DNA-Schäden, die mit dem Comet Assay gemessen werden. Häufig werden die Schweiflänge (Tail length), der Anteil der DNA im Schweif (% Tail DNA), das Produkt aus diesen beiden Größen, bekannt als OTM (Olive Tail Moment), und das Verhältnis der DNA-Anteile in Schweif und Kopf (Tail/ Head ratio) verwendet. Bei der Schweiflänge kann es bei

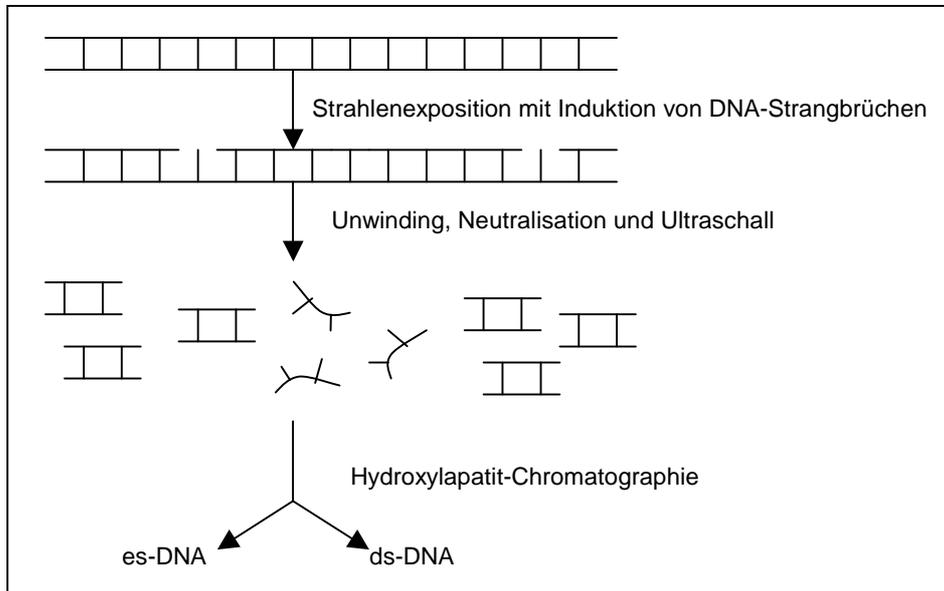
stärkeren Schäden zu einer schnellen Sättigung kommen, die v.a. von den elektrophoretischen Bedingungen abhängt (Fairbairn, 1995). Das OTM hingegen mißt mit seinen zwei Komponenten sowohl die Wanderungsstrecke der DNA-Fragmente, die durch die Größe der Fragmente beeinflusst wird, als auch die Fluoreszenzintensität im Schweif, die den Anteil der DNA-Fragmente im Schweif wiedergibt. Je stärker die Schädigung, desto länger die zurückgelegte Strecke und desto mehr Fragmente wandern in den Schweif. Das OTM ist kaum anfällig für eine Sättigung

Die Vergleichsmöglichkeiten zwischen den Comet Assay-Ergebnissen, die in dieser Arbeit erzielt wurden, und anderen Studien sind aufgrund vielfältiger Unterschiede in der Durchführung und der benutzten Parameter begrenzt. Am ehesten kommen die Resultate von Olive et al. (1990) in Frage, die V79-Hamsterzellen mit Röntgenstrahlen (5 - 20 Gy) exponierten und einen alkalischen Comet Assay durchführten. Die Darstellung der Werte in Form des OTM ergab eine linear mit der Dosis ansteigende Funktion, wobei nach 10 Gy ein OTM von etwa 6,5 auftrat. Dieser Verlauf stimmt mit den T1- und 86HG-39-Zellen überein, da auch hier ein linear ansteigendes OTM mit zunehmender  $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Dosis gefunden wurde (vgl. Abb. 25, 3.2.4). Bei 10 Gy lagen die OTM-Werte allerdings mit 12,8 (T1-Zellen) und 8,1 (86HG-39-Zellen) höher. Ausnahmslos alle Kometen wiesen nach Bestrahlung mit  $^{137}\text{Cs-}\gamma$  einen ungefähr gleich langen Schweif auf und unterschieden sich von den inhomogenen Kometen nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition (vgl. Abb. 56, 4.2.2).

#### 4.1.4 Hydroxylapatit-Chromatographie

Eine weitere Methode zur Messung von DNA-Strangbrüchen stellt die HA-Chromatographie dar, die von Ahnström und Erixon (1973) beschrieben wurde. Anders als beim Comet Assay finden die Lyse der Zellen und das alkalische Unwinding der DNA hier in einem Schritt statt. Bei der Denaturierung beginnt die DNA an einer Bruchstelle sich in Einzelstränge aufzuteilen. In der Nähe des Bruches liegt die DNA dann einzelsträngig (es) vor, während sie in weiterer Entfernung noch unversehrt und doppelsträngig (ds) ist. Entscheidend bei der Alkalibehandlung sind neben dem pH-Wert Dauer- und Temperaturbedingungen, die für reproduzierbare Ergebnisse exakt eingehalten werden müssen. Die Alkalibehandlung wird durch Neutralisation gestoppt und die DNA durch die anschließende Ultraschallbehandlung in es- und ds-Fragmente zerteilt (Abb. 52). Diese Fragmente werden durch die HA-Chromatographie aufgetrennt, indem mit Phosphatpuffern ansteigender Molarität zuerst die es-DNA-Fraktion und später die ds-DNA-Fraktion eluiert wird. Die Quantifizierung wird durch eine  $^3\text{H-TdR}$ -Markierung der DNA möglich, die vor der Bestrahlung durchgeführt wird. Mit zunehmender

Bestrahlungsdosis kommt es zu einer ansteigenden DNA-Schädigung in Form von Strangbrüchen, die als abnehmender ds-DNA-Anteil gemessen wird.



### Abbildung 52

Schema zur Messung von DNA-Strangbrüchen mittels HA-Chromatographie (n. Ljungman, 1999)

Die Probenvorbereitung zur HA-Chromatographie birgt einige Schwierigkeiten. So wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst festgestellt, daß eine Alkalibehandlung von Monolayern, wie sie Dikomey (1982) als Standardmethode benutzte, zu einer stark inhomogenen Suspension der T1- und 86HG-39-Zellbestandteile führt. Die sichtbaren Ansammlungen von nicht vollständig lysierten Zellen konnten auch durch Ultraschall nicht aufgelöst werden und ließen ungenaue Meßergebnisse befürchten. Es wurde deshalb die Modifikation von Rydberg (1975) angewendet, indem 50 µl einer Zellsuspension mit  $5 \times 10^4$  Zellen in 1 ml Alkalilösung pipettiert wurden. Bei dieser Methode ergab sich nach 30 min bei 4°C eine homogene Lösung der lysierten T1- und 86HG-39-Zellen. Der pH-Wert spielt bei der Alkalibehandlung eine entscheidende Rolle, da in der vorliegenden Arbeit herausgefunden wurde, daß ein pH von 11,9 nur zu einem geringen meßbaren Schaden beispielsweise nach 4 Gy ( $^{137}\text{Cs}$ -γ-Strahlung) führte, während ein pH von 12,0 die Sensitivität deutlich an hob. Die Kontrollen lagen in beiden Fällen etwa gleich.

Rydberg (1975) wies außerdem nach, daß bei einer höheren Zahl als  $10^5$  Zellen/ml während der Neutralisation ein Gel entsteht, das durch Ultraschall wieder zerstört wird. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Der Autor hielt die Zugabe von SDS nach der Ultraschallbehandlung für notwendig, um eine Trennung der es- und ds-

DNA aufrecht zu erhalten. SDS schien dabei die Adsorptionskapazität von HA bezüglich der DNA-Bruchstücke nicht zu beeinflussen.

Ahnström und Erixon (1981) konnten an Hamsterzellen zeigen, dass die Alkalibehandlung von Monolayern oder Zellen in Suspension unterschiedliche Ergebnisse in der HA-Chromatographie verursacht. Sie fanden außerdem, daß der Kontrollwert der ds-DNA-Fraktion abhängig von der Zelllinie differiert. Die ds-DNA-Fraktion nahm linear mit ansteigender Röntgendosis ab, wobei sich nach 10 Gy Werte von 46 - 51% ergaben. In der vorliegenden Arbeit wurden nach 10 Gy  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung 58% ds-DNA-Fraktion bei den 86HG-39-Zellen und 24% bei den T1-Zellen gemessen. Rydberg (1975) fand dagegen nach Bestrahlung von Hamsterfibroblasten mit 10 Gy eine ds-DNA-Fraktion von ca. 13%. Bei Dikomey und Franzke (1986) fiel bei CHO-Hamsterzellen nach Röntgenbestrahlung der ds-DNA-Anteil von 90% (Kontrolle) auf 24% bei 10 Gy ab.

Die dosisabhängige Steigung der ds-DNA-Fraktion scheint also erheblich von der Zellart und der Durchführung der Alkali-Behandlung bzw. HA-Chromatographie beeinflusst zu sein. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen ds-DNA-Anteile der T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Exposition stimmen mit den Literaturwerten überein.

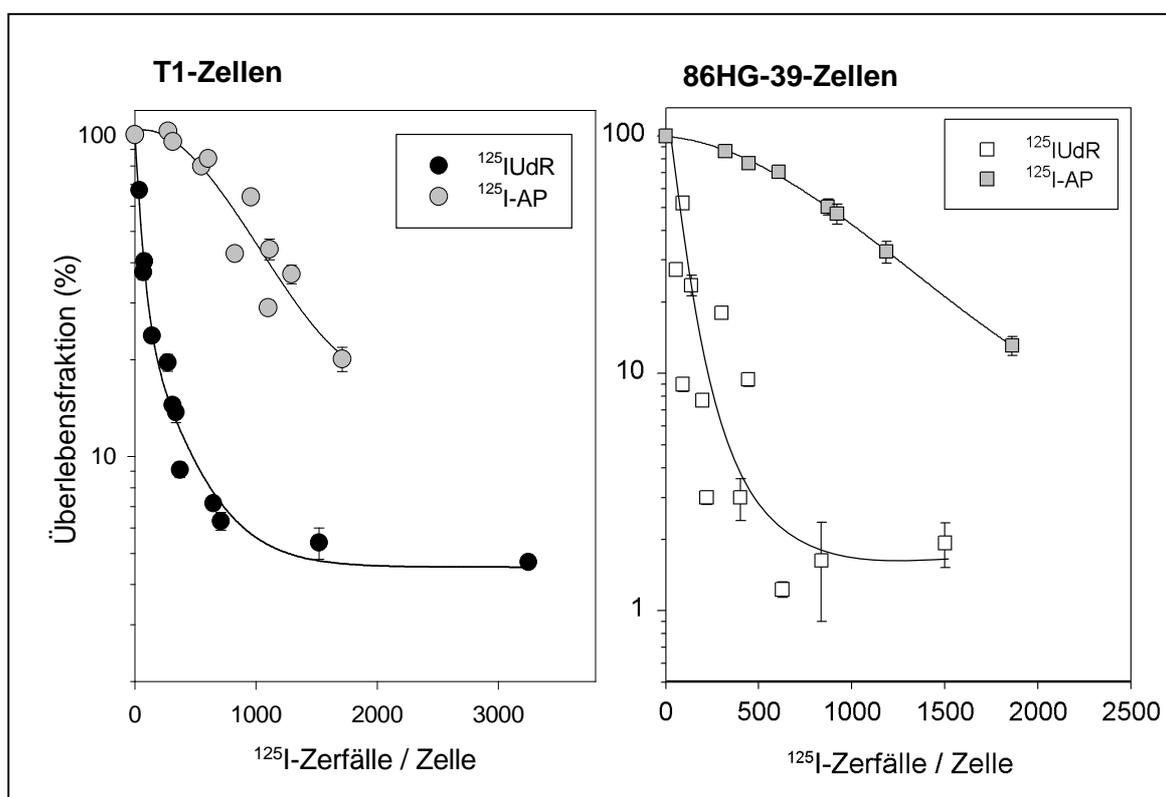
## **4.2 Vergleich der Trägermoleküle**

### **4.2.2 Koloniebildungstest nach $^{125}\text{IUdR}$ - und $^{125}\text{I-AP}$ -Exposition**

Da sowohl nach  $^{125}\text{IUdR}$ - als auch nach  $^{125}\text{I-AP}$ -Exposition die Zerfälle pro Zelle berechnet wurden, lassen sich die biologischen Endpunkte dieser beiden Trägermoleküle direkt vergleichen. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich bei beiden Zelllinien zunächst in der Form der Überlebenskurven, da sich steil abfallende  $^{125}\text{IUdR}$ -Funktionen mit anschließendem Tailing und  $^{125}\text{I-AP}$ -Schulterkurven gegenüberstehen (Abb. 53). Das Tailing trat mit reduziertem Anteil an überlebenden Zellen auch nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition für  $1\frac{1}{2}$  Verdopplungszeiten auf (vgl. Abb. 38, 3.3.2).

Das Tailing der  $^{125}\text{IUdR}$ -Kurve wurde bereits von anderen Autoren beschrieben, wobei es unabhängig von den Temperaturbedingungen während des Versuchs auftrat. In einer der wenigen Studien, in denen bei physiologischer Temperatur gearbeitet wurde, exponierten Bradley et al. (1975) LICH-Leberzellen mit  $^{125}\text{IUdR}$  für eine Verdopplungszeit bei  $37^\circ\text{C}$  und fanden eine Überlebenskurve mit konkaver Krümmung, die auf nicht- oder wenig- $^{125}\text{IUdR}$ -markierte Zellen zurückgeführt wurde. Der  $D_0$ -Wert betrug  $0,74\text{ mBq/Zelle}$  und lag, verglichen mit den umgerechneten  $D_{37}$ -Werten dieser Arbeit (T1-Zellen  $4,03\text{ mBq/Zelle}$ , 86HG-39-Zellen  $3,59\text{ mBq/Zelle}$ ) deutlich niedriger. Chan et al. (1976) führten die  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition von V79-Hamsterzellen ebenfalls bei  $37^\circ\text{C}$  durch und

fanden, allerdings ohne ein Tailing, einen  $D_{37}$ -Wert von 3,7 mBq/Zelle, der mit den T1- und 86HG-39-Zellen gut übereinstimmt. Ein Tailing von  $^{125}\text{IUdR}$ -Überlebenskurven wurde desweiteren in den Arbeiten von Liber et al. (1983) und Geselowitz et al. (1995) beschrieben, die eine Akkumulation der  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfälle bei  $-70$  und  $-196^\circ\text{C}$  durchführten. Sie machten wiederum eine niedrige Markierungsrate für diesen Effekt verantwortlich und nahmen an, daß einige Zellen kein  $^{125}\text{IUdR}$  inkorporiert hatten und dadurch überlebten.



**Abbildung 53**

Vergleich der Überlebenskurven von T1- und 86HG-39-Zellen nach 30h  $^{125}\text{IUdR}$ - und 28 h  $^{125}\text{I-AP}$ -Exposition ( $n = 3$ ;  $\pm$  SE).

Der Effekt von  $^{125}\text{IUdR}$  auf das Überleben von T1-Zellen ( $D_{37} = 90$  d/c) und 86HG-39-Zellen ( $D_{37} = 80$  d/c) würde im Vergleich zu Liber et al. (1983) mit einem  $D_0$ -Wert von 28 d/c schwächer ausfallen. Dies trifft auch für den Vergleich mit weiteren Veröffentlichungen zu, in denen  $D_0$ - bzw.  $D_{37}$ -Werte zwischen 36 d/c und 46 d/c ermittelt wurden (Burki et al, 1973; Miyazaki und Fujiwara, 1981; Walicka et al., 1998 b). Der bereits in einer früheren Studie mit T1-Zellen gefundene  $D_{37}$ -Wert von 91 d/c, sowohl bei gefrorenen Zellen als auch bei  $37^\circ\text{C}$  (Feinendegen, 1975), konnte mit der vorliegenden

Arbeit bestätigt werden. Die Ergebnisse stimmen zudem gut mit Ehrfeld et al. (1986) und Warters et al. (1977) überein, die  $D_0$ -Werte von 95 d/c und 100 d/c feststellten.

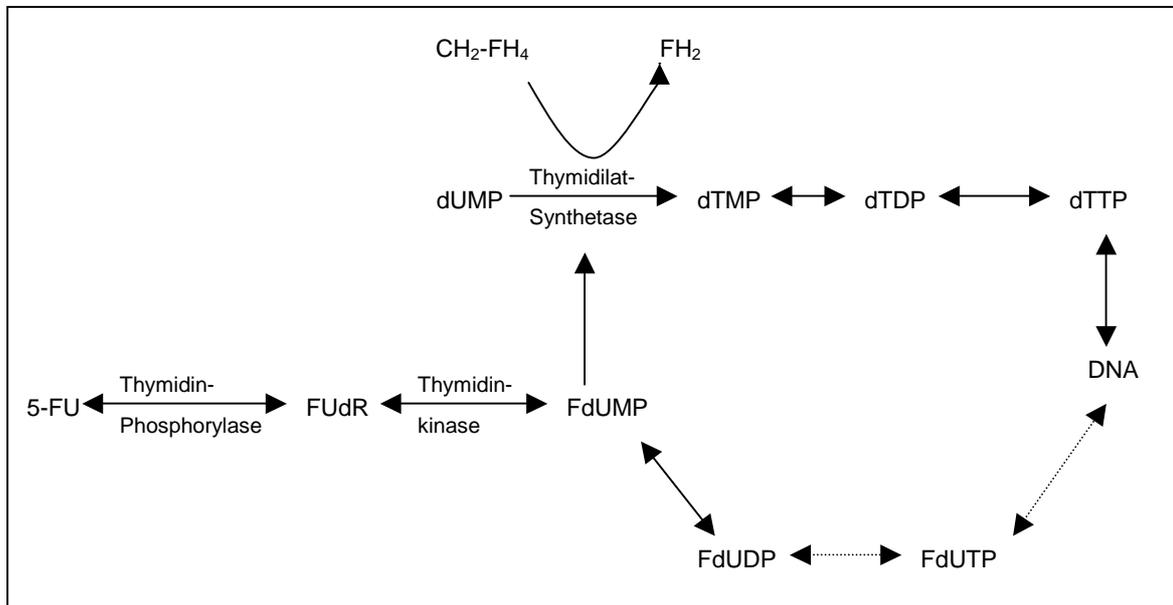
Es liegt eine Fülle experimenteller Daten vor, die aufgrund unterschiedlicher Zellen und Versuchsbedingungen differieren. Hofer und Bao (1985) sowie Hofer et al. (1996) zeigten beispielsweise, daß die  $D_0$ -Werte der  $^{125}\text{IUdR}$ -Überlebenskurven bei Akkumulation der Zerfälle vom Zeitpunkt des Einfrierens nach der Inkorporationsphase abhängig sind und Werte von 43 - 152 d/c vorkommen können.

Bezüglich des Tailings von T1- und 86HG-39-Zellen ist anzunehmen, daß eine inhomogene Inkorporation von  $^{125}\text{IUdR}$  vorliegt, da es sich um asynchrone Zellpopulationen handelte. In diesem Fall haben einige Zellen während der 30-stündigen Inkubation kein  $^{125}\text{IUdR}$  eingebaut und spiegeln sich in einem konstanten Anteil überlebender Zellen von 2 - 5% in der Überlebenskurve wieder. Gleichzeitig bauten bereits markierte Zellen weiterhin  $^{125}\text{IUdR}$  ein (Mehrfachinkorporation), so daß die Zerfallszahlen pro Zelle anstiegen, der Schädigungsgrad sich jedoch nicht weiter erhöhte. Es kann sich bei der konstanten Überlebensfraktion nur um Zellen handeln, die während der Dauer von 1 bzw.  $1\frac{1}{2}$  Verdopplungszeiten nicht in die S-Phase gelangt sind.

Es könnte eine Rolle spielen, daß IUdR, im Vergleich zu Thymidin, relativ langsam in die DNA inkorporiert wird. Dies ist *in vivo* von Baugnet-Mahieu und Goutier (1968) belegt worden, die eine niedrigere Inkorporationsrate von IUdR im Vergleich zu Thymidin in verschiedenen Rattengeweben fanden. Sie gingen davon aus, daß die existierenden Unterschiede beim Thymidin- und IUdR-Einbau vor allem in den Reaktions-Vorstufen begründet liegen. Bevor Thymidin oder Analoge wie IUdR in die DNA eingebaut werden, erfolgt eine Phosphorylierung bis zum Triphosphat. Beim IUdR kommt die Reaktion bereits in der ersten Stufe, also der Monophosphorylierung, beinahe zum Erliegen, während Thymidin dagegen sehr schnell zum Triphosphat umgebaut wird. Chemisch gesehen, könnte der langsame Einbau des IUdR mit der durch das Iod-Atom veränderten Molekülladung zu tun haben, so daß die Formation des Enzym-Substrat-Komplexes beeinflusst würde. Ein toxischer Effekt durch IUdR, das in Konzentrationen ab  $10^{-4}\text{M}$  wachstumshemmend wirkt (Morris und Cramer, 1965), kann ausgeschlossen werden, da in der vorliegenden Arbeit weit geringere Konzentrationen von etwa  $10^{-12}\text{M}$  verwendet wurden.

Ein auffälliges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, daß ohne den Zusatz von FUdR (und CdR zur Komplettierung der Basen) die  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation nur minimal war und daß durch ein Austauschen des Mediums die radioaktive Aufnahme erneut gesteigert werden konnte. Dies wird in keiner anderen *in vitro* Studie beschrieben. Obwohl Miyazaki und

Fujiwara (1981)  $10^{-6}$ M FUdR während der Inkubation mit  $^{125}$ IUdR dem Medium zusetzten, gaben sie keine Begründung oder Erläuterung zum Einfluß auf die zelluläre Aufnahme.



**Abbildung 54**

Teil des FU/-FUdR-Metablismus und Mechanismus in der Zelle (Isacoff und Borud, 1997)

Fluoropyrimidine wie FUdR und 5-Fluorouracil (5-FU) werden seit über 30 Jahren erfolgreich bei der Behandlung von Dickdarmkrebs eingesetzt (Isacoff und Borud, 1997). Obwohl FUdR effektiver wirkt, wird hauptsächlich 5-FU aufgrund seiner geringeren Toxizität verwendet (Van Laar et al., 1998). FUdR ist das Desoxyribonukleosid-Derivat von 5-FU und agiert im Zellorganismus zu einem geringen Anteil als Vorstufe des 5-FU (Abb. 54). Seine Wirkung beruht vor allem auf der Hemmung der Thymidilatsynthetase (TS) über die Zwischenstufe Fluorodesoxyuridin-Monophosphat (FdUMP). FdUMP hemmt die TS, indem es mit dem Enzym und seinem Co-Substrat  $\text{CH}_2\text{-FH}_4$  (Methylen-Tetrahydrofolat) einen stabilen 3er-Komplex bildet. Voraussetzung ist allerdings ein ausreichend vorhandenes Co-Substrat, da sonst das FdUMP wieder vom Enzym dissoziiert. Durch die Hemmung der TS durch FUdR wurde das zugesetzte  $^{125}$ IUdR im Medium verstärkt in die DNA der T1- und 86HG-39-Zellen inkorporiert.

FUdR wirkt in höheren Konzentrationen toxisch. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit in Vorversuchen an T1- und 86HG-39-Zellen bestätigt. Yoshioka et al. (1987) konnten nachweisen, daß FUdR eine zelluläre Wachstumshemmung verursacht, die mit zunehmender Inkubationszeit ansteigt. Bei gleichzeitiger Gabe von Thymidin, konnte die toxische Wirkung jedoch vollständig aufgehoben werden. Eine Abschwächung des

toxischen Effektes bei gleichzeitigem Angebot einer weiteren Base (wie z.B. IUdR) konnte auch bei T1- und 86HG-39-Zellen festgestellt werden. Die verwendete Konzentration von  $10^{-8}$ M hatte dagegen nur einen geringen Einfluß auf die biologischen Endpunkte.

Kassis et al. (1987 b) konnten bei einer Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  eine zelluläre  $^{125}\text{IUdR}$ -Aufnahme belegen, die direkt proportional zur Konzentration und Zeit verlief. Ersteres kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, letzteres jedoch nicht (vgl. 3.3.1). Warum die Inkorporation von  $^{125}\text{IUdR}$  nach 8-10 h in eine Sättigung lief, aber nach einem kompletten Austauschen des radioaktiven Mediums von neuem einsetzte, kann nur vermutet werden. Möglicherweise wurde das FUdR in dieser Zeit aufgebraucht, so daß die TS-Hemmung abnahm. Der inhibitorische Prozeß setzte dann bei einem erneuten Angebot an FUdR wieder ein.

*In vivo* ist eine Steigerung der zellulären Aufnahme von radioaktiv-markiertem IUdR durch Einsatz von TS-Hemmern bereits angewendet worden. So konnten Mester et al. (1996) bei Mäusen mit Brustkrebs durch die gleichzeitige Gabe von 5-FU eine 3-5-fach erhöhte Inkorporation von  $^{125}\text{IUdR}$  in die Tumor-DNA nachweisen. Dies wurde auch von Mariani et al. (1996) festgestellt, die Patienten mit Kolonkrebs und Lebermetastasen gleichzeitig mit  $^{123}\text{IUdR}$  und 5-FU behandelten und eine Steigerung der Aufnahme um 72% fanden.

**Tabelle 9**

$D_{37}$ -Werte der Überlebenskurven nach  $^{125}\text{IUdR}$ - und  $^{125}\text{I-AP}$ -Exposition

Trägermolekül	T1-Zellen	86HG-39-Zellen
$^{125}\text{IUdR}$	90 d/c	80 d/c
$^{125}\text{I-AP}$	1160 d/c	1130 d/c

Die Gegenüberstellung von  $^{125}\text{IUdR}$ - und  $^{125}\text{I-AP}$  anhand der  $D_{37}$ -Werte zeigt eine deutlich stärkere radiotoxische Wirkung des  $^{125}\text{IUdR}$  sowohl bei den T1- als auch bei den 86HG-39-Zellen (Tab. 9). Dieser Effekt wurde ebenfalls von Bloomer et al. (1981) gefunden, die als einzige Arbeitsgruppe die  $^{125}\text{IUdR}$ - und  $^{125}\text{I-AP}$ -Wirkungen nach Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  verglichen, jedoch keine Zerfälle pro Zelle berechneten. Die  $D_{37}$ -Werte der untersuchten Brustkrebszellen lagen für  $^{125}\text{IUdR}$  bei  $0,03 \text{ kBq/ml}$  ( $8 \times 10^{-4} \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ ) und für  $^{125}\text{I-AP}$  bei  $2,5 \times 10^3 \text{ kBq/ml}$  ( $68 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ ) bezogen auf die radioaktive Konzentration im Medium, wobei sich bei beiden Trägermolekülen lineare Überlebenskurven vom Hoch-LET-Typ ergaben. In der vorliegenden Arbeit wäre dagegen aufgrund des Tailings beim  $^{125}\text{IUdR}$  ein Schnittpunkt beider Kurven bei ca. 3000 d/c vorstellbar, so daß bei einer kombinierten

Anwendung beider Trägermoleküle auch die konstante Fraktion überlebender Zellen der  $^{125}\text{IUdR}$ -Kurve mitgetroffen würde.

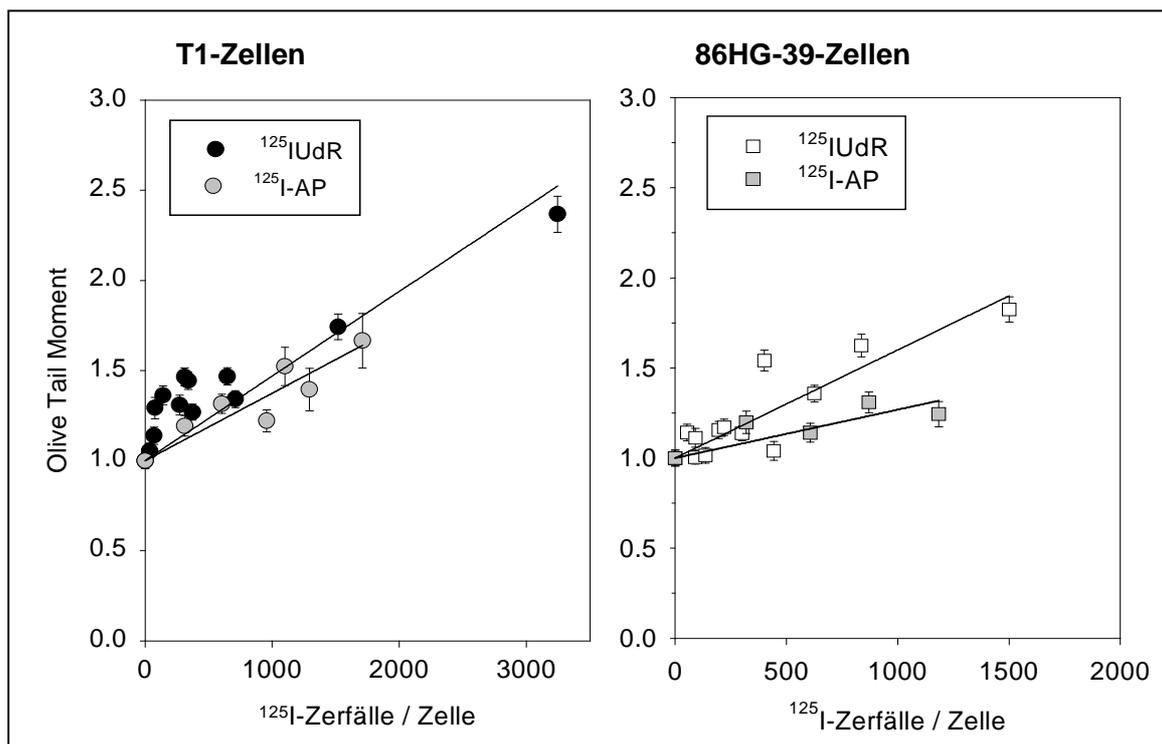
Sedelnikowa et al. (1998) exponierten humane Fibrosarkomzellen u.a. mit  $^{125}\text{I-AP}$  und  $^{125}\text{IUdR}$  und akkumulierten die Zerfälle bei  $-70^\circ\text{C}$ . Die  $D_{37}$ -Werte ihrer Hoch-LET-Kurve lagen bei 30 d/c für  $^{125}\text{IUdR}$  und  $0,49 \text{ d}/\mu\text{m}^3$  für  $^{125}\text{I-AP}$ . Letzteres liegt im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit genau zwischen den T1-Zellen (umgerechnet  $0,38 \text{ d}/\mu\text{m}^3$ ) und den 86HG-39-Zellen ( $0,64 \text{ d}/\mu\text{m}^3$ ). Die Ergebnisse stimmen auch mit Miyazaki und Shinohara (1993) überein, die an synchronisierten Maus-Leukämiezellen nach  $^{125}\text{I-AP}$ -Exposition einen  $D_0$ -Wert von  $0,39 \text{ d}/\mu\text{m}^3$  feststellten. Dagegen fanden Commerford et al. (1980), die  $^{125}\text{I-AP}$  mit  $^{125}\text{I-Albumin}$  und  $^{55}\text{Fe-Transferrin}$  verglichen, bei Knochenmarkzellen von Mäusen einen deutlich niedrigeren  $D_0$ -Wert von  $0,17 \text{ d}/\mu\text{m}^3$ .

Im Gegensatz zu den genannten Studien wurden in der vorliegenden Arbeit unter physiologischen Bedingungen Schulterkurven beim klonogenen Überleben nach  $^{125}\text{I-AP}$ -Exposition gefunden, die Niedrig-LET-Strahlung ähneln. Dies führt zu der Interpretation, daß  $^{125}\text{I-AP}$  durch die gleichmäßige Verteilung in der gesamten Zelle eine annähernd homogene Strahlenwirkung erzielt, wobei sich bei geringer Zerfallszahl kleinere Läsionen offensichtlich erst ansammeln müssen (Schulterbereich), um den Schaden messen zu können.  $^{125}\text{IUdR}$ , das direkt in der DNA zerfällt, wirkt sehr viel radiotoxischer als  $^{125}\text{I-AP}$ , das in gewissem Abstand zur DNA zerfällt. Die Wirkung des  $^{125}\text{I}$  hängt demnach entscheidend von der Nähe des Zerfallsortes zur DNA ab. Zu dieser Schlußfolgerung kamen auch Adelstein und Kassis (1996) sowie Kassis et al. (1999), die die  $^{125}\text{I-AP}$ -Wirkung an Plasmiden mit  $^{125}\text{I-Hoechst 33342}$  (lockere DNA-Bindung; „minor groove binding“) und  $^{125}\text{I-Acridin}$  (interkalierend) verglichen. Die Plasmide wurden einer Strangbruchmessung unterzogen, wobei nachgewiesen wurde, daß bei einer lockeren DNA-Bindung die  $^{125}\text{I}$ -Wirkung am größten war. Während  $^{125}\text{I-AP}$  genauso viele ESB produzierte wie  $^{125}\text{I-Hoechst}$ , lag die Zahl der DSB 5-fach niedriger. Die Autoren waren ebenfalls der Ansicht, daß ein Vergleich von  $^{125}\text{I-AP}$  mit  $\gamma$ -Strahlung aufgrund der homogenen Verteilung möglich ist.

#### 4.2.2 Comet Assay nach $^{125}\text{IUdR}$ - und $^{125}\text{I-AP}$ -Exposition

Die mit dem Comet Assay gemessenen DNA-Schädigungen nach  $^{125}\text{IUdR}$ - und  $^{125}\text{I-AP}$ -Exposition wurden ebenfalls gegenübergestellt, wobei sich sowohl bei T1- als auch bei 86HG-Zellen etwas stärkere Steigungen der OTM-Funktionen nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition zeigten (Abb. 55). Bisher wurde erst eine Studie veröffentlicht, die  $^{125}\text{IUdR}$ -induzierte DNA-Schäden mit dem Comet Assay bestimmte: Olive und Banáth (1993) benutzten den neutralen Comet Assay, um mögliche DSB u.a. nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition bei V79-

Hamsterzellen nachzuweisen. Nach Akkumulation der  $^{125}\text{I}$ -Zerfälle bei  $-196^\circ\text{C}$  konnten sie eine lineare OTM-Funktion in Abhängigkeit der Zerfälle pro Zelle aufstellen. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist jedoch nicht möglich, da durch den neutralen Comet Assay eine vollkommen andere Methodik und Zielrichtung zugrunde lag. Für  $^{125}\text{I}$ -AP liegen keine veröffentlichten Comet Assay-Daten vor.



**Abbildung 55**  
Vergleich der OTM-Funktionen von T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{125}\text{I}$ UdR- und  $^{125}\text{I}$ -AP-Exposition (n = 200;  $\pm$  SE).

**Tabelle 10**  
Vergleich der OTM-Werte bei 1000 d/c nach  $^{125}\text{I}$ UdR- und  $^{125}\text{I}$ -AP-Exposition

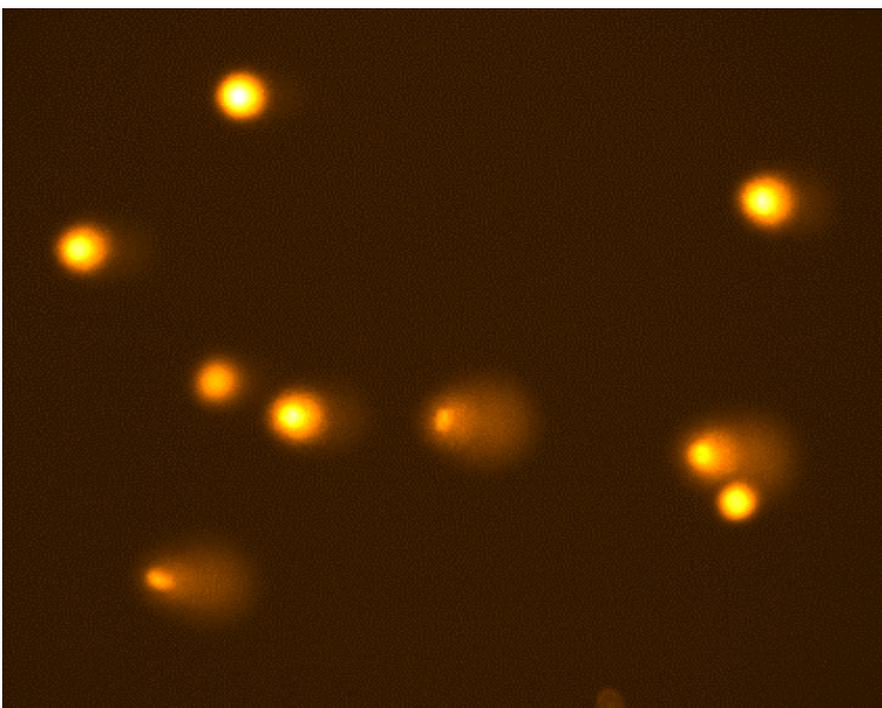
Trägermolekül	T1-Zellen	86HG-39-Zellen
$^{125}\text{I}$ UdR	1,47	1,58
$^{125}\text{I}$ -AP	1,37	1,28
<b>Faktor (<math>^{125}\text{I}</math>UdR/<math>^{125}\text{I}</math>-AP)</b>	1,07	1,23

Die OTM-Werte bei 1000 d/c demonstrieren im Vergleich der beiden  $^{125}\text{I}$ -markierten Trägermoleküle eine um den Faktor 1,1 - 1,2 stärkere Wirkung des  $^{125}\text{I}$ UdR (Tab. 10). Bezüglich der Radiosensitivität wurden nach  $^{125}\text{I}$ UdR-Exposition etwas höhere DNA-

Schädigungen bei den 86HG-39-Zellen nachgewiesen, während nach  $^{125}\text{I}$ -AP-Exposition die T1-Zellen die empfindlichere Zelllinie waren.

Der unabhängig von der Zelllinie auftretende, verhältnismäßig geringe Anstieg der OTM-Funktionen nach  $^{125}\text{IUdR}$ - und  $^{125}\text{I}$ -AP-Exposition ist, ebenso wie die Streuung der OTM-Werte im Anfangsbereich der  $^{125}\text{IUdR}$ -Kurven, erklärungsbedürftig. Es ist anzunehmen, daß mehrere Effekte eine Rolle spielen, die nachfolgend erläutert werden.

#### 1. Besonderheiten der $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation



#### **Abbildung 56**

Aufnahme von 86HG-39-Kometen nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition und Akkumulation der Zerfälle bei  $-196^\circ\text{C}$

Es liegt in erster Linie ein Einfluß durch die bereits bei den Überlebenskurven angesprochene inhomogene Inkorporation von  $^{125}\text{IUdR}$  in die Zellen vor.  $^{125}\text{IUdR}$  wird offensichtlich von der asynchronen Zellpopulation ungleichmäßig aufgenommen, so daß einige Zellen wenig bis viel vom radioaktiven Thymidinanalogon in die DNA einbauen, andere jedoch gar nichts. Diese Interpretation wurde durch den Comet Assay möglich, der eine individuelle Analyse von Einzel-Zellen erlaubte. Die inhomogene  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation läßt sich anhand mikroskopischer Aufnahmen von Kometen veranschaulichen, in denen ungeschädigte und geschädigte DNA direkt nebeneinanderliegen (Abb. 56). Zusätzlich wurden Häufigkeitsverteilungen der OTM-Werte in Gruppen vorgenommen (die Mittelwerte sind in Abb. 25, 3.2.4 und Abb. 37, 3.3.2 grafisch dargestellt). OTM-Werte  $\leq 1,1$  (Mittelwert der Kontrollen + 10%) wurden als

ungeschädigte DNA angesehen und in der ersten Gruppe zusammengefaßt. Dazu muß angemerkt werden, daß aufgrund der starken alkalischen Versuchsbedingungen beim Comet Assay stets eine leichte Schädigung der Zellen vorlag und das OTM selten gleich Null war, sondern meist zwischen 0 und 1 lag. Die zweite Gruppe enthielt mit OTM-Werten von 1,1 - 2,0 Kometen mit schwach geschädigter DNA. Die weiteren Gruppeneinteilungen erfolgten in einem etwas weitgefäßteren OTM-Abstand. Doppelzählungen wurden vermieden.

Mit zunehmender Bestrahlungsdosis bzw.  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfällen verschieben sich die Anteile in den Gruppen diagonal zu höheren OTM-Werten (Tab. 11-13). Beim Vergleich von  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung mit  $^{125}\text{IUdR}$  liegen bei Photonenstrahlung ab 4 Gy keine Anteile mehr in den ersten zwei Gruppen vor (Tab. 11), während sie nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition auch bei hohen Zerfallszahlen erhalten bleiben (Tab. 12+13). Es ergibt sich bei T1-Zellen ein konstanter Anteil von 3% ungeschädigter DNA und bei 86HG-39-Zellen von ca. 8%. Diese ungeschädigten Anteile stellen nicht- $^{125}\text{IUdR}$ -markierte DNA dar und liegen im Bereich der konstanten Überlebensfraktionen (vgl. 4.2.1).

**Tabelle 11**

Relative Häufigkeiten (%) der OTM-Werte nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung der T1- und 86HG-39-Zellen

OTM-Werte	T1-Zellen					86HG-39-Zellen				
	Ko	2 Gy	4 Gy	8 Gy	10 Gy	Ko	2 Gy	4 Gy	8 Gy	10 Gy
< 1,1	67,1	5,4	-	-	-	69,9	2,1	-	-	-
1,1-2	23,6	21,1	-	-	-	21,3	19,0	1,0	-	-
2-5	9,3	61,1	57,3	2,5	0,5	8,0	69,2	49,0	0,6	3,0
5-10	-	12,4	39,7	61,7	37,7	-	9,2	43,0	46,9	38,6
10-15	-	-	3,0	33,7	38,7	-	0,5	5,5	42,6	29,7
15-20	-	-	-	2,0	16,6	-	-	1,0	10,5	15,8
> 20	-	-	-	-	6,0	-	-	-	-	11,9

**Tabelle 12**

Relative Häufigkeiten (%) der OTM-Werte nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in T1-Zellen und Akkumulation der Zerfälle bei  $-196^\circ\text{C}$ :

OTM-Gruppen	d/c				
	Ko	803	1928	2935	3864
< 1,1	67,0	26,3	21,1	3,0	3,5
1,1-2	28,4	45,4	25,1	7,0	5,5
2-5	4,6	25,3	31,7	48,2	39,2
5-10	-	2,0	18,1	31,7	40,7
10-15	-	0,5	4,0	6,5	7,0
15-20	-	-	-	2,0	3,0
> 20	-	-	-	1,5	1,0

**Tabelle 13**

Relative Häufigkeiten (%) der OTM-Werte nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in 86HG-39-Zellen und Akkumulation der Zerfälle bei  $-196^\circ\text{C}$ :

OTM-Gruppen	d/c				
	Ko	453	1087	1655	2179
< 1	68,2	21,1	7,7	9,5	6,6
1-2	24,5	41,3	19,8	15,6	4,6
2-5	7,3	37,6	66,8	60,3	28,6
5-10	-	-	5,6	11,1	44,4
10-15	-	-	-	2,0	14,3
15-20	-	-	-	1,5	1,5
> 20	-	-	-	-	-

Bei molekularer Betrachtungsweise ist darüberhinaus der Einbau von  $^{125}\text{IUdR}$  in die DNA bezogen auf eine Einzelzelle inhomogen. Yasui et al. (1985) stellten fest, daß bei synchronisierten Zellen der Einbau von  $^{125}\text{IUdR}$  in den Zellkern sehr ungleichmäßig erfolgte. Sie vermuteten in einer späteren Studie nach Messung von DNA-Strangbrüchen, daß DNA-gebundenes  $^{125}\text{IUdR}$  eine Schädigung in Form von „Clusters“ verursacht (Yasui et al., 2000). Es wurde angenommen, daß ein lokal-multipler DNA-Schaden entsteht, wobei sich kurze Fragmente von 10 - 100 Basenpaarungen ergeben. Die Clusterbildung ist bereits bei Tisljar-Lentulis et al. (1987) erwähnt worden, die per „Fluorescence Analysis of DNA Unwinding“-Technik eine insgesamt geringere Anzahl an DNA-Strangbrüchen nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition verglichen mit Gammastrahlung bei Nieren-T1-Zellen fanden. Die Autoren merkten an, daß  $^{125}\text{IUdR}$  zwar mit einer hohen lokalen Energiedichte, jedoch äußerst inhomogen zerfällt, wodurch die Effektivität unterschätzt wird. So kann es sein, daß zwei oder mehrere  $^{125}\text{IUdR}$ -Moleküle direkt nebeneinander in die DNA eingebaut werden und bei der Strangbruchmessung ein geringerer Schaden festgestellt wird, als wenn sie gleichmäßig in die DNA inkorporiert und zerfallen wären, wodurch mehr Bruchstücke entstanden wären. Bezogen auf die vorliegende Arbeit ist diese Clusterbildung vor allem für die Streuung der Werte im Anfangsbereich der OTM-Funktion nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation verantwortlich. Sie ist offensichtlich auch ein Grund für die nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition gegenüber  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung vergleichsweise geringe DNA-Schädigung (vgl. 3.2.4).

## 2. Reparaturvorgänge

Durch die physiologische Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  treten zelluläre Reparaturvorgänge während der Strahlenexposition auf. DNA-Einzelstrangbrüche würden nach einer nachweislich schnellen Reparatur (vgl. Abb. 27, 3.2.4) zu niedrigen OTM-Werten beim

Comet Assay führen. Es wird daher angenommen, daß während der Inkubation mit  $^{125}\text{IUdR}$  oder  $^{125}\text{I-AP}$  bei  $37^\circ\text{C}$  parallel zur eintretenden DNA-Schädigung eine Reparatur stattfand, die in einen, verglichen mit  $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Strahlung, nur geringen Anstieg der OTM-Funktion resultierte. In früheren Studien wurde die lethale, radiotoxische Wirkung des  $^{125}\text{I}$  vor allem auf die effiziente Produktion von DSB bezogen (Martin 1977; Radford und Hodgson 1985). Aber auch DSB werden zu über 50% innerhalb der ersten 2-3 h repariert, wobei die Reparatur überwiegend fehlerhaft ist (Powell und McMillan, 1994; Frankenberg-Schwager, 1989). Ein sogenannter „Misrepair“ würde sich erst nach einiger Zeit, beispielsweise mit dem Koloniebildungstest, feststellen lassen, während er beim Comet Assay nicht messbar wäre. Diese Hypothese der Strangbruchreparatur wird dadurch unterstützt, daß bei einer Akkumulation sowohl der  $^{125}\text{IUdR}$ - als auch der  $^{125}\text{I-AP}$ -Zerfälle in T1- und 86HG-39-Zellen bei  $\leq 0^\circ\text{C}$  ein deutlich stärkerer Anstieg der OTM-Funktion gefunden wurde als nach Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  (Tab. 14).

**Tabelle 14**

Vergleich der OTM-Werte bei 1000 d/c in T1-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Temperaturen

	<b>37°C</b>	<b>0°C</b>	<b>Faktor</b>
<b><math>^{125}\text{IUdR}</math></b>	1,47	2,40	+ 1,63
<b><math>^{125}\text{I-AP}</math></b>	1,37	1,9	+ 1,39

### 3. Comet Assay-spezifische Phänomene

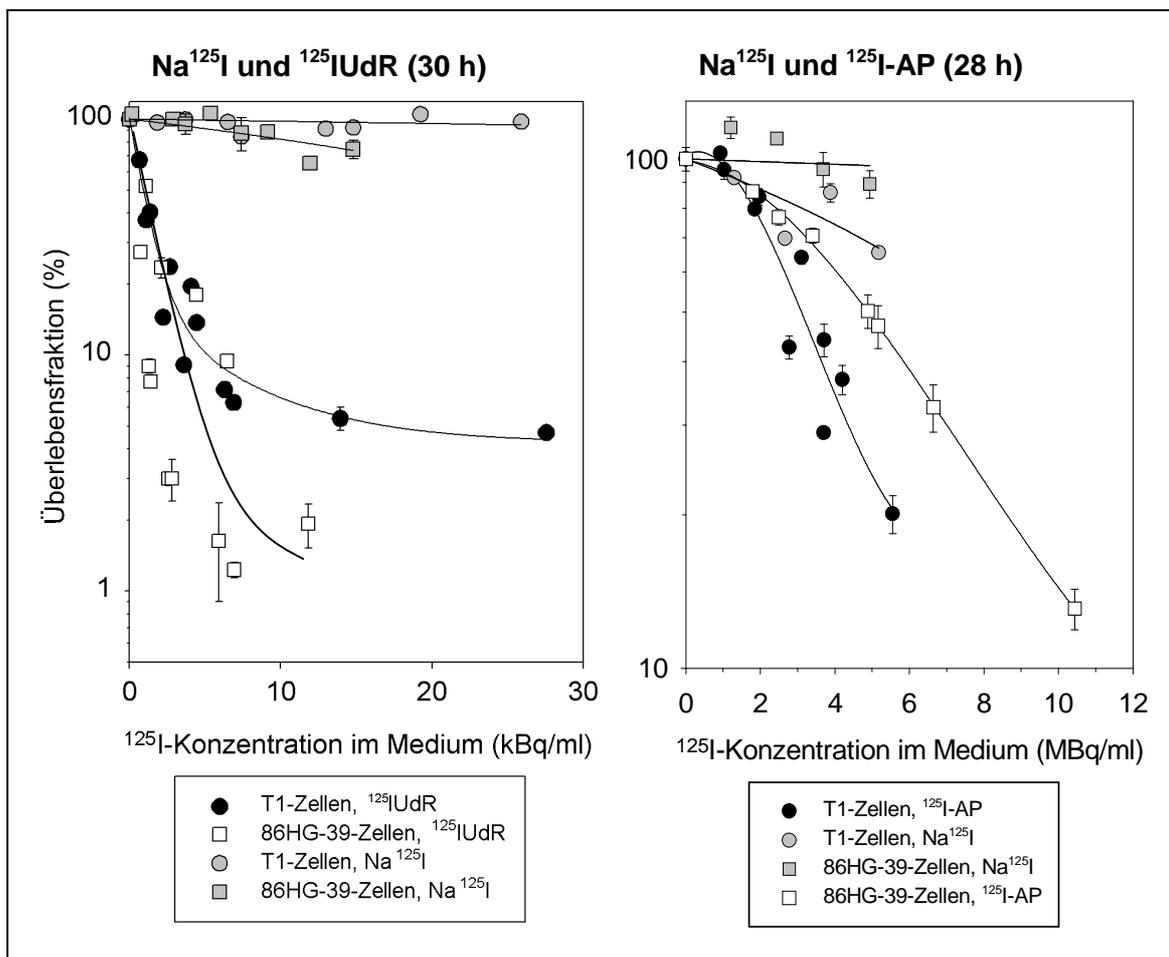
Da  $^{125}\text{IUdR}$  nur von proliferierenden Zellen eingebaut wird, wurden für diese Versuche Zellen der exponentiellen Wachstumsphase benutzt, die den größten Anteil an S-Phase-Zellen im Vergleich zu den anderen Wachstumsphasen aufwiesen (vgl. 3.1). Olive und Banáth (1993) zeigten jedoch anhand des neutralen Comet Assays, daß die durch Strahleneinwirkung erzeugten DNA-Strangbrüche, vor allem DSB, schwieriger in S-Phase-Zellen zu bestimmen waren, als in allen anderen Phasen des Zellzyklus. Die DNA von S-Phase-Zellen wanderte schlechter im elektrischen Feld, und es konnte nur eine geringe Schädigung festgestellt werden. Es wurde vermutet, daß Replikationsenzyme bei Zellen der frühen S-Phase nicht vollständig durch die Lyse entfernt wurden und Ansammlungen von Replikationsstrukturen entstanden waren, die, bedingt durch ihre Größe, nur eine geringe Wanderungsstrecke bei der Elektrophorese zurücklegten. Daraus resultierte eine geringere Sensitivität bei der Messung des OTM. Möglicherweise ist dieses Phänomen teilweise auf den alkalischen Comet Assay übertragbar. Generell müssen die Bedingungen für Lyse und DNA-Unwinding während des Comet Assays den

Zellen und dem erwarteten Schädigungsgrad angepaßt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Comet Assay mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung kalibriert und reproduzierbar gestaltet.

Die genannten multiplen Effekte spielen nicht nur beim Comet Assay, sondern auch bei der HA-Chromatographie eine Rolle. Im Vergleich zu  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung fiel hier ebenfalls die negative Steigung der ds-DNA-Fraktion äußerst schwach aus. Die beim Comet Assay angeführten Argumente der Besonderheiten der  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation und der Reparaturvorgänge können für die HA-Chromatographie gleichermaßen gelten. Bisher sind DNA-Strangbrüche nach  $^{125}\text{I}$ -Exposition erst in einer Studie mittels HA-Chromatographie gemessen worden: Sundell-Bergman und Johanson (1980) verglichen die radiotoxische Wirkung von  $^{125}\text{IUdR}$  und  $^3\text{H-TdR}$  in Hamsterfibroblasten, indem sie in die DNA entweder  $^{125}\text{IUdR}$  oder  $^3\text{H-TdR}$  inkorporierten und die Zerfälle auf Eis bis zu 6 h akkumulierten. Danach schloß sich eine Reparaturperiode von 21 h bei  $37^\circ\text{C}$  an. Es wurde festgestellt, daß  $^{125}\text{IUdR}$  7-12-fach effektiver nicht-reparable DNA-Strangbrüche erzeugte als  $^3\text{H-TdR}$ . Die ds-DNA-Funktion, in Abhängigkeit von den am Ende der Reparaturzeit gemessenen Zerfälle pro Minute und Zelle, fiel dabei mit einer starken Streuung der Werte von 70% (Kontrolle) auf 40% (15 d/ min/ c) ab. Zwischen jenen Werten und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit von T1- und 86HG-39-Zellen konnte kein Vergleich gezogen werden, da erstens nach Strahlenexposition keine zusätzliche Reparatur stattfand und zweitens ein kleinerer Bereich von maximal 2200  $^{125}\text{I}$ -Zerfällen pro Zelle betrachtet wurde, was nur 3,1 d/ min/ c entsprach.

#### 4.2.3 Koloniebildungstest und Comet Assay nach $\text{Na}^{125}\text{I}$ -Exposition

Da  $\text{Na}^{125}\text{I}$  außerhalb der Zelle zerfiel, war eine Kalkulation der Zerfälle pro Zelle wie bei  $^{125}\text{IUdR}$  und  $^{125}\text{I-AP}$  nicht möglich. Ein Vergleich konnte nur anhand der  $^{125}\text{I}$ -Konzentrationen im Medium während der Inkubation gezogen werden. Dazu muß jedoch angemerkt werden, daß  $^{125}\text{IUdR}$  aktiv inkorporiert wird und die radioaktive Konzentration im Medium sich von den im Zellkern gemessenen Zerfällen pro Zelle unterscheidet. In Abb. 57 sind die Überlebenskurven der drei Trägermoleküle dargestellt, wobei zum einen die Ergebnisse von  $\text{Na}^{125}\text{I}$  und  $^{125}\text{IUdR}$  (beides 30 h Inkubation mit Mediumwechsel) und zum anderen von  $\text{Na}^{125}\text{I}$  und  $^{125}\text{I-AP}$  (beides 28 h Inkubation ohne Mediumwechsel) gegenübergestellt wurden. Es ist vor allem bei der Inkubationsdauer von 30 h, aber auch bei der 28h-Inkubation, die im Vergleich zu den beiden anderen Trägermolekülen schwache Wirkung des  $\text{Na}^{125}\text{I}$  auf die Koloniebildungsfähigkeit erkennbar. Die OTM-Funktionen des Comet Assays ergaben ein ähnliches Bild (nicht dargestellt).

**Abbildung 57**

Vergleich der Überlebenskurven von T1- und 86HG-39-Zellen nach 30 h oder 28 h Exposition mit  $\text{Na}^{125}\text{I}$ ,  $^{125}\text{IUdR}$  und  $^{125}\text{I-AP}$

Der in der vorliegenden Arbeit gefundene geringe Effekt durch  $\text{Na}^{125}\text{I}$  stimmt mit den Ergebnissen der Literatur überein. So konnten Kassis et al. (1987 a) nach Inkubation von V79-Hamsterzellen mit  $\text{Na}^{125}\text{I}$  bei  $37^\circ\text{C}$  keine zelluläre Aufnahme des  $\text{Na}^{125}\text{I}$  und keinen Einfluß auf die Koloniebildungsfähigkeit bei  $\leq 7,4 \text{ MBq/ml}$  feststellen. Sie schlußfolgerten, daß AE-Emitter ineffizient sind, wenn sie extrazellulär oder ausschließlich im Zytoplasma (wie z.B.  $^{125}\text{I}$ -Dihydrorhodamin) lokalisiert sind. Auch Bloomer et al. (1981, 1983) wiesen an V79-Hamsterzellen (bis zu  $590 \text{ kBq Na}^{125}\text{I/ml}$ ) und an Brustkrebszellen (bis zu  $2,15 \text{ MBq Na}^{125}\text{I/ml}$ ) nach, daß  $\text{Na}^{125}\text{I}$  nicht in die Zellen aufgenommen wurde und dadurch bezüglich der Koloniebildungsfähigkeit nahezu wirkungslos blieb.

Es ist anhand des Zerfallspektrums von  $^{125}\text{I}$  (Tab. 1, 1.1) nachzuvollziehen, daß eine Schädigung der Zelle bei extrazellulärem  $^{125}\text{I}$ -Zerfall nur durch wenige Auger- und Konversionselektronen oder Photonenstrahlung, die ungehindert durch die Zellen hindurchdringt, eintreten kann. So haben die Konversionselektronen der L- bis N-Schale

Reichweiten von 18,6 - 23,1  $\mu\text{m}$  und KLL-, KLX und KXY-Auger-Elektronen Reichweiten von 10,8 - 18,2  $\mu\text{m}$  in biologischem Gewebe (Howell, 1992). Sie könnten bei einem Zelldurchmesser von 15 - 18  $\mu\text{m}$ , wie er bei den 86HG-39- und T1-Zellen gegeben ist, die Zellen vollständig durchdringen. Diese Elektronen treten aber nur mit einer sehr geringen Häufigkeit von 0,028 - 0,138 pro Zerfall auf. Der Einfluß der Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung (letzteres wird nur zu 7% beim  $^{125}\text{I}$ -Zerfall emittiert) ist offensichtlich deshalb so gering, da speziell in den 30 h-Versuchen sehr niedrige Aktivitäten von einigen kBq eingesetzt wurden. Die am häufigsten emittierten Auger- und Coster-Kronig-Elektronen der M- bis O-Schale weisen sehr geringe Reichweiten von unter 20 nm auf, so daß eine effektive Schädigung der Zelle nur durch eine Positionierung des AE-Emitters in geringem Abstand zum Zellkern zu erreichen ist. Dies war bei  $\text{Na}^{125}\text{I}$  nicht der Fall.

#### 4.2.4 Korrelationen zwischen biologischen Endpunkten

Mit einer Korrelationsanalyse unter Bestimmung des Pearson'schen Maßkorrelationskoeffizienten wurde eine mögliche Beziehung zwischen ansteigender DNA-Schädigung und verminderter Koloniebildungsfähigkeit nach Strahlenexposition untersucht. Da der Koloniebildungstest und der Comet Assay stets parallel durchgeführt wurden, konnten bei gleicher Dosis bzw. der gleichen Anzahl an  $^{125}\text{I}$ -Zerfällen die Überlebensfraktionen und OTM-Werte korreliert werden, obwohl sich diese beiden Methoden grundlegend in ihrer Durchführung und Zielsetzung unterscheiden. Eine Gegenüberstellung von Koloniebildungstest und Comet Assay mit ihren methodischen Eigenheiten ist in Tab. 15 aufgeführt.

**Tabelle 15**

Gegenüberstellung der Methodik von Koloniebildungstest und Comet Assay

Koloniebildungstest	Comet Assay
Betrachtung der Gesamtpopulation ohne individuelle Differenzierung	Analyse von Einzelzellen
abnehmende Überlebensfraktion	zunehmender DNA-Schaden
Entscheidung, ob Kolonie ja oder nein (Nominalskala)	Zuteilung von OTM Werten auf einer Verhältnisskala
Betrachtung des gesamtzellulären Schadens	Betrachtung des DNA- bzw. Chromatin-Schadens
Bestimmung der Überlebensfraktionen nach 10-12 Tagen	Analysezeitpunkt sofort nach der Strahlenexposition
etablierte Standardmethode	relativ neue Methode
lange Wartezeit, Ergebnis abhängig von der Einsaat	Auswertung einer großen Anzahl von Einzelzellen in kurzer Zeit

Dennoch wurde anhand der vorliegenden Ergebnisse ein enger Zusammenhang zwischen den beiden biologischen Endpunkten gefunden. Nach homogener  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung lag bei den T1- und 86HG-39-Zellen die stärkste Korrelation vor, die zudem hochsignifikant war (vgl. Tab. 8, 3.6). Überraschenderweise ließ sich ebenfalls nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition, trotz inhomogener Inkorporation in die DNA, ein signifikanter Zusammenhang finden, der vom Wert her dem  $^{125}\text{I}$ -AP entsprach. Somit wird offensichtlich auch bei Exposition der Zellen mit dem AE-Emitter  $^{125}\text{I}$  bei physiologischer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  das zelluläre Überleben entscheidend durch die DNA-Schädigung beeinflusst. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, daß die DNA das radiosensitivste Target innerhalb der Zelle ist, und daß  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ - oder  $^{125}\text{I}$ -induzierte DNA-Schäden letztlich zum Zelltod führen können.

Korrelationen zwischen der Koloniebildungsfähigkeit und anderen biologischen Endpunkten sind nach Exposition mit  $^{125}\text{IUdR}$  auch in der Literatur beschrieben worden. Chan et al. (1976) fanden beispielsweise einen guten Zusammenhang zwischen  $^{125}\text{IUdR}$ -induzierten Chromosomenaberrationen und dem Überleben von V79-Hamsterzellen. Sie folgerten daraus, daß der durch Strahlung erzeugte Zelltod aus einer Chromosomenschädigung resultierte. Miyazaki und Fujiwara (1981) sowie Liber et al. (1983) untersuchten die Koloniebildungsfähigkeit und die Entstehung von Mutationen (mittels  $6\text{TG}^{\text{R}}$ -Resistenz) an Säugerzellen, wobei  $^{125}\text{IUdR}$  bei beiden biologischen Endpunkten gleich effektiv war. Eine gute Korrelation zwischen Überleben und Chromosomenschädigung, die indirekt durch die Mikronukleusformation bestimmt wurde, konnte von Hofer et al. (1996) nachgewiesen werden. Sie exponierten synchronisierte Hamsterzellen mit  $^{125}\text{IUdR}$  (Akkumulation der Zerfälle bei  $-196^\circ\text{C}$ ) und Röntgenstrahlen, wobei die Korrelation bei  $^{125}\text{IUdR}$  noch stärker war als nach Röntgenstrahlung.

### **4.3 Quantifizierung der biologischen Wirksamkeit von $^{125}\text{I}$**

Für die quantitative Beurteilung der biologischen Wirksamkeit von AE-emittierenden Radionukliden kann ein Vergleich zu Photonenstrahlung (als Referenz) auf der Basis einer Dosis erfolgen. Wie schwierig sich jedoch die Dosisberechnungen für AE-Emitter aufgrund ihrer besonderen Zerfallscharakteristik darstellen, ist bereits in der Einleitung angesprochen worden. Unter anderem bestehen Differenzen zwischen den von verschiedenen Autoren mittels Monte-Carlo-Simulation generierten AE-Spektren für  $^{125}\text{I}$  bezüglich der Häufigkeiten der niederenergetischen Elektronen zwischen 20 und 100 eV. Zudem ist die Rolle der Neutralisation während der AE-Kaskaden und ihre Bedeutung hinsichtlich des biologischen Wirkungsmechanismus unklar. Es muß davon ausgegangen werden, daß sie die Anzahl der emittierten Elektronen stark beeinflusst (vgl. 1.1).

Da es nicht möglich ist, die deponierte Energie pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall in der Zelle experimentell zu bestimmen, müssen theoretische Ergebnisse herangezogen werden, die unter bestimmten Randbedingungen erstellt wurden. Diesbezüglich werden verschiedene Monte-Carlo-simulierte Energieberechnungen in chronologischer Reihenfolge nachfolgend genauer besprochen.

#### 4.3.1 Energieberechnungen zum $^{125}\text{I}$ -Zerfall (Literaturvergleich)

Eine Monte-Carlo-Simulation des Elektronenspektrums beim  $^{125}\text{I}$ -Zerfall wurde erstmals durch Charlton und Booz (1981) vorgestellt. Die Autoren konnten nachweisen, daß die Anzahl der Elektronen von der Betrachtung des Atoms in isolierter oder kondensierter Phase abhängt, da im ersten Fall 13,2 Elektronen, im zweiten Fall jedoch 21,1 Elektronen emittiert wurden. Insgesamt ergab sich bei der Simulation des  $^{125}\text{I}$ -Zerfalls eine breite Verteilung hinsichtlich der Elektronen-Anzahl und der emittierten Elektronen-Energie, für die ein mittlerer Wert von 19,8 keV pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall berechnet wurde.

Pomplun et al. (1987) zeigten durch Berechnungen mittels Dirac-Fock-Methode, daß neben der kinetischen Elektronen-Energie auch das Ladungspotential, das auf dem mehrfach ionisierten Tochternuklid am Ende der Kaskade zurückbleibt, zu berücksichtigen ist. Dieses Verfahren ergab eine perfekte Energiebilanz, wobei die Gesamtenergie pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall in einem Kugelvolumen von 20 nm Durchmesser 2,03 keV betrug und sich aus dem Ladungspotential (1,07 keV) und der Energiedeposition durch AE und Konversionselektronen (0,96 keV) zusammensetzte. Die gesamte emittierte Elektronenenergie wurde mit 19,4 keV berechnet.

Howell (1992) fand eine Gesamtzahl von 24,9 emittierten Auger- und Coster-Kronig-Elektronen mit einer Energie von 12,24 keV und 0,94 Konversionselektronen mit 7,24 keV pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall. Die Gesamtenergie der Elektronen betrug demnach 19,5 keV.

Pomplun et al. (1996) simulierten die Effekte des  $^{125}\text{I}$ -Zerfalls sowohl an linearer Plasmid-DNA als auch an einem Nukleosomenmodell in Flüssigwasserumgebung, um zwischen direkten und indirekten Effekten zu differenzieren. Sie fanden, daß in einem Bereich von 10 nm, der das gesamte Nukleosom abdecken würde, eine nahezu konstante Energiedeposition durch eine Vielzahl von AE mit einer Energie unter 500 eV vorliegt. Am Rand des betrachteten Kugelvolumens traten im niedrigen Energiebereich breite Schwankungen auf, die durch Konversionselektronen aus der L-Schale und höheren Schalen sowie durch Auger-Übergänge zur K-Schale hervorgerufen wurden. Es wurde berechnet, daß  $^{125}\text{I}$  pro Zerfall eine mittlere Elektronenenergie von 18,01 keV abgibt.

**Tabelle 16**Literaturübersicht zur gesamten Elektronenenergie pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall

Autoren	Elektronenenergie / $^{125}\text{I}$ -Zerfall
<i>Charlton/ Booz (1981)</i>	19,8 keV
<i>Pomplun et al. (1987)</i>	19,4 keV
<i>Howell (1992)</i>	19,5 keV
<i>Pomplun et al. (1996)</i>	18,0 keV

Einen Vergleich der Werte für die mittlere gesamte Elektronenenergie pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall, die in der angesprochenen Literatur berechnet wurden, gibt Tab. 16 wieder. Obwohl die Werte alle relativ nahe beieinander liegen, zeigt die Übersicht, daß im Laufe der Zeit die Energien durch verfeinerte Berechnungsmethoden kleiner werden.

#### 4.3.2 Dosisberechnungen und Wirksamkeitsfaktoren

Für die Berechnung einer Dosis spielen in erster Linie das biologische System und das Targetvolumen (Zielvolumen) eine Rolle. Wenn AE-Emitter kovalent an die zelluläre DNA gebunden sind, wird die Energie nicht gleichmäßig im Zellkern verteilt, und die absorbierte Energie entspricht nicht der Dosis für den Zellkern. Rao et al. (1990, 1991) zeigten jedoch, daß lethale Effekte durch AE-Emitter, die im Zytoplasma positioniert waren, durchaus mit der konventionellen Dosimetrie beurteilt werden konnten. Auch Humm et al. (1994) nahmen an, daß es möglich sei, das Zellüberleben mit der durchschnittlichen absorbierten Dosis zu korrelieren, wenn die subzelluläre Lokalisation des AE-Emitters dabei berücksichtigt würde.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Berechnung der absorbierten Dosis ausschließlich nach Zerfall von  $^{125}\text{I}$ -AP vorgenommen, da es sich gleichmäßig in der Zelle verteilte und dadurch seine Energie annähernd homogen deponierte (Talso et al., 1955; Thompson et al., 1958). Unter dieser Voraussetzung war ein Dosis-basierter Vergleich von  $^{125}\text{I}$ -AP und  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung bei T1- und 86HG-39-Zellen gerechtfertigt, wobei die mittleren deponierten Energien nach  $^{125}\text{I}$ -Zerfall in Abhängigkeit vom betrachteten Volumen aus der Arbeit von Pomplun (1987) zugrundegelegt wurden. Er berechnete die gesamte mittlere Energiedeposition nach  $^{125}\text{I}$ -Zerfall, die sich aus Elektronenenergie und Ladungspotential zusammensetzte, in Abhängigkeit vom Durchmesser eines betrachteten Kugelvolumens. Die Photonenenergie wurde dabei nicht berücksichtigt, da davon ausgegangen wurde, daß Photonen aufgrund ihrer Reichweite ihre Energie deutlich vom  $^{125}\text{I}$ -Zerfallsort entfernt deponieren (Kassis et al., 1987 a). Mit den folgenden Dosisangaben werden daher

ausschließlich die durch emittierte Elektronen hervorgerufenen biologischen Effekte betrachtet.

Laut Definition wird die Dosis aus Energie pro Masseinheit berechnet:

$$Dosis (Gy) = \frac{\text{mittlere deponierte Energie (J)}}{\text{Masse des Volumenelements (kg)}}$$

Die mittlere deponierte Energie beträgt in T1-Zellen mit 18 µm Durchmesser 14,1 keV und in 86HG-39-Zellen mit 15 µm Durchmesser 13,4 keV (1 eV = 1,60219×10<sup>-19</sup> J).

Die Masse der Zellen wurde über das Zellvolumen unter Annahme eines Kugelvolumens und einer Dichte von 1 berechnet, so daß sich pro T1-Zelle eine Masse von 30,5×10<sup>-13</sup> kg und pro 86HG-39-Zelle eine Masse von 17,7×10<sup>-13</sup> kg ergab. Damit konnte die Dosis pro <sup>125</sup>I-Zerfall bei gleichmäßiger <sup>125</sup>I-AP-Verteilung in der Zelle angegeben werden (Tab. 17).

**Tabelle 17**

Dosis pro <sup>125</sup>I-AP-Zerfall in T1- und 86HG-39-Zellen

	<b>T1-Zellen</b>	<b>86HG-39-Zellen</b>
<b>Dosis (mGy)</b>	0,740	1,215

Rechenbeispiel für T1-Zellen:

$$\frac{14100 \times \left( 1,60219 \times 10^{-19} \text{ J} \right)}{30,54 \times 10^{-13} \text{ kg}} = 0,00074 \text{ Gy} = 0,74 \text{ mGy}$$

Derartige Berechnungen sind für <sup>125</sup>IUdR nicht sinnvoll, da es inhomogen in die zelluläre DNA eingebaut wird und deshalb nicht gleichmäßig in der Zelle bzw. im Zellkern zerfällt (vgl. 4.2.2). Ein Vergleich der biologischen Wirksamkeit von <sup>125</sup>IUdR und <sup>137</sup>Cs-γ Strahlung ist aber über das <sup>125</sup>I-AP möglich, daß sowohl in Einheiten von Zerfällen pro Zelle als auch in Gy quantifiziert werden kann, wobei jeweils das Zellmodell und der biologische Endpunkt berücksichtigt werden müssen. Obwohl die DNA als der radiosensitivste Teil innerhalb der Zelle betrachtet wird (vgl. 4.2.4), wurde in der obigen Dosisberechnung und in den nachfolgenden Vergleichen die gesamte Zelle als Targetvolumen herangezogen, da bei der Koloniebildungsfähigkeit gesamtzelluläre Effekte eine Rolle spielen und der Zelltod nicht ausschließlich von DNA-Schäden herrührt.

Es wurden die D<sub>37</sub>-Werte der T1- und 86HG-39-Überlebenskurven nach <sup>125</sup>IUdR- und <sup>125</sup>I-AP-Exposition sowie nach <sup>137</sup>Cs-γ-Strahlung gegenübergestellt, wobei für <sup>125</sup>I-AP sowohl

Zerfälle pro Zelle als auch die damit multiplizierte Dosis pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall in Gy angegeben wurde (Tab. 18+19). Die biologische Wirksamkeit wurde anhand der resultierenden Faktoren quantifiziert. Es zeigte sich, daß bei den T1-Zellen  $^{125}\text{IUdR}$  12,9-fach effektiver war als  $^{125}\text{I-AP}$ , während  $^{125}\text{I-AP}$  wiederum mit dem Faktor 1,9 wirksamer war als  $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Strahlung. Daraus konnte für  $^{125}\text{IUdR}$  gegenüber  $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Strahlung ein Wirksamkeitsfaktor von 24,2 bei Betrachtung des  $D_{37}$ -Wertes gefolgert werden. Im Falle der 86HG-39-Zellen war  $^{125}\text{IUdR}$  sogar 14-fach effektiver als  $^{125}\text{I-AP}$  und dieses wiederum beinahe doppelt so wirksam wie  $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Strahlung. Bei den 86HG-39-Zellen lag  $^{125}\text{IUdR}$  damit beim  $D_{37}$ -Wert mit dem Faktor 27,7 über der biologischen Wirksamkeit von  $^{137}\text{Cs-}\gamma$ -Strahlung.

**Tabelle 18**

Vergleich der biologischen Wirksamkeit von  $^{125}\text{IUdR}$ ,  $^{125}\text{I-AP}$  und  $^{137}\text{Cs-}\gamma$  am Beispiel des klonogenen Überlebens von T1-Zellen

T1-Zellen	Nuklid / Trägermolekül	$D_{37}$	Wirksamkeitsfaktor
d/c	$^{125}\text{IUdR}$	90	12,89
	$^{125}\text{I-AP}$	1160	
Dosis (Gy)	$^{125}\text{I-AP}$	0,86	1,88
	$^{137}\text{Cs-}\gamma$	1,61	
Vergleich zwischen $^{125}\text{IUdR}$ und $^{137}\text{Cs-}\gamma$			24,23

**Tabelle 19**

Vergleich der biologischen Wirksamkeit von  $^{125}\text{IUdR}$ ,  $^{125}\text{I-AP}$  und  $^{137}\text{Cs-}\gamma$  am Beispiel des klonogenen Überlebens von 86HG-39-Zellen

86HG-39-Zellen	Nuklid / Trägermolekül	$D_{37}$	Wirksamkeitsfaktor
d/c	$^{125}\text{IUdR}$	80	14,13
	$^{125}\text{I-AP}$	1130	
Dosis (Gy)	$^{125}\text{I-AP}$	1,37	1,96
	$^{137}\text{Cs-}\gamma$	2,68	
Vergleich zwischen $^{125}\text{IUdR}$ und $^{137}\text{Cs-}\gamma$			27,69

Die biologische Wirksamkeit von  $^{125}\text{IUdR}$  im Vergleich zu  $^{125}\text{I-AP}$  bezüglich des klonogenen Überlebens ( $D_{37}$ -Werte) wurde auch von Bloomer et al. (1981) und Sedelnikowa et al. (1998) an Fibrosarkomzellen und Knochenmarkzellen von Mäusen untersucht. Sie fanden mit Faktoren von  $8,5 \times 10^4$  und 885 eine deutlich stärkere Radiotoxizität des  $^{125}\text{IUdR}$ , wobei die Differenz zwischen den Faktoren u.a. mit den

unterschiedlichen Versuchsbedingungen zusammenhängen könnten. Bloomer et al. (1981) bezogen sich dabei auf die radioaktive Konzentration im zugesetzten Medium und Sedelnikowa et al. (1998) bei gefrorenen Zellen auf die Zerfälle pro  $\mu\text{m}^3$  Zellvolumen. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Wirksamkeitsfaktoren für T1- (24,2) und 86HG-39-Zellen (27,7) liegen deutlich niedriger.

Auch beim biologischen Endpunkt der DNA-Schädigung, die mit dem Comet Assay gemessen wurde, läßt sich ein solcher Vergleich aufstellen, wobei ein OTM von 3,0 betrachtet wurde (Tab. 20). Die Ergebnisse nach  $^{125}\text{I}$ -Exposition bei  $37^\circ\text{C}$  wurden aufgrund der Reparaturvorgänge (vgl. 4.2.2) nicht berücksichtigt und stattdessen am Beispiel der T1-Zellen diejenigen nach Exposition bei  $\leq 0^\circ\text{C}$  betrachtet. Bei dieser Methode wurde, ebenso wie bei  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung auf Eis, eine Reparatur der DNA-Schäden unterdrückt. Es zeigten sich in diesem Fall deutlich niedrigere Wirksamkeitsfaktoren, da  $^{125}\text{IUdR}$  nur noch 1,2-fach effektiver als  $^{125}\text{I-AP}$  war und dieses wiederum 1,5-fach wirksamer als  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung. Damit ergab sich beim Vergleich der DNA-Schädigung von  $^{125}\text{IUdR}$  mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung ein sehr viel kleinerer Wirksamkeitsfaktor von 1,8.

**Tabelle 20**

Vergleich der biologischen Wirksamkeit von  $^{125}\text{IUdR}$ ,  $^{125}\text{I-AP}$  und  $^{137}\text{Cs-}\gamma$  am Beispiel der DNA-Schädigung von T1-Zellen

T1-Zellen	Nuklid bzw. Trägermolekül	OTM 3,0	Wirksamkeitsfaktor
d/c	$^{125}\text{IUdR}$	1450	1,21
	$^{125}\text{I-AP}$	1750	
Dosis (Gy)	$^{125}\text{I-AP}$	1,30	1,47
	$^{137}\text{Cs-}\gamma$	1,9	
Vergleich zwischen $^{125}\text{IUdR}$ und $^{137}\text{Cs-}\gamma$			1,77

Die hier berechneten Wirksamkeitsfaktoren gleichen dem Konzept der Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW), das bereits in der Einleitung angesprochen wurde (vgl. 1.3). Die RBW ist ein Vergleichsindikator für die Bewertung der biologischen Effekte, die durch unterschiedliche Strahlung hervorgerufen wurden. Besonders bei kultivierten Säugerzellen ist die RBW-Bestimmung relativ komplex. Sie hängt u.a. vom LET, der betrachteten Dosis, der Dosisrate, den Zellen und dem biologischen Endpunkt ab (s. Alpen, 1990). So wird bei Überlebenskurven mit Schulter die RBW stark durch die Höhe des betrachteten biologischen Effektes bedingt ( $D_{50}$ ,  $D_{37}$  oder  $D_{10}$ ), da sie im Schulterbereich überproportional zunimmt. Dieses Problem ergibt sich auch bei

fraktionierten Dosen, durch die eine breitere Schulterkurve entsteht. Dennoch können allgemeingültige Aussagen getroffen werden. So zeigen z.B. alle Säugerzellen eine stärkere Radiosensitivität gegenüber Hoch-LET-Strahlung, die damit auch eine höhere RBW gegenüber Niedrig-LET-Strahlung bzw. Photonenstrahlung aufweist (s. Nias, 1990). Außerdem gilt als weitere Regel, daß RBW-Faktoren für solche Gewebe hoch sind, die einen großen Anteil an sublethalen Schäden akkumulieren und reparieren, was sich in einer ausgeprägten Schulter bei der Überlebenskurve äußert (s. Hall, 1994).

Über Wirksamkeitsfaktoren bietet sich indirekt durch das  $^{125}\text{I}$ -AP eine Möglichkeit für die Beurteilung von DNA-inkorporiertem  $^{125}\text{IUdR}$  im Vergleich zu Photonenbestrahlung. Bei diesen Faktoren lag eine große Differenz zwischen den beiden betrachteten biologischen Endpunkten vor, wobei das klonogene Überleben auch im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz von  $^{125}\text{IUdR}$  die größere Relevanz besitzt. Beim Comet Assay scheint die Wirksamkeit des  $^{125}\text{IUdR}$  durch den Einfluß mehrerer Effekte, insbesondere durch die Clusterbildung in der DNA, unterschätzt zu werden. Auch Yasui et al. (2000) fanden bei der Erzeugung von DNA-Strangbrüchen durch  $^{125}\text{IUdR}$  einen vergleichsweise niedrigen RBW-Faktor von 2,9 für Doppelstrangbrüche bei einer CHO-Zelllinie. Sie führten den niedrigen Faktor auf gehäufte Läsionen (Cluster) zurück, die durch den inhomogenen Einbau des  $^{125}\text{IUdR}$  in die DNA verursacht würden (vgl. 4.2.2).

Ein Einfluß der Zelllinie auf die Wirksamkeitsfaktoren konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Der Unterschied zwischen den T1- und 86HG-39-Zellen fiel bei den Wirksamkeitsfaktoren sowohl bezüglich des Überlebens als auch bezüglich der DNA-Schädigung gering aus.

Ein Vergleich der berechneten Dosen für den Zerfall von  $^{125}\text{IUdR}$  in anderen Studien wird durch die unterschiedlichen Zellkerndurchmesser erschwert (Tab. 21). Burki et al. (1973) legten bei der Berechnung einer Dosis in V79-Hamsterzellen eine Energie von 18,9 keV pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall zugrunde, wobei unzutreffenderweise eine homogene Energiedeposition von  $^{125}\text{IUdR}$  im Zellkern angenommen wurde. Darauf basierend fanden die Autoren im Vergleich zu Gamma- oder Röntgenstrahlung eine 3,8 – 17,8-fach stärkere Wirkung des  $^{125}\text{IUdR}$  bezogen auf den  $D_0$ -Wert der Überlebenskurven bei gefrorenen Zellen. Wartens et al. (1977) unterschieden bei CHO-Zellen die Dosis nach  $^{125}\text{I}$ -Zerfall im Zellkern, im Zytoplasma und der Membran. In diesen einzelnen Kompartimenten wurde ebenfalls eine homogene Energieverteilung angenommen. Diesem Schema folgten auch Sundell-Bergman und Johanson (1980) bei ihren Berechnungen für CHF-Zellen sowie Miyazaki und Fujiwara (1981) bei V79-Hamsterzellen. Letztere verglichen anhand der  $D_0$ -Werte die biologische Wirkung von  $^{125}\text{IUdR}$  mit 170 kV-Röntgenstrahlung und fanden einen RBW-Faktor von 10.

**Tabelle 21**Literaturvergleich: Dosisberechnungen pro  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfall im Zellkern

<b>Autoren</b>	<b>Dosis / <math>^{125}\text{IUdR}</math>-Zerfall (mGy)</b>	<b>Durchmesser Zellkern (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Burki et al. (1973)</b>	16,9	7,2 (V79-Zellen)
<b>Warters et al. (1977)</b>	7,42	8 (CHO-Zellen)
<b>Sundell-Bergman/ Johanson (1980)</b>	7,7	8 (CHF-Zellen)
<b>Miyazaki/ Fujiwara (1981)</b>	13	8 (V79-Zellen)

Ehrfeld et al. (1986) führten nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Exposition eine Umrechnung des  $D_{37}$ -Wertes in Gy durch, wobei sie 6,9 mGy pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall im Zellkern zugrundelegten und ebenfalls eine homogene Verteilung von  $^{125}\text{IUdR}$  annahmen (Tab. 22). Kassis et al. (1987 b) berechneten für  $^{125}\text{IUdR}$  eine mittlere deponierte Energie von 11,2 keV pro Zerfall im Nukleus bei homogener Verteilung und verglichen es mit dem  $D_{37}$ -Wert nach 250 kV-Röntgenstrahlung an V79-Hamsterzellen. Es ergab sich ein RBW-Faktor von 7,3, der auch für  $^{77}\text{Br}$  als einen weiteren AE-Emitter zutrif. Die Daten von Makrigiorgos et al. (1990) beruhten auf eigenen theoretischen Berechnungen anhand eines  $^{125}\text{I}$ -Zerfallsspektrums und einer gleichmäßig deponierten Elektronenenergie von 10,2 keV im Zellkern nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfall. Geselowitz et al. (1995) fanden beim  $D_{37}$ -Wert unterschiedliche Zellkerndosen nach „pulse-labelling“ der Zellen mit  $^{125}\text{IUdR}$ , die vom Einfrierzeitpunkt abhingen. Dabei legten die Autoren für den Zellkern eine Energie von 11,23 -11,86 keV pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall zugrunde.

**Tabelle 22**Literaturvergleich: Dosisberechnungen für  $^{125}\text{IUdR}$  bezüglich der 37%-Überlebensfraktion

<b>Autoren</b>	<b><math>D_{37}</math> (mGy)</b>	<b>Durchmesser Zellkern (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Ehrfeld et al. (1986)</b>	660	8 (CHE-Zellen)
<b>Kassis et al. (1987 b)</b>	800	8 (V79-Zellen)
<b>Makrigiorgos et al. (1990)</b>	800	8 (V79-Zellen)
<b>Geselowitz et al. (1995)</b>	120 - 1100	10 (CHO-Zellen)

In vielen Studien wird eine Beurteilung der biologischen Wirksamkeit von  $^{125}\text{I}$ -markierten Trägermolekülen dadurch erschwert, daß keine vergleichenden Untersuchungen mit einer Referenzstrahlung durchgeführt wurden. Zudem gehen die meisten Studien unzutreffenderweise von einer homogenen Dosisverteilung im Zellkern nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfall

aus. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch dargelegt, daß nur für den  $^{125}\text{I}$ -AP-Zerfall aufgrund der nahezu gleichmäßigen Energieverteilung in der Zelle, nicht jedoch für inhomogen DNA-inkorporiertes  $^{125}\text{IUdR}$  sinnvollerweise eine Dosis berechnet werden kann. Da es bislang an einem Korrekturfaktor fehlt, der die Ungleichverteilung des  $^{125}\text{IUdR}$  und die daraus entstehenden Konsequenzen berücksichtigt und befriedigend korrigiert, wird vorgeschlagen, stattdessen eine Beurteilung der biologischen Effekte von  $^{125}\text{IUdR}$  anhand von Wirksamkeitsfaktoren vorzunehmen.

#### **4.4 Tierexperimente und klinische Studien mit $^{125}\text{I}$**

AE-emittierende Radionuklide scheinen das Potential für eine gezielte Strahlenbehandlung von soliden Tumoren zu besitzen (Wheldon, 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf die Bedeutung der Auswahl eines geeigneten Trägermoleküls für AE-Emitter hin, da hiervon die Positionierung innerhalb der Zelle und damit die biologische Wirksamkeit abhängt. Ein entscheidender Vorteil bei der klinischen Verwendung von AE-Emittern ist der Effekt der kurzen Reichweite, da umliegendes Normalgewebe weitgehend verschont bleibt. Dieser Effekt zeigte sich in der vorliegenden Arbeit durch  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , das außerhalb der Zelle und in gewisser Entfernung zum Zellkern positioniert war und daher wirkungslos blieb.

Hinsichtlich einer klinischen Anwendung von  $^{125}\text{I}$  kommt  $^{125}\text{IUdR}$  als radioaktiv markiertes Trägermolekül am ehesten in Frage, da es auch unter physiologischen Bedingungen die stärkste radiotoxische Wirkung entfaltet. Ein zusätzlicher Aspekt des  $^{125}\text{IUdR}$  ist der selektive Einbau in S-Phase-Zellen, weshalb es sich besonders für schnell proliferierendes Tumorgewebe, unter Schonung langsamer proliferierender Normalgewebe eignen würde. In der vorliegenden Arbeit wurde eine inhomogene Inkorporation von  $^{125}\text{IUdR}$  in asynchrone Zellpopulationen gefunden, was klinisch von Nachteil ist. Nicht mit  $^{125}\text{IUdR}$ -markierte Zellen könnten jedoch durch eine gleichzeitige Behandlung mit  $^{125}\text{I}$ -AP abgetötet werden. Auch O'Donoghue und Wheldon (1996) beschrieben das Problem der heterogenen Radionuklid-Aufnahme in die Tumorzellen und schlugen vor, eine kombinierte Behandlung verschiedener Strahlenarten zusammen mit einer Chemotherapie einzusetzen, um so resistente Subpopulationen zu treffen. Eine Kombination von  $^{125}\text{IUdR}$  und  $^{125}\text{I}$ -AP ist bislang am Zellmodell noch nicht getestet worden. Es muß angemerkt werden, daß in der vorliegenden Arbeit bei  $^{125}\text{I}$ -AP Aktivitätsmengen bis zu 10 MBq/ml verwendet wurden, was klinisch nicht praktikabel erscheint. Im Gegensatz dazu wurden für eine effektive biologische Wirkung von  $^{125}\text{IUdR}$  nur einige kBq/ml benötigt.

$^{125}\text{I}$  wurde bereits in einigen Tierversuchen und klinischen Studien auf seine therapeutische und diagnostische Effizienz überprüft. *In vivo* traten, anders als bei der Zellkultur, verschiedene Probleme auf, die vor allem die kurze biologische Halbwertszeit des  $^{125}\text{IUdR}$  und das Verhältnis der Aktivitätsaufnahme in Tumorzellen und Normalgewebe betrafen (Hofer, 2000). Bei systemischer Applikation des radioaktiven IUdR wird das Molekül innerhalb von 5-7 Minuten dehalogeniert, so daß nur eine geringe Aktivitätsmenge den Tumor erreicht und eingebaut werden kann (Klecher, 1985). Nachteilig ist, daß auch andere stark proliferierende Gewebe, wie z.B. Knochenmarkzellen,  $^{125}\text{IUdR}$  einbauen können und dadurch geschädigt werden, während im Tumor nur S-Phase-Zellen getroffen werden (s. Hofer, 2000). Daher wurde eine direkte und wiederholte Injektion von  $^{125}\text{IUdR}$  in den Tumor vorgeschlagen (z.B. Neshasteh-Riz et al. 1997), womit allerdings nur kleine Tumore behandelt werden können.

Außerdem wurde in mehreren Veröffentlichungen die positive Wirkung von Antimetaboliten wie Methotrexat (MTX) und 5-Fluorouracil nachgewiesen, die durch Hemmung der TS den Einbau von  $^{123}\text{IUdR}$  oder  $^{125}\text{IUdR}$  in die zelluläre Tumor-DNA förderten (Bagshawe et al., 1991; Mester et al., 1996; Mariani et al., 1996). Durch die Kombination mit MTX konnte beispielsweise die therapeutische Effizienz des  $^{125}\text{IUdR}$  bei Ratten mit Rhabdomyosarkomen erhöht werden (Kassis et al., 2000 a). In einer weiteren Studie wurde  $^{125}\text{IUdR}$  bei Mäusen mit Kolonkrebs an verschiedene Glycoside gebunden eingesetzt, um der schnellen Deiodination von IUdR entgegenzuwirken (Baranowska-Kortylewicz et al., 1996). Diese Vorstufen wurden erst im Kolon von spezifischen Enzymen zersetzt und transportierten das gebundene radioaktive IUdR unversehrt durch den Verdauungstrakt. Dadurch war es möglich, die Tumorzellen über eine längere Zeit mit therapeutischen Mengen an  $^{125}\text{IUdR}$  zu exponieren.

Erfolgreich war gleichfalls die Behandlung von Blasenkrebs bei Ratten mit  $^{123}\text{IUdR}$  oder  $^{125}\text{IUdR}$ , das direkt in die Harnblase appliziert wurde. Es ergab sich eine spezifische Aufnahme von  $^{123}\text{IUdR}$  und  $^{125}\text{IUdR}$  in die Tumorzellen bis tief in das Urothel (Van den Abbeele et al., 1996). Bezüglich der Anreicherungsrate wurde eine hohe Akkumulation der Radioaktivität im Tumor z.B. bei Mäusen mit Gebärmutterkrebs (Kassis und Adelstein, 1996) und bei Patienten mit Blasenkrebs festgestellt (Harrison, 1996). Die therapeutische Effizienz von  $^{125}\text{IUdR}$  wurde auch bei Ratten mit Gliosarkomen günstig beurteilt, da eine signifikante Verlängerung der Lebensdauer nach intrazerebraler Administration von  $^{125}\text{IUdR}$  nachwiesen wurde (Kassis und Adelstein, 1996).

Das Potential von  $^{125}\text{IUdR}$  für eine klinische Anwendung wird demnach durchaus positiv eingeschätzt.

## Zusammenfassung

Die biologische Wirksamkeit des Auger-Elektronen emittierenden Radionuklids  $^{125}\text{I}$  wurde nach seiner Positionierung in unterschiedlichen Kompartimenten humaner Zellen untersucht und die Effekte mit denen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung verglichen. Die Positionierung erfolgte in nicht-synchronisierten Nieren-T1- und 86HG-39-Glioblastomzellen bei einer physiologischen Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  mit Hilfe dreier  $^{125}\text{I}$ -markierter Trägermoleküle:  $^{125}\text{I}$ iododesoxyuridin, das als Thymidinanalogon in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wurde;  $^{125}\text{I}$ -Antipyrin, das durch die Zellmembran diffundierte und sich gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilte; und  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , das außerhalb der Zelle verblieb. Als biologische Endpunkte wurden hauptsächlich das klonogene Überleben, das mit dem Koloniebildungstest bestimmt wurde, und die molekulare Schädigung der DNA betrachtet, die mit dem alkalischen Comet Assay gemessen und durch das sogenannte Olive Tail Moment quantifiziert wurde.

Im Vergleich der Trägermoleküle wirkte  $^{125}\text{IUdR}$  am stärksten radiotoxisch und wies steil abfallende Überlebenskurven mit  $D_{37}$ -Werten von 80 - 90 d/c und OTM-Werte von 1,47 - 1,58 bei 1000 d/c im Comet Assay auf. Die Inkorporation von  $^{125}\text{IUdR}$  in die DNA konnte durch Zugabe des Thymidilatsynthetasehemmers FUDR deutlich gesteigert werden. Charakteristischerweise wurde bei den  $^{125}\text{IUdR}$ -Überlebenskurven eine ab etwa 700 d/c eintretende Sättigung (Tailing) gefunden. Sie wurde mit Hilfe des Comet Assays, der eine individuelle Auswertung von Einzelzellen ermöglichte, als konstanter nicht- $^{125}\text{IUdR}$ -markierter Anteil der asynchronen Zellpopulation identifiziert. Da bereits markierte Zellen  $^{125}\text{IUdR}$  mehrfach inkorporierten, ergab sich trotz ansteigender Zerfälle pro Zelle eine Schädigungssättigung.  $^{125}\text{I}$ -AP zeigte Niedrig-LET-ähnliche Schulterkurven mit  $D_{37}$ -Werten von 1130 - 1160 d/c und OTM-Werte im Comet Assay von 1,28 - 1,37 bei 1000 d/c. Es wies somit eine schwächere Wirkung auf als  $^{125}\text{IUdR}$ , während extrazelluläres  $\text{Na}^{125}\text{I}$  nahezu keinen biologischen Effekt hervorrief. Der Anstieg der OTM-Funktionen von  $^{125}\text{IUdR}$  und  $^{125}\text{I}$ -AP fiel im Vergleich zu  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung sehr gering aus, was vor allem auf Reparaturvorgänge während der  $^{125}\text{I}$ -Exposition bei  $37^\circ\text{C}$ , die inhomogene  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation und DNA-Schäden in Form gehäufte Läsionen (Cluster), erzeugt durch  $^{125}\text{IUdR}$ , zurückgeführt wurde. Aus den Experimenten mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung resultierten Niedrig-LET-Schulterkurven mit  $D_0$ -Werten von 0,9 - 1,2 Gy und steil ansteigende, lineare OTM-Funktionen mit OTM-Werten von 3,8 - 5,3 bei 4 Gy.

Die abnehmende Radiotoxizität der  $^{125}\text{I}$ -markierten Trägermoleküle wurde mit dem ansteigenden Abstand des  $^{125}\text{I}$ -Zerfallsortes zur DNA begründet, da die am häufigsten emittierten niederenergetischen Auger-Elektronen nur eine geringe Reichweite von einigen Nanometern in biologischem Gewebe besitzen. Dagegen weisen die Auger-

Elektronen in der Nähe des Zerfallsortes aufgrund ihrer hohen Ionisationsdichte ein starkes Schädigungspotential auf. Zudem wurde ein enger Zusammenhang zwischen ansteigender DNA-Schädigung und verminderter Koloniebildungsfähigkeit nachgewiesen, wodurch die Bedeutung der DNA als wichtigstes Target für das Zellüberleben bestätigt wurde.

Die biologischen Wirkungen des  $^{125}\text{I}$ -AP und der Referenzstrahlung  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$  wurden quantitativ verglichen, da  $^{125}\text{I}$ -AP seine Energie nahezu gleichmäßig über die Zelle verteilte und somit eine Dosisberechnung für T1- und 86HG-39-Zellen möglich war. Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, daß die Angabe einer Dosis für  $^{125}\text{IUdR}$  aufgrund der inhomogenen Inkorporation und der daraus resultierenden ungleichmäßigen Energiedeposition nicht sinnvoll gewesen wäre. Eine Beurteilung der biologischen Wirksamkeit erfolgte stattdessen über die Berechnung von Wirksamkeitsfaktoren unter Betrachtung eines definierten Endpunktes. Da die Wirkung von  $^{125}\text{I}$ -AP sich sowohl in Zerfällen pro Zelle als auch in Gy quantifizieren ließ, konnte  $^{125}\text{IUdR}$  indirekt mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung verglichen werden. Es ergaben sich für die benutzten Zellmodelle bei  $^{125}\text{IUdR}$  Wirksamkeitsfaktoren von 24 - 28 bezogen auf die 37%-Überlebensfraktionen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung.

Damit wäre  $^{125}\text{IUdR}$  aufgrund seiner biologischen Wirksamkeit als mögliche Erweiterung der adjuvanten Strahlentherapie von Tumoren geeignet, wobei umliegendes Normalgewebe weitgehend verschont bliebe.

**Abbildungsverzeichnis**

	Seite
Abb. 1 Schematische Darstellung von Auger- und Coster-Kronig-Übergängen	1
Abb. 2 Schematischer Ablauf einer AE-Kaskade nach Elektroneneinfang aus der K-Schale (Humm, 1984)	2
Abb. 3 MIRD: Zerfallsschema für $^{125}\text{I}$ (Weber et al., 1989)	3
Abb. 4 Darstellung direkter und indirekter Strahleneffekte (Hall, 1994)	5
Abb. 5 Darstellung von Strahlenschäden an der DNA (Herrmann und Baumann 1997)	6
Abb. 6 Schema einer Hoch- und Niedrig-LET-Überlebenskurve	8
Abb. 7 Wachstumskurven der T1- und 86HG-39-Zellen mit Phaseneinteilung	17
Abb. 8 Mit Giemsa und May-Grünwald-Lösung angefärbte T1- und 86HG-39-Zellrasen zur Bestimmung der Kerndurchmesser	18
Abb. 9 Schema zu den Zellversuchen mit Strahlenexposition und anschließender Untersuchung der biologischen Endpunkte	20
Abb. 10 Strukturformeln von Thymidin und $^{125}\text{I}$ iododesoxyuridin	21
Abb. 11 Modell der zeitabhängigen $^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporation mit und ohne Mediumwechsel	24
Abb. 12 Strukturformel des $^{125}\text{I}$ -Antipyrins	25
Abb. 13 Durchführung der AChE-Bestimmung mit Ellman's Reagenz	29
Abb. 14 T1- und 86HG-39-Kolonien nach Hämatoxylinfärbung	30
Abb. 15 Ablauf des Comet Assays mit den wichtigsten Versuchsschritten	32
Abb. 16 Aufnahmen von 86HG-39-Kometen: a) ohne Bestrahlung, b) nach $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (8 Gy)	33
Abb. 17 Schematische Darstellung eines Kometen mit den Parametern des OTM	34
Abb. 18 Schematischer Ablauf der Probenvorbereitung für die HA-Säulenchromatographie	36
Abb. 19 Verteilung der Zellzyklusphasen von T1-Zellen im Alter von 3 bis 8 Tagen	39
Abb. 20 Verteilung der Zellzyklusphasen von 86HG-39-Zellen im Alter von 4, 7 und 8 Tagen	39
Abb. 21 Viabilitätsraten der T1- und 86HG-39-Zellen nach $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung	40
Abb. 22 AChE-Aktivitätsrate des Standards aus Rinder-Erythrozyten	41
Abb. 23 AChE-Aktivitätsraten der T1- und 86HG-39-Zellen nach $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung ( $\mu\text{Mol}$ Substrat hydrolysiert pro Minute und g Protein)	42
Abb. 24 Überlebenskurven nach $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung der T1- und 86HG-39-Zellen	43
Abb. 25 Comet Assay nach $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung der T1- und 86HG-39-Zellen	44

---

Abb. 26	Aufnahme von 86HG-39-Kometen nach $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (8 Gy)	44
Abb. 27	Comet Assay nach $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (4 Gy) der T1- und 86HG-39-Zellen und anschließender Reparatur bei 37°C	45
Abb. 28	HA-Chromatographie nach $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung der T1- und 86HG-39-Zellen	46
Abb. 29	$^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporationskinetik von T1- und 86HG-39-Zellen	47
Abb. 30	$^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporationskinetik am Beispiel der T1-Zellen mit Mediumwechsel nach 8 h und 23 h	47
Abb. 31	$^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in Abhängigkeit von der radioaktiven Konzentration im Medium	48
Abb. 32	$^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in 86HG-39-Zellen bei verschiedenen FUdR- und CdR-Konzentrationen	49
Abb. 33	Koloniebildungstest nach Inkubation der T1-Zellen mit verschiedenen FUdR- und CdR-Konzentrationen	50
Abb. 34	Koloniebildungstest nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit verschiedenen FUdR- und CdR-Konzentrationen sowie $10^{-12}\text{M}$ IUdR	51
Abb. 35	Comet Assay nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit verschiedenen FUdR- und CdR-Konzentrationen sowie $10^{-12}\text{M}$ IUdR	52
Abb. 36	Überlebenskurven nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in T1- und 86HG-39-Zellen im Standardverfahren	53
Abb. 37	Comet Assay nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in T1- und 86HG-39-Zellen im Standardverfahren	54
Abb. 38	Vergleich der Überlebenskurven von T1- und 86HG-39-Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit $^{125}\text{IUdR}$	55
Abb. 39	Vergleich der OTM-Funktionen von T1- und 86HG-39-Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit $^{125}\text{IUdR}$	55
Abb. 40	Comet Assay nach Akkumulation der $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfälle in T1- und 86HG-39-Zellen bei $-196^\circ\text{C}$	56
Abb. 41	HA-Chromatographie nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in T1- und 86HG-39-Zellen	57
Abb. 42	Koloniebildungstest nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit verschiedenen Antipyrin-Konzentrationen	58
Abb. 43	Comet Assay nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit verschiedenen Antipyrin-Konzentrationen	58
Abb. 44	Überlebenskurven nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit $^{125}\text{I-AP}$	59
Abb. 45	Comet Assay nach Exposition der T1- u. 86HG-39-Zellen mit $^{125}\text{I-AP}$	60
Abb. 46	Comet Assay nach $^{125}\text{I-AP}$ -Exposition der T1-Zellen auf Eis	61
Abb. 47	Überlebenskurven nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit $\text{Na}^{125}\text{I}$ für 30 h	62
Abb. 48	Comet Assay nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit $\text{Na}^{125}\text{I}$ für 30 h	62

Abb. 49	Überlebenskurven nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit Na <sup>125</sup> I für 28 h	63
Abb. 50	Comet Assay nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit Na <sup>125</sup> I für 28 h	63
Abb. 51	Comet Assay mit T1-Zellen (jeweils Kontrolle und mit 4 Gy bestrahlte Probe) nach methodischen Modifikationen	69
Abb. 52	Schema zur Messung von DNA-Strangbrüchen mittels HA-Chromatographie	71
Abb. 53	Vergleich der Überlebenskurven von T1- und 86HG-39-Zellen nach 30 h <sup>125</sup> IUdR- und 28 h <sup>125</sup> I-AP-Exposition	73
Abb. 54	Teil des FU-/ FUDR-Metabolismus und Mechanismus in der Zelle (Isacoff und Borud, 1997)	75
Abb. 55	Vergleich der OTM-Funktionen von T1- und 86HG-39-Zellen nach <sup>125</sup> IUdR- und <sup>125</sup> I-AP-Exposition	78
Abb. 56	Aufnahme von Kometen nach <sup>125</sup> IUdR-Exposition und Akkumulation der Zerfälle bei -196°C	79
Abb. 57	Vergleich der Überlebenskurven von T1- und 86HG-39-Zellen nach 30 h oder 28 h Exposition mit Na <sup>125</sup> I, <sup>125</sup> I-AP und <sup>125</sup> IUdR	84

### Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Zerfallsspektrum von <sup>125</sup> I in kondensierter Phase (Pomplun, 1987 und 2000)	4
Tab. 2	Qualitätsfaktoren verschiedener Strahlenarten (Strahlenschutzverordnung, Veith, 1996)	11
Tab. 3	Dosis pro akkumulierter Aktivität von <sup>125</sup> I in Gy/ Bq x h (n. Howell, 1992)	12
Tab. 4	Vergleich der Halbwertszeiten, AE-Anzahl und mittleren AE-Energien pro Zerfall von AE-Emittern (O'Donoghue und Wheldon, 1996)	14
Tab. 5	Zellzyklusphasenanteile (%) von T1- und 86HG-39-Zellen nach 4 und 7 Tagen Wachstum in Leighton-Kulturröhrchen	40
Tab. 6	Charakteristische Kennzahlen der T1- und 86HG-39-Überlebenskurven nach <sup>137</sup> Cs-γ-Bestrahlung	42
Tab. 7	ds-DNA-Fractionen nach Exposition der T1- und 86HG-39-Zellen mit FUDR und CdR	57
Tab. 8	Korrelationsanalyse zwischen Koloniebildungstest und Comet Assay (mit Pearson'schem Maßkorrelationskoeffizient r und Irrtumswahrscheinlichkeit α)	64
Tab. 9	D <sub>37</sub> -Werte der Überlebenskurven nach <sup>125</sup> IUdR- und <sup>125</sup> I-AP-Exposition	76
Tab. 10	Vergleich der OTM-Werte bei 1000 d/c nach <sup>125</sup> IUdR- und <sup>125</sup> I-AP-Exposition	78

---

Tab. 11	Relative Häufigkeiten (%) der OTM-Werte nach $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung der T1- und 86HG-39-Zellen	80
Tab. 12	Relative Häufigkeiten (%) der OTM-Werte nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in T1-Zellen und Akkumulation der Zerfälle bei $-196^\circ\text{C}$	80
Tab. 13	Relative Häufigkeiten (%) der OTM-Werte nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation in 86HG-39-Zellen und Akkumulation der Zerfälle bei $-196^\circ\text{C}$	81
Tab. 14	Vergleich der OTM-Werte bei 1000 d/c in T1-Zellen nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen	82
Tab. 15	Gegenüberstellung der Methodik von Koloniebildungstest und Comet Assay	85
Tab. 16	Literaturübersicht zur gesamten Elektronenenergie pro $^{125}\text{I}$ -Zerfall	88
Tab. 17	Dosis pro $^{125}\text{I}$ -AP-Zerfall in T1- und 86HG-39-Zellen	89
Tab. 18	Vergleich der biologischen Wirksamkeit von $^{125}\text{IUdR}$ , $^{125}\text{I}$ -AP und $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ am Beispiel des klonogenen Überlebens von T1-Zellen	90
Tab. 19	Vergleich der biologischen Wirksamkeit von $^{125}\text{IUdR}$ , $^{125}\text{I}$ -AP und $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ am Beispiel des klonogenen Überlebens von 86HG-39-Zellen	90
Tab. 20	Vergleich der biologischen Wirksamkeit von $^{125}\text{IUdR}$ , $^{125}\text{I}$ -AP und $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ am Beispiel der DNA-Schädigung von T1-Zellen	91
Tab. 21	Literaturvergleich: Dosisberechnungen pro $^{125}\text{IUdR}$ -Zerfall im Zellkern	93
Tab. 22	Literaturvergleich: Dosisberechnungen für $^{125}\text{IUdR}$ bezüglich der 37%-Überlebensfraktion	93

## Anhang

### Datentabellen zum Ergebnisteil

1. Meßdaten der Wachstumskurven von T1- und 86HG-39-Zellen (vgl. Abb. 7)

T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
Zeit (h)	Zellzahl	Zeit (h)	Zellzahl
0	0,300	0	0,300
18	0,427	24	0,327
24	0,501	41	0,497
42	0,770	48	0,589
48	0,851	65	0,828
66	1,260	72	1,022
72	1,330	96	1,545
91	2,022	120,5	2,407
113,5	2,443	144	2,748
138,5	3,095	161	2,905
162	2,900	168	3,118
186	2,517	185	3,055
		209	3,154
		233	2,988

2. Phasenverteilung (%) der T1- und 86HG-39-Zellen im Zellzyklus in Abhängigkeit vom Wachstumsalter (vgl. Abb. 19+20)

Zelltyp	Alter (Tage)	G1/ G0-Phase	S-Phase	G2/ M-Phase
<b>T1</b>	3	54,3	16,9	28,8
	4	35,6	26,8	37,6
	4	45,6	17,4	37,1
	5	57,8	21,0	21,2
	5	44,3	17,3	38,4
	6	49,1	29,4	21,5
	6	63,7	22,7	13,6
	7	43,5	23,6	32,9
	7	40,2	23,3	36,5
	7	31,3	28,5	40,1
	8	32,7	35,9	31,4
<b>86HG-39</b>	4	69,0	23,9	7,1
	7	91,1	5,4	3,6
	7	89,4	7,2	3,4
	7	87,7	7,1	5,2
	8	77,4	9,0	13,6
	8	85,3	10,0	4,7
	8	88,5	7,8	3,7

3. Mittelwerte der Viabilitätsraten beim Farbttest auf Lebensfähigkeit bei T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (n = 10; vgl. Abb. 21)

Dosis (Gy)	T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
	Viabilitätsrate (%)	$\pm SE$	Viabilitätsrate (%)	$\pm SE$
0	100,00	2,07	100,00	1,36
1	98,07	1,81	-	-
2	100,40	1,12	96,42	1,44
5	97,18	1,69	94,72	1,84
10	94,05	1,40	93,59	1,07
15	92,27	1,88	94,82	1,62
20	87,91	2,46	90,84	2,13

4. AChE-Aktivitätsrate des Standards aus Rinder-Erythrozyten ( $\mu\text{Mol}$  Substrat hydrolysiert pro Minute und ml Probe) in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium (n = 3; vgl. Abb. 22)

AChE ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	AChE-Aktivitätsrate	$\pm SE$
0	0,497	0,164
0,01	5,429	0,124
0,025	12,006	0,124
0,05	24,471	0,242
0,1	45,921	0,446
0,15	67,447	0,696

5. Mittelwerte der AChE-Aktivitätsraten ( $\mu\text{Mol}$  Substrat hydrolysiert pro Minute und g Protein) von T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (n = 10; vgl. Abb. 23)

Dosis	T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
	Aktivitätsrate	$\pm SE$	Aktivitätsrate	$\pm SE$
0	0,886	0,179	3,025	0,327
1	0,853	0,094	-	-
2	0,745	0,159	3,013	0,381
5	0,854	0,059	3,203	0,386
10	0,795	0,079	2,995	0,375
30	0,846	0,177	2,861	0,377

6. Überlebensfraktionen (SF) der T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (n = 9; vgl. Abb. 24)

Dosis	T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
	SF (%)	$\pm SE$	SF (%)	$\pm SE$
0	100	1,18	100	1,64
1	62,83	1,91	70,07	2,34
1,5	39,30	1,12	-	-
2	34,05	3,00	56,24	3,00
3	10,17	0,61	-	-
5	2,79	0,84	12,93	0,35
7	0,31	0,12	-	-
10	0,023	0,01	0,32	0,03
15	-	-	0,0003	0,00

7. OTM der T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (n = 200; vgl. Abb. 25)

Dosis (Gy)	T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
	OTM	$\pm SE$	OTM	$\pm SE$
0	1,00	0,04	1,00	0,04
0,5	1,53	0,09	-	-
1	1,94	0,07	-	-
2	2,81	0,06	2,32	0,07
3	4,26	0,12	-	-
4	5,31	0,09	3,79	0,14
8	9,98	0,15	7,26	0,20
10	12,80	0,21	8,07	0,30

8. OTM der T1-Zellen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (4 Gy) und anschließender Reparatur bei 37°C (n = 200; vgl. Abb. 27)

Zeit (min)	T1-Zellen	86HG-39-Zellen
	DNA-Schaden (%)	DNA-Schaden (%)
0	100	100
2	68,44	61,39
4	51,06	55,99
5	60,73	42,48
6	34,88	29,32
8	26,97	-
10	37,62	-
10,5	33,66	-
15	21,67	-
20	17,77	-
20,5	23,06	-
25	14,02	-
30	12,32	-

9. ds-DNA-Fractionen von T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Bestrahlung (n = 2-3; vgl. Abb. 28)

Dosis (Gy)	T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
	ds-DNA %	$\pm SE$	ds-DNA %	$\pm SE$
0	74,10	6,36	85,72	5,25
2	55,30	5,66	81,07	8,25
4	45,85	4,45	75,93	4,92
6	35,70	2,83	68,54	2,35
8	31,30	2,55	59,76	13,23
10	23,55	0,35	58,43	0,00

10.  $^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporationskinetik von T1- und 86HG-39-Zellen: Aktivität pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit (vgl. Abb. 29)

Zeit (h)	Aktivität (mBq/ Zelle)	
	T1-Zellen	86HG-39-Zellen
0	0	0
1	0,26	0,33
2	0,48	0,50
4	0,74	0,78
5	1,04	0,77
6	-	1,01
7	1,11	0,94
8	-	0,91
9	1,15	0,96
24	1,41	-

11.  $^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporationskinetik mit Mediumwechsel (MW) am Beispiel der T1-Zellen: Aktivität pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit (n = 3; vgl. Abb. 30)

Zeit (h)	Aktivität (mBq/ Zelle)					
	1x MW	$\pm SE$	2x MW	$\pm SE$	3x MW	$\pm SE$
0	0		0		0	
9	1,887	0,259	-	-	-	-
23	-	-	3,756	0,241	-	-
30	1,314	0,056	3,201	0,019	5,310	0,056

12.  $^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporation von T1- und 86HG-39-Zellen in Abhängigkeit von der radioaktiven Konzentration im Medium (vgl. Abb. 31)

Konzentration (kBq/ ml)	Aktivität (mBq/ Zelle)	
	T1-Zellen	86HG-39-Zellen
0	0	0
1,85	5,77	6,59
3,85	13,80	15,32
7,47	-	39,18
7,77	29,30	-
11,21	-	54,21
11,40	41,77	-

13.  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation bei verschiedenen FUdR- und CdR-Konzentrationen am Beispiel der 86HG-39-Zellen (vgl. Abb. 32)

Zeit (Stunden)	FUdR/ CdR-Konzentration				
	Ko	$10^{-10}$ M	$10^{-9}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-7}$ M
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,48	0,52	0,89	1,85	2,29
24	1,07	2,92	3,22	6,11	6,03

14. Überlebensfraktionen der T1-Zellen nach Inkubation mit FUdR- und CdR (n = 3; vgl. Abb. 33)

Konzentration	SF (%)	$\pm$ SE
Kontrolle	100	3,11
$10^{-8}$ M FUdR	90,88	1,38
$10^{-7}$ M FUdR	85,56	3,11
$10^{-6}$ M FUdR	17,90	1,61
$10^{-8}$ M CdR	97,33	2,10
$10^{-7}$ M CdR	81,75	0,65
$10^{-6}$ M CdR	84,98	3,57

15. Überlebensfraktionen der T1- und 86HG-39-Zellen nach Exposition mit FUdR, CdR und IUdR (n = 3; vgl. Abb. 34)

Konzentration	T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
	SF (%)	$\pm$ SE	SF (%)	$\pm$ SE
Kontrolle	100	6,31	100	3,00
$10^{-8}$ M FUdR/ CdR	116,60	3,03	126,90	1,51
$10^{-8}$ M FUdR/ CdR + $10^{-12}$ M IUdR	94,63	1,86	129,50	1,35
$10^{-6}$ M FUdR/ CdR + $10^{-12}$ M IUdR	52,10	1,10	19,50	1,51

16. OTM der T1- und 86HG-39-Zellen nach Exposition mit FUdR, CdR und IUdR (n = 200; vgl. Abb. 35)

Konzentration	T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
	OTM	$\pm$ SE	OTM	$\pm$ SE
Kontrolle	1,000	0,048	1,000	0,050
$10^{-8}$ M FUdR/ CdR	1,101	0,052	1,332	0,080
$10^{-8}$ M FUdR/ CdR + $10^{-12}$ M IUdR	0,992	0,048	1,049	0,095
$10^{-6}$ M FUdR/ CdR + $10^{-12}$ M IUdR	2,244	0,128	1,355	0,091

17. Überlebensfraktionen der T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporation im Standardverfahren (n = 3; vgl. Abb. 36)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
d/c	SF (%)	$\pm SE$	d/c	SF (%)	$\pm SE$
<b>0</b>	100,00	1,80	<b>0</b>	100,00	3,54
<b>36</b>	67,20	2,00	<b>54</b>	27,40	0,56
<b>70</b>	37,43	1,99	<b>91</b>	52,13	0,69
<b>78</b>	40,43	2,20	<b>92</b>	9,00	0,64
<b>141</b>	23,73	0,70	<b>137</b>	23,53	2,32
<b>272</b>	19,60	1,20	<b>196</b>	7,70	0,30
<b>312</b>	14,47	0,30	<b>220</b>	3,00	0,20
<b>340</b>	13,73	0,98	<b>301</b>	18,00	0,91
<b>373</b>	9,10	0,50	<b>401</b>	3,00	0,60
<b>647</b>	7,15	0,35	<b>444</b>	9,43	0,63
<b>710</b>	6,30	0,40	<b>626</b>	1,23	0,09
<b>1520</b>	5,40	0,60	<b>837</b>	1,63	0,73
<b>3246</b>	4,70	0,20	<b>1501</b>	1,93	0,41

18. OTM der T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{125}\text{I}$ UdR-Inkorporation im Standardverfahren (n = 200; vgl. Abb. 37)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
d/c	OTM	$\pm SE$	d/c	OTM	$\pm SE$
<b>0</b>	1,000	0,044	<b>0</b>	1,000	0,044
<b>36</b>	1,053	0,045	<b>54</b>	1,142	0,045
<b>70</b>	1,139	0,048	<b>91</b>	1,004	0,039
<b>78</b>	1,293	0,059	<b>92</b>	1,113	0,052
<b>141</b>	1,363	0,051	<b>137</b>	1,015	0,043
<b>272</b>	1,308	0,055	<b>196</b>	1,157	0,047
<b>312</b>	1,465	0,049	<b>220</b>	1,172	0,045
<b>340</b>	1,443	0,047	<b>301</b>	1,138	0,042
<b>373</b>	1,269	0,044	<b>401</b>	1,541	0,058
<b>647</b>	1,467	0,048	<b>444</b>	1,041	0,052
<b>710</b>	1,342	0,048	<b>626</b>	1,358	0,047
<b>1520</b>	1,742	0,072	<b>837</b>	1,625	0,063
<b>3246</b>	2,368	0,101	<b>1501</b>	1,825	0,070

19. Überlebensfraktionen der T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{125}\text{I}$ UdR-Inkubation für 1 ½ Verdopplungszeiten (n = 3; vgl. Abb. 38)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
d/c	SF (%)	$\pm SE$	d/c	SF (%)	$\pm SE$
<b>0</b>	100,00	2,54	<b>0</b>	100,00	4,12
<b>390</b>	3,77	0,38	<b>147</b>	4,40	0,15
<b>688</b>	0,96	0,25	<b>376</b>	0,77	0,12
<b>1416</b>	1,70	0,06	<b>630</b>	0,27	0,09
<b>1440</b>	0,76	0,11	<b>779</b>	0,50	0,10
<b>2323</b>	0,63	0,03	<b>987</b>	0,50	0,06
<b>2502</b>	0,63	0,11	<b>1611</b>	0,37	0,03
<b>5033</b>	0,50	0,00	<b>2832</b>	0,30	0,00
<b>5571</b>	0,40	0,00	<b>3078</b>	0,37	0,03

20. OTM der T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkubation für 1½ Verdopplungszeiten (n = 200; vgl. Abb. 39)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
d/c	OTM	$\pm SE$	d/c	OTM	$\pm SE$
<b>0</b>	1,000	0,051	<b>0</b>	1,000	0,042
<b>390</b>	1,246	0,064	<b>147</b>	1,025	0,064
<b>688</b>	1,506	0,090	<b>376</b>	1,140	0,075
<b>1416</b>	1,366	0,062	<b>630</b>	1,156	0,045
<b>1440</b>	1,812	0,103	<b>779</b>	1,038	0,043
<b>2323</b>	1,652	0,078	<b>987</b>	1,141	0,056
<b>2502</b>	1,776	0,016	<b>1611</b>	1,290	0,049
<b>5033</b>	2,143	0,107	<b>2832</b>	1,570	0,053
<b>5571</b>	2,303	0,091	<b>3078</b>	1,337	0,054

21. OTM der T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation und Akkumulation der Zerfälle bei  $-196^\circ\text{C}$  (n = 200; vgl. Abb. 40)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
d/c	OTM	$\pm SE$	d/c	OTM	$\pm SE$
<b>0</b>	1,000	0,051	<b>0</b>	1,000	0,041
<b>453</b>	1,751	0,057	<b>803</b>	1,854	0,110
<b>1087</b>	2,804	0,097	<b>1928</b>	3,276	0,201
<b>1655</b>	3,704	0,210	<b>2935</b>	5,588	0,282
<b>2179</b>	6,388	0,266	<b>3864</b>	5,794	0,260

22. ds-DNA-Fractionen der T1- und 86HG-39-Zellen nach  $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation (vgl. Abb. 41)

T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
d/c	ds-DNA-Fraktion (%)	d/c	ds-DNA-Fraktion (%)
<b>0</b>	95,8	<b>0</b>	92,9
<b>266</b>	95,6	<b>235</b>	92,1
<b>467</b>	95,1	<b>236</b>	96,5
<b>481</b>	94,8	<b>478</b>	92,0
<b>962</b>	93,0	<b>494</b>	94,6
<b>976</b>	93,0	<b>942</b>	92,8
<b>1268</b>	91,9	<b>955</b>	95,0
<b>1679</b>	84,7	<b>1611</b>	84,9
<b>2146</b>	87,7	<b>1725</b>	92,0

23. Überlebensfraktionen der T1- und 86HG-39-Zellen nach 28 h Exposition mit Antipyrin (n = 3; vgl. Abb. 42)

Konzentration	T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
	SF (%)	$\pm SE$	SF (%)	$\pm SE$
<b>Kontrolle</b>	100	2,63	100	2,40
<b><math>10^{-8}</math> M</b>	106,20	7,05	82,33	4,95
<b><math>10^{-7}</math> M</b>	106,60	7,64	103,60	5,40
<b><math>10^{-6}</math> M</b>	107,23	6,07	92,77	11,98

24. OTM der T1- und 86HG-39-Zellen nach 28 h Exposition mit Antipyrin (n = 200; vgl. Abb. 43)

Konzentration	T1-Zellen		86HG-39-Zellen	
	OTM	$\pm SE$	OTM	$\pm SE$
Kontrolle ohne Zusätze	1,000	0,060	1,000	0,068
$10^{-8}$ M	1,046	0,079	0,922	0,058
$10^{-7}$ M	0,796	0,060	0,876	0,050
$10^{-6}$ M	0,997	0,078	0,891	0,061

25. Überlebensfraktionen der T1- und 86HG-39-Zellen nach Exposition mit  $^{125}$ I-AP (n = 3; vgl. Abb. 44)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
d/c	SF (%)	$\pm SE$	d/c	SF (%)	$\pm SE$
<b>0</b>	100,00	2,51	<b>0</b>	100,00	5,32
<b>275</b>	102,63	2,38	<b>320</b>	86,37	1,78
<b>313</b>	95,20	4,02	<b>446</b>	76,87	2,63
<b>550</b>	79,73	1,53	<b>607</b>	70,70	2,36
<b>604</b>	84,27	3,20	<b>871</b>	50,30	3,82
<b>825</b>	42,67	2,22	<b>921</b>	47,00	4,54
<b>957</b>	64,03	1,90	<b>1185</b>	32,53	3,44
<b>1100</b>	29,00	0,72	<b>1862</b>	13,10	1,20
<b>1110</b>	44,10	3,24			
<b>1293</b>	36,87	2,43			
<b>1710</b>	20,10	1,72			

26. OTM der T1- und 86HG-39-Zellen nach Exposition mit  $^{125}$ I-AP (n = 200; vgl. Abb. 45)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
d/c	OTM	$\pm SE$	d/c	OTM	$\pm SE$
<b>0</b>	1,000	0,045	<b>0</b>	1,000	0,045
<b>313</b>	1,193	0,056	<b>320</b>	1,199	0,062
<b>604</b>	1,315	0,053	<b>607</b>	1,141	0,052
<b>957</b>	1,221	0,061	<b>871</b>	1,309	0,057
<b>1100</b>	1,523	0,107	<b>1185</b>	1,244	0,070
<b>1293</b>	1,395	0,117			
<b>1710</b>	1,666	0,151			

27. OTM der T1-Zellen nach Akkumulation der  $^{125}$ I-AP-Zerfälle auf Eis (n = 200; vgl. Abb. 46)

d/c	OTM	$\pm SE$
<b>0</b>	1,000	0,042
<b>794</b>	1,377	0,063
<b>1588</b>	2,905	0,229
<b>2351</b>	4,229	0,190
<b>2931</b>	5,214	0,240

28. Überlebensfraktionen der T1- und 86HG-39-Zellen nach 30 h Na<sup>125</sup>I-Exposition mit Mediumwechsel (n = 3; vgl. Abb. 47)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
kBq/ ml	SF (%)	± SE	kBq/ ml	SF (%)	± SE
<b>0</b>	100	1,17	<b>0</b>	100	1,21
<b>1,85</b>	96,85	2,65	<b>0,19</b>	105,00	0,90
<b>3,70</b>	99,80	5,16	<b>2,89</b>	99,83	3,47
<b>6,51</b>	97,37	3,54	<b>3,70</b>	95,47	9,34
<b>7,40</b>	84,37	1,22	<b>5,37</b>	105,73	7,15
<b>12,99</b>	91,17	0,50	<b>7,40</b>	87,30	13,94
<b>14,80</b>	92,30	2,10	<b>9,14</b>	88,10	4,86
<b>19,24</b>	105,07	0,50	<b>11,95</b>	65,10	2,82
<b>25,90</b>	97,63	2,00	<b>14,80</b>	74,63	6,83

29. OTM der T1- und 86HG-39-Zellen nach 30 h Na<sup>125</sup>I-Exposition mit Mediumwechsel (n = 200; vgl. Abb. 48)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
kBq/ ml	OTM	± SE	kBq/ ml	OTM	± SE
<b>0</b>	1,000	0,050	<b>0</b>	1,000	0,041
<b>1,85</b>	0,938	0,039	<b>1,85</b>	1,058	0,041
<b>3,70</b>	1,021	0,040	<b>2,89</b>	1,065	0,044
<b>6,51</b>	0,939	0,079	<b>3,70</b>	1,097	0,043
<b>7,40</b>	0,962	0,041	<b>5,37</b>	0,999	0,049
<b>12,99</b>	0,855	0,045	<b>7,40</b>	1,056	0,045
<b>14,80</b>	0,932	0,041	<b>9,14</b>	1,280	0,056
<b>19,24</b>	0,895	0,041	<b>11,95</b>	1,182	0,052
<b>25,97</b>	0,714	0,033	<b>14,80</b>	0,987	0,040

30. Überlebensfraktionen der T1- und 86HG-39-Zellen nach 28 h Na<sup>125</sup>I-Exposition ohne Mediumwechsel (n = 3; vgl. Abb. 49)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
MBq/ ml	SF (%)	± SE	MBq/ ml	SF (%)	± SE
<b>0</b>	100	0,49	<b>0</b>	100	2,17
<b>1,30</b>	91,77	2,26	<b>1,20</b>	115,30	5,58
<b>2,66</b>	69,83	1,11	<b>2,44</b>	109,73	2,72
<b>3,89</b>	85,83	3,53	<b>3,68</b>	95,53	7,42
<b>5,18</b>	65,47	0,57	<b>4,94</b>	89,27	5,57

31. OTM der T1- und 86HG-39-Zellen nach 28 h Na<sup>125</sup>I-Exposition ohne Mediumwechsel (n = 200; vgl. Abb. 50)

T1-Zellen			86HG-39-Zellen		
MBq/ ml	OTM	± SE	MBq/ ml	OTM	± SE
0	1,000	0,051	0	1,000	0,042
1,295	1,279	0,073	1,203	1,082	0,042
2,664	1,146	0,055	2,442	0,978	0,047
3,885	1,142	0,046	3,682	1,008	0,041
5,180	1,238	0,053	4,940	0,869	0,040

32. OTM der T1-Zellen nach Modifikationen der Methodik (n = 200; vgl. Abb. 51)

<b>mod. Methode</b>	<b><math>\gamma</math>-Bestrahlung</b>	<b>OTM</b>	<b><math>\pm SE</math></b>
<b>normal (1)</b>	<b>Kontrolle</b>	1,000	0,072
	<b>4 Gy</b>	3,554	0,082
<b>35 min Unwinding (2)</b>	<b>Kontrolle</b>	1,084	0,114
	<b>4 Gy</b>	4,392	0,120
<b>35 min Elektrophorese (3)</b>	<b>Kontrolle</b>	1,427	0,078
	<b>4 Gy</b>	7,797	0,202
<b>Elektrophorese mit 1V/ cm (4)</b>	<b>Kontrolle</b>	1,527	0,085
	<b>4 Gy</b>	9,941	0,225

## Literaturverzeichnis

- Aberg T.:** Theory of the radiative Auger effect. *Phys. Rev. A4*, 1735-1740 (1971).
- Adelstein S.J., Kassis A.I.:** Strand breaks in plasmid DNA following positional changes of Auger-electron-emitting radionuclides. *Acta Oncol.* 35 (7), 797-802 (1996).
- Ahnström G., Erixon K.:** Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxylapatit chromatography in: *DNA repair, Friedman E.C. (Ed.), 403-418, Freeman, New York (1981).*
- Ahnström G., Erixon K.:** Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution. *Int. J. Radiat. Biol.* 23 (3), 285-289 (1973).
- Alpen E.L.:** Radiation Biophysics. *Prentice Hall Biophysics and Bioengineering Series, Englewood Cliffs, New Jersey, USA (1990).*
- Bagshawe K.D., Surinder K.S., Southall P.J. et al.:** Selective uptake of toxic nucleoside ( $^{125}\text{I}$ UdR) by resistant cancer. *Br. J. Radiol.* 64, 37-44 (1991).
- Bambynek W., Behrend H., Chen M.H. et al.:** Orbital electron capture by the nucleus. *Rev. Mod. Phys.* 49, 77-221 (1977).
- Bambynek W., Crasemann B., Fink R.W. et al.:** X-ray fluorescence yields, Auger, and Coster-Kronig transition probabilities. *Rev. Mod. Phys.* 44 (4), 716-813 (1972).
- Baranowska-Kortylewicz J., Kortylewicz Z.P., Hoffman D. et al.:** Colon-specific prodrugs of 5-radioiodo-2'-deoxyuridine. *Acta Oncol.* 35 (7), 959-964 (1996).
- Baugnet-Mahieu L., Goutier R.:** Mechanisms responsible for the low incorporation into DNA of the thymidine analogue, 5-Iododeoxyuridine. *Biochem. Pharmacol.* 17, 1017-1023 (1968).
- Bilzer T., Stavrou D., Dahme E. et al.:** Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro. *Virchows Archiv of Pathological Anatomy*, 418, 281-293 (1991).
- Bishayee A., Rao D.V., Howell R.W.:** Radiation protection by cysteamine against the lethal effects of intracellularly localized Auger electron,  $\alpha$ - and  $\beta$ -particle emitting radionuclides. *Acta Oncol.* 39 (6), 713-720 (2000).
- Bloomer W.D., McLaughlin W.H., Milius R.A., Weichselbaum R.R., Adelstein S.J.:** Estrogen receptor-mediated cytotoxicity using iodine-125. *J. Cell. Biochem.* 21, 39-45 (1983).
- Bloomer W.D., McLaughlin W.H., Weichselbaum R.R. et al.:** The role of subcellular localization in assessing the cytotoxicity of Iodine-125 labeled iododeoxyuridine, iodotamoxifen, and iodoantipyrine. *J. Radioanal. Chem.* 65, 209-221 (1981).
- Bradley E., Chan P., Adelstein S.J.:** The radiotoxicity of Iodine-125 in mammalian cells. I. Effects on the survival curve of radioiodine incorporated into DNA. *Radiat. Res.* 64, 555-563 (1975).
- Burki J., Roots R., Feinendegen L.E., Bond V.P.:** Inactivation of mammalian cells after disintegrations of  $^3\text{H}$  or  $^{125}\text{I}$  in cell DNA at  $-196^\circ\text{C}$ . *Int. J. Radiat. Biol.* 24 (4), 363-375 (1973).
- Chan P., Lisco E., Lisco H., Adelstein S.J.:** The radiotoxicity of Iodine-125 in mammalian cells. II. A comparative study on cell survival and cytogenetic responses to  $^{125}\text{I}$ UdR,  $^{131}\text{I}$ UdR and  $^3\text{H}$ TdR. *Radiat. Res.* 67, 332-343 (1976).
- Charlton D.E., Booz J.:** A Monte Carlo treatment of the decay of  $^{125}\text{I}$ . *Radiat. Res.* 87, 10-23 (1981).

- Cividalli G.:** Effect of gamma-irradiation on glucose utilisation, glutathione, and electrolyte content of the human erythrocyte. *Radiat. Res.* 20, 564-576 (1963).
- Commerford S.L.,** Bond V.P., Cronkite E.P.: Radiotoxicity of intranuclear <sup>125</sup>I-atoms not bound to DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 37 (5), 547-554 (1980).
- Danenberg P.V.:** Thymidilate synthetase – a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* 473, 73-92 (1977).
- Deschavanne P.J., Fertil B.:** A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34 (1), 251-266 (1996).
- DeSombre E.R.,** Hughes A, Hanson R.N., Kearney T.: Therapy of estrogen receptor-positive micrometastases in the peritoneal cavity with Auger electron-emitting estrogens – Theoretical and practical considerations. *Acta Oncol.* 39 (6), 659-666 (2000).
- Dikomey E.,** Dahm-Daphi J., Brammer I. et al.: Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 73 (3), 269-278 (1998).
- Dikomey E., Franzke J.:** Three classes of DNA strand breaks induced by X-irradiation and internal  $\beta$ -rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 50 (5), 893-908 (1986).
- Dikomey E.:** Effect of hyperthermia at 42 and 45°C on repair of radiation-induced DNA strand breaks in CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 41 (6), 603-614 (1982).
- Edwards J.C.,** Chapman D., Cramp W.A., Yatvin M.B.: The effects of ionizing radiation on biomembrane structure and function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 43, 71-93 (1984).
- Ehrfeld A.,** Planas-Bohne F., Lücke-Huhle C.: Amplification of Oncogenes and integrated SV40 sequences in mammalian cells by the decay of incorporated iodine-125. *Radiat. Res.* 108, 43-51 (1986).
- Ellman G.L.,** Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95 (1961).
- Evans H.J.:** Actions of radiations on human chromosomes. *Phys. Med. Biol.* 17, 1-13 (1972).
- Fairbairn D.W.,** Olive P.L., O'Neill K.L.: The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Res.* 339, 37-59 (1995).
- Feinendegen L.E.:** Biological damage from the Auger effect, possible benefits. *Rad. Environm. Biophys.* 12, 5-99 (1975).
- Frankenberg-Schwager M.,** Ruis C., Wolf H. et al.: Double-strand breaks formed as intermediates during DNA crosslink processing are rejoined by homologous recombination. *Proceedings des 10. Symposiums, Experimentelle Strahlentherapie und klinische Strahlenbiologie, Band 10*, 33 (2001).
- Frankenberg-Schwager M.:** Review of repair kinetics for DNA damage induced in eucariotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother. Oncol.* 14, 307-320 (1989).
- Geselowitz D.,** McMannaway M.E., Hofer K.G., Neumann R.D.: The cytotoxicity of decays of tritium and iodine-125 incorporated in DNA of mammalian cells. Implications for the low-LET dosimetry of incorporated nuclides. *Radiat. Res.* 142, 321-326 (1995).
- Goddu S.M.,** Narra V.R., Harapanhalli R.S. et al.: Radioprotection by DMSO against the biological effects of incorporated radionuclides in vivo – Comparison with other radioprotectors and evidence for indirect action of Auger electrons. *Acta Oncol.* 35 (7), 901-908 (1996).

- Hall E.J.:** Radiobiology for the Radiobiologist. 4<sup>th</sup> Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA (1994).
- Harrison K.A., Dalrymple G.V., Baranowska-Kortylewicz J. et al.:** Radiolabeled iododeoxyuridine: safety evaluation. *J. Nucl. Med.* 37 (Suppl.), 13S-16S (1996).
- Herrmann Th., Baumann M.:** Klinische Strahlenbiologie. 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena (1997).
- Hofer K., Lin X., Bao S.-P.:** DNA damage, micronucleus formation and cell death from <sup>125</sup>I decays in DNA. *Acta Oncol.* 35 (7), 825-832 (1996).
- Hofer K., Lin X., Schneiderman M.H.:** Paradoxical effects of iodine-125 decays in parent and daughter DNA: A new target model for radiation damage. *Radiat. Res.* 153, 428-435 (2000).
- Hofer K.G., Bao S.-P.:** Low-LET and high-LET radiation action of <sup>125</sup>I decays in DNA: effect of cysteamine on micronucleus formation and cell killing. *Radiat. Res.* 141, 183-192 (1995).
- Hofer K.G.:** Biophysical aspects of Auger processes. *Acta Oncol.* 39 (6), 651-658 (2000).
- Howell R.W.:** Radiation spectra for Auger-electron emitting radionuclides: Report No. 2 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Med. Phys.* 19 (6), 1371-1383 (1992).
- Humm J.L., Howell R.W., Rao D.V.:** Dosimetry of Auger-electron-emitting radionuclides: Report No. 3 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Med. Phys.* 21 (12), 1901-1915 (1994).
- Humm J.L., Macklis R.M., Lu X.O. et al.:** The spatial accuracy of cellular dose estimates obtained from 3D reconstructed tissue autoradiographs. *Phys. Med. Biol.* 40, 163-180 (1995).
- Humm J.L.:** The analysis of Auger electrons released following the decay of radioisotopes and photoelectric interactions and their contribution to energy deposition. *Bericht der Kernforschungsanlage Jülich, Jül-1932* (1984).
- Isacoff W.H., Borud K.:** Chemotherapy for the treatment of patients with metastatic colorectal cancer: an overview. *World J. Surg.* 21, 748-762 (1997).
- Kandaiya S., Lobachevsky P.N., D'Cunha G., Martin R.F.:** DNA strand breakage by <sup>125</sup>I-decay in a synthetic oligodeoxynucleotide: 1. Fragment distribution and evaluation of DMSO protection effect. *Acta Oncol.* 37 (7), 803-808 (1996).
- Karamychev V.N., Panyutin I.G., Reed M.W., Neumann R.D.:** Effect of radionuclide linker structure on DNA cleavage by <sup>125</sup>I-labeled oligodeoxynucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 549-557 (1997).
- Kassis A.I., Adelstein S.J.:** Preclinical animal studies with radioiododeoxyuridine. *J. Nucl. Med.* 37 (Suppl.), 10S-12S (1996).
- Kassis A.I., Adelstein S.J.:** Radiotoxicity of <sup>75</sup>Se and <sup>35</sup>Se: Theory and application to a cellular model. *Radiat. Res.* 84, 407-425 (1980).
- Kassis A.I., Dahman B.A., Adelstein S.J.:** In vivo therapy of neoplastic meningitis with methotrexate and 5-[<sup>125</sup>I]iodo-2'-deoxyuridine. *Acta Oncol.* 39 (6), 731-737 (2000 a).
- Kassis A.I., Fayad F., Kinsey B.M. et al.:** Radiotoxicity of <sup>125</sup>I in mammalian cells. *Radiat. Res.* 111, 305-318 (1987 a).
- Kassis A.I., Harapanhalli R.S., Adelstein S.J.:** Comparison of strand breaks in plasmid DNA after positional changes of Auger Electron-emitting Iodine-125. *Radiat. Res.* 151, 167-176 (1999).

- Kassis A.I.**, Sastry A., Adelstein S.: Kinetics of uptake, retention, and radiotoxicity of  $^{125}\text{I}$ UdR in mammalian cells: implications of localized energy deposition by Auger processes. *Radiat. Res.* 109, 78-89 (1987 b).
- Kassis A.I.**, Tumei S. S., Wen P.Y.C. et al.: Intratumoral administration of 5- $^{123}\text{I}$ ]iododeoxyuridine in a patient with a brain tumor. *J. Nucl. Med.* 37 (Suppl.), 19S-22S (1996).
- Kassis A.I.**, Walicka M.A., Adelstein S.J.: Double-strand break yield following  $^{125}\text{I}$  decay – Effects of DNA conformation. *Acta Oncol.* 39 (6), 721-726 (2000 b).
- Kiefer J.**: Biologische Strahlenwirkung. 2. Auflage, Birkhäuser Verlag, Berlin (1989).
- Klaude M.**, Eriksson S., Nygren J., Ahnström G.: The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Res.* 363, 89-96 (1996).
- Klecher R.W. Jr.**, Jenkins J.F., Kinselle T.J. et al.: Clinical pharmacology of 5-iodo-2'-deoxyuridine and 5-iodouracil and endogenous pyrimidine modulation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 38, 45-51 (1985).
- Köhler W.**, Schachtel G., Volekse P.: Biostatistik. Springer-Verlag, Berlin (1992).
- Kong S.**, Davison A.J., Bland J.: Actions of gamma-radiation on resealed erythrocyte ghosts. A comparison with intact erythrocytes and a study of the effects of oxygen. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 40 (1), 19-29 (1981).
- Konings A.W.T.**, Drijver E.B.: Radiation effects on membranes, I. Vitamin E deficiency and lipid peroxidation. *Radiat. Res.* 80, 494-501 (1979).
- Köteles G.J.**: New aspects of cell membrane radiobiology and their impact on radiation protection. *Atomic Energy Review* 17 (1), 3-30 (1979).
- LeMotte P.K.**, Little J.B.: DNA damage induced in human diploid cells by decay of incorporated radionuclides. *Cancer Research* 44, 1337-1342 (1984).
- Liber H.**, LeMotte P., Little J.: Toxicity and mutagenicity of X-rays and  $^{125}\text{I}$ ]dUrd or  $^3\text{H}$ ]TdR incorporated in the DNA of human lymphoblast cells. *Mutation Res.* 111, 387-404 (1983).
- Ljungman M.**: Rapid communication. Repair of radiation-induced DNA strand breaks does not occur preferentially in transcriptionally active DNA. *Radiat. Res.* 152, 444-449 (1999).
- Lobachevsky P.N.**, Martin R.F.: DNA strand breakage by  $^{125}\text{I}$ -decay in a synthetic oligodeoxynucleotide: 2. Quantitative analysis of fragment distribution. *Acta Oncol.* 37 (7), 808-816 (1996).
- Lodish H.**, Baltimore D., Berk A. et al: Molekulare Zellbiologie. 2. Auflage, W. de Gruyter, Berlin (1996).
- Makrigiorgos G.**, Adelstein S.J., Kassis A.I.: Auger electron emitters: insights gained from in vitro experiments. *Radiat. Environ. Biophys.* 29, 75-91 (1990).
- Mariani G.**, DiSacco S., Bonini R. et al.: Biochemical modulation by 5-fluorouracil and 1-folinic acid of tumor uptake of intra-arterial 5- $^{123}\text{I}$ ]iodo-2'-deoxyuridine in patients with liver metastases from colorectal cancer. *Acta Oncol.* 35 (7), 941-945 (1996).
- Martin R.F.**, Bradley T.R., Hodgson G.S.: Cytotoxicity of an  $^{125}\text{I}$ -labeled DNA-binding compound that induces double-stranded DNA breaks. *Cancer Res.* 39, 3244-3247 (1979).
- Martin R.F.**, Haseltine W.A.: Range of radiochemical damage to DNA with decay of iodine-125. *Science* 213 (21), 896-898 (1981).

- Martin R.F.:** Induction of double-strand breaks in DNA by binding with  $^{125}\text{I}$ -labelled acridine. *Int. J. Radiat. Biol.* 32 (5), 491-497 (1977).
- McAteer J.A., Davis J.M.:** Basic cell culture technique and maintenance of cell lines in: *Basic cell culture – A practical approach*. Davis J.M. (Hrsg.), 120-140, Oxford University Press, Oxford (1994).
- McKelvey-Martin, Green M.H.L., Schmezer P. et al.:** The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Res.* 288, 47-63 (1993).
- Mester J., DeGoeij K., Sluysen M.:** Modulation of  $[5-^{125}\text{I}]$ iododeoxyuridine incorporation into tumor and normal tissue DNA by methotrexate and thymidylate synthetase inhibitors. *Europ. J. Cancer* 32A (9), 1603-1608 (1996).
- Miyazaki N., Fujiwara Y.:** Mutagenic and lethal effects of  $[5-^{125}\text{I}]$ iodo-2'-deoxyuridine incorporated into DNA of mammalian cells and their RBEs. *Radiat. Res.* 88, 456-465 (1981).
- Miyazaki N., Shinohara K.:** Cell killing by decay of  $^{125}\text{I}$  during the cell cycle: comparison of  $^{125}\text{I}$ -Antipyrine with  $^{125}\text{I}$ -bovine serum albumin. *Radiat. Res.* 133, 182-186 (1993).
- Morris N.R., Cramer J.W.:** DNA synthesis by mammalian cells inhibited in culture by 5-Iodo-2'-deoxyuridine. *Mol. Pharmacol.* 2, 1-9 (1966).
- Munro T.R.:** The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of the Chinese hamster fibroblasts. *Radiat. Res.* 42, 451-470 (1970).
- Narra V.R., Harapanhalli R.S., Howell R.W. et al.:** Vitamins as radioprotectors in vivo. 1. Protection by vitamin C against internal radionuclides in mouse testes: implications to the mechanism of damage caused by the Auger effect. *Radiat. Res.* 137, 394-399 (1994).
- Nayar G.N.A., Srinivasan S.:** The effects of gamma radiation on solutions of acetylcholinesterase. *Radiat. Res.* 64, 657-661 (1975).
- Neshasteh-Riz A., Angerson W.J., Reeves J.R. et al.:** Incorporation of iododeoxyuridine in multicellular glioma spheroids: implications for DNA-targeted radiotherapy using Auger electron emitters. *British J. Cancer* 75 (4), 493-499 (1997).
- Nias A.H.W.:** An introduction to radiobiology. Wiley, Chichester, West Sussex, England (1990).
- Nikjoo H., Martin R.F., Charlton D.E. et al.:** Modelling of Auger-induced DNA damage by incorporated  $^{125}\text{I}$ . *Acta Oncol.* 35 (7), 849-856 (1996).
- O'Donoghue J.A., Wheldon T.E.:** Targeted radiotherapy using Auger electron emitters. *Phys. Med. Biol.* 41, 1973-1992 (1996).
- Olive P.L., Banáth J.P., Durand R.E.:** Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.* 122, 86-94 (1990).
- Olive P.L., Banáth J.P.:** Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and  $^{125}\text{I}$ UdR. *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 349-358 (1993).
- Olive P.L.:** Review. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* 75 (4), 395-405 (1999).
- Ormerod M.G.:** Analysis of DNA in: *Flow Cytometry – A practical approach*, Ormerod M.G. (Hrsg.), 69-87, Oxford University Press, Oxford (1990).
- Östling O., Johanson K.J.:** Microelectrophoretic study on radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-298 (1984).

**Painter R.B.,** Young B.R., Burki H.J.: Non-repairable strand breaks induced by  $^{125}\text{I}$  incorporated into mammalian DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 71 (12), 4836-4838 (1974).

**Palecz D., Leyko W.:** Effect of gamma radiation on enzymatic activity and sulfhydryl groups of human erythrocyte membrane. *Int. J. Radiat. Biol.* 44 (3), 293-299 (1983).

**Pomplun E.** Booz J., Charlton D.E.: A Monte Carlo simulation of Auger cascades. *Radiat. Res.* 111, 533-552 (1987).

**Pomplun E.,** Terrissol M., Demonchy M.: Modelling of initial events and chemical behavior of species induced in DNA units by Auger electrons from  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$  and carbon. *Acta Oncol.* 35 (7), 857-862 (1996).

**Pomplun E.:** Auger electron spectra. *Acta Oncol.* 39 (6), 673-679 (2000).

**Pomplun E.:** Mikrodosimetrische Berechnung der Energiedeposition und des Dosisgrenzwertes nach Zerfall von Radionukliden in biologischen Systemen. *Dissertation, Universität Düsseldorf* (1987).

**Powell S.N., McMillan T.J.:** The repair fidelity of restriction enzyme-induced double strand breaks in plasmid DNA correlates with radioresistance in human tumor cell lines. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994 Jul 30;29(5):1035-40.

**Puck T.T., Marcus P.I.:** Action of x-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* 103, 653-666 (1956).

**Radford I.R., Hodgson G.S.:**  $^{125}\text{I}$ -induced DNA double strand breaks: use in calibration of the neutral filter elution technique and comparison with x-ray induced breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* 48 (4), 555-566 (1985).

**Rao D.V.,** Narra V.R., Howell R.W. et al.: Induction of spermhead abnormalities by incorporated radionuclides. Dependence of subcellular distribution, type of radiation, dose rate, and the presence of radioprotectors. *Radiat. Res.* 125, 89-97 (1991).

**Roberts W.L., Rosenberry T.L.:** Identification of covalently attached fatty acids in the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, 621-627 (1985).

**Roots R.,** Feinendegen L.E., Bond V.P.: Comparative radiotoxicity of  $^3\text{H}$ -IUdR and  $^{125}\text{I}$ UdR after incorporation into DNA of cultured mammalian cells. *Proc. Third Symp. on Microdosimetry, Stresa/Italy*, 371-388. *Luxemburg: Commission of the European Communities* 1971.

**Rosenberry T.L.,** Roberts W.L., Haas R., Toutant J.-P.: The glycoinositol phospholipid anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase in: *Molecular and cell biology of membrane proteins – Glycolipid anchors of cell-surface proteins.* Turner A.J. (Ed.), 151-165, *Ellis Horwood, New York* (1990).

**Rydberg B.:** The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells. *Radiat. Res.* 61, 274-287 (1975).

**Sakai K., Okada S.:** Radiation-induced DNA damage and cellular lethality in cultured mammalian cells. *Radiat. Res.* 98, 479-490 (1984).

**Sastry K.S.R., Rao D.V.:** Dosimetry of low energy electrons in: *Physics of Nuclear Medicine: Recent Advances* (Hrsg. Rao D.V., Chandra R., Graham, M.) 169-208, *American Institute of Physics, New York* (1984).

**Sastry K.S.R.:** Biological effects of the Auger emitter iodine-125: a review. Report No. 1 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Med. Phys.* 19 (6), 1361-1370 (1992).

- Schneeweiss F.H.A.**, Tisljar-Lentulis G., Haustein K., Feinendegen L.E.: Periodical pattern of kinetics of DNA strand break repair following  $\gamma$ -irradiation of human T1-cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 52 (3), 491-493 (1987).
- Sedelnikowa O.A.**, Panyutin I.G., Thierry A.R., Neumann R.D.: Radiotoxicity of Iodine-125-labeled oligodeoxyribo-nucleotides in mammalian cells. *J. Nucl. Med.* 39 (8), 1412-1418 (1998).
- Shapiro B., Kollmann G.**: The nature of the membrane injury in irradiated human erythrocytes. *Radiat. Res.* 34, 335-346 (1968).
- Sharan R.N.**, Schneeweiss F.H.A., Humtsoe J.O. et al.: Effects of boron particle irradiation on cell survival and acetylcholin esterase activity in human and rat cell lines in vitro. *Annual Report*, 5.4.2, 114-116, National Science Center, Delhi, India (1999).
- Singh N.P.**, McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191 (1988).
- Spindler-Barth M.**: Hormonal regulation of acetylcholinesterase in an epithelial cell line from *Chironomus tentans*. *Z. Naturforsch.* 46c, 1089-1093 (1991).
- Steel G.** (Hrsg.): Basic clinical radiobiology. 2<sup>nd</sup> Edition, Arnold, London, England (1997).
- Stegemann S.**: Wirkung niedriger Gamma-Ganzkörperdosen, Vitamin E-Mangel und statischer Magnetfelder auf die Aktivität der Acetylcholinesterase in Knochenmarkzellen der Maus. *Dissertation, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt a.M.* (1992).
- Sundell-Bergman S., Johanson K.J.**: Repairable and unreparable DNA strand breaks induced by decay of  $^3\text{H}$  and  $^{125}\text{I}$  incorporated into DNA of mammalian cells. *Radiat. Environ. Biophys.* 18, 239-248 (1981).
- Talso P.J.**, Lahr T.N., Spafford N. et al.: A comparison of the volume of distribution of antipyrine, N-acetyl-4-amino-antipyrine, and  $^{131}\text{I}$ -labeled 4-iodo-antipyrine in human beings. *J. Lab. Clin. Med.* 46 (4), 619-623 (1955).
- Thompson A.M.**, Cavert H.M., Lifson N.: Kinetics of distribution of  $\text{D}_2\text{O}$  and antipyrine in isolated perfused rat liver. *Am. J. Phys.* 192, 531-537 (1958).
- Tisljar-Lentulis G.**, Schneeweiss F.H.A., Feinendegen L.E.:  $^{125}\text{I}$  decay in DNA: a discussion of its effectiveness for the breaking of DNA strands. *Radiat. Environ. Biophys.* 26, 189-195 (1987).
- Tubiana M.**: Introduction to radiobiology. Taylor & Francis, London (1990).
- Van den Abbeele A.D.**, Tutrone R.F., Berman R.M. et al.: Tumor-targeting potential of radioiodinated iododeoxyuridine in bladder cancer. *J. Nucl. Med.* 37, 315-320 (1996).
- Van der Veen J.**, Bots L., Mes A.: Establishment of two human cell strains from kidney and reticulosarcoma of lungs. *Archiv für die gesamte Virusforschung (Wien)*, 8, 230-238 (1957).
- Van Laar J.A.M.**, Rustum Y.M., Ackland S.P. et al.: Comparison of 5-Fluoro-2'-deoxyuridine with 5-Fluorouracil and their role in the treatment of colorectal cancer. *Europ. J. Cancer* 34 (3), 296-306 (1998).
- Veith H.-M.**: Strahlenschutzverordnung. *Textausgabe*, 5. Auflage, Bundesanzeiger-Verlag, Köln (1996).
- Walicka M.A.**, Adelstein S.J., Kassis A.I.: Indirect mechanisms contribute to biological effects produced by decay of DNA-incorporated Iodine-125 in mammalian cells in vitro: double strand breaks. *Radiat. Res.* 149, 131-141 (1998 a).

**Walicka M.A.**, Adelstein S.J., Kassis A.I.: Indirect mechanisms contribute to biological effects produced by decay of DNA-incorporated Iodine-125 in mammalian cells in vitro: clonogenic survival. *Radiat. Res.* 149, 142-146 (1998 b).

**Walicka M.A.**, Ding Y., Adelstein S.J., Kassis A.I.: Toxicity of DNA-incorporated iodine-125: quantifying the direct and indirect effects. *Radiat. Res.* 154, 326-330 (2000).

**Warters R.L.**, Hofer K.G., Harris C.R.: Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells: elucidation of the primary site of radiation damage. *Curr. Top. Radiat. Res. Quart.* 12, 389-407 (1977).

**Weber D.A.**, Eckerman K.F., Dillman L. T., Ryman J.C.: MIRD: Radionuclide data and decay schemes. *The Society of Nuclear Medicine, New York, USA* (1989).

**Wheldon T.E.**: Targeting radiation to tumours. *Int. J. Radiat. Biol.* 65 (1), 109-116 (1994).

**Yasui L.S.**, Hofer K.G., Warters R.L.: Inhomogeneity of the nucleus to <sup>125</sup>IUdR cytotoxicity. *Radiat. Res.* 102, 106-118 (1985).

**Yasui L.S.**, Hughes A., DeSombre E.R.: DNA damage induction by <sup>125</sup>I-estrogen. *Acta Oncol.* 35 (7), 841-848 (1996).

**Yasui L.S.**, Hughes A., DeSombre E.R.: Production of clustered DNA damage by <sup>125</sup>I decay. *Acta Oncol.* 39 (6), 739-740 (2000).

**Yoshioka A.**, Tanaka S., Hiraoka O. et al.: Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. *J. Biol. Chem.* 262 (17), 8235-8241 (1987).

**Zeile G.**, Baake M., Henrici G.: Kompendium der praktischen Hämatologie. 2. Auflage, GIT-Verlag Ernst Giebeler, Darmstadt (1983).

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Soll (Botanisches Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel) für die bereitwillige Übernahme des Referates sowie bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Carl (Chefarzt, Klinik für Strahlentherapie, Radioonkologie und Nuklearmedizin des Diakoniekrankenhauses Rotenburg/ Wümme) für die freundliche Übernahme des Korreferates bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Zilles (Direktor des Institutes für Medizin, FZ-Jülich) danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit an seinem Institut in dem Labor für Strahlenbiologie.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. med. Schmitt (Direktor der Klinik und Polyklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) für sein anteilnehmendes Interesse an dieser Arbeit.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Schneeweiß (Institut für Medizin, FZ-Jülich) für die wissenschaftliche Betreuung dieser strahlenbiologischen Arbeit und seinen ständigen Einsatz mit vielen förderlichen Diskussionen. Danken möchte ich auch Herrn Dr. Pomplun (Abteilung Sicherheit und Strahlenschutz, FZ-Jülich) für seine wissenschaftlichen Beratungen bezüglich des physikalisch-theoretischen Teils dieser Arbeit und die hilfreichen Korrekturen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Schneider (Institut für Medizin, FZ-Jülich) für ihre zuverlässige praktische Hilfe bei allen Arbeiten im Labor.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des vom BMU/ BfS finanziell geförderten Projektes „Biologische Wirksamkeit von Auger-Elektronen emittierenden Radionukliden“ (Kennzeichen Str.Sch. 4124) angefertigt.

---

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation – abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meine akademischen Betreuer – in Inhalt und Form selbständig verfaßt wurde und bei noch keinem anderen Promotionsverfahren vorgelegen hat.

Sandra Zerhusen

---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Geburtsdatum: 28.09.1973  
Geburtsort: Hamburg / Harburg  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1980 - 1984: Mauritius-Grundschule, Ebstorf  
1984 - 1986: Orientierungsstufe Ebstorf  
1986 - 1993: Lessing-Gymnasium Uelzen  
Juni 1993: Abitur

### **Studium**

1993 - 1998: Studium der Oecotrophologie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel  
Feb. - Nov. 1997: Experimentelle Diplomarbeit, Bundesanstalt für Milchforschung, Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung, Kiel  
April 1998: Diplom

### **Promotion**

seit Mai 1998: Doktorarbeit am Forschungszentrum Jülich, Institut für Medizin