



Elke Wolfring

Untersuchung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen

Bestrahlung der Brustdrüsenepithelzelllinie
MCF-12A mit Röntgenstrahlung aus
konventionellen Röntgenröhren
und Bestimmung der Dosis-Effekt-Kurve



Elke Wolfring

**Untersuchung strahleninduzierter
Chromosomenaberrationen**

**Bestrahlung der Brustdrüsenepithelzelllinie MCF-12A
mit Röntgenstrahlung aus konventionellen Röntgenröhren
und Bestimmung der Dosis-Effekt-Kurve**

Untersuchung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen

STUDIENARBEIT

vorgelegt

**am Interdisziplinären Ökologischen Zentrum
der Technischen Universität Bergakademie Freiberg**

von

Elke Wolfring

geboren am 24.06.1981 in Meißen

Betreuer:

Dr. Jörg Pawelke

**Institut für Kern- und Hadronenphysik
Forschungszentrum Rossendorf e.V.**

Dipl. Phys. Anna Panteleeva

**Institut für Kern- und Hadronenphysik
Forschungszentrum Rossendorf e.V.**

Prof. Dr. Michael Schlömann

**Interdisziplinäres Ökologisches Zentrum
TU Bergakademie Freiberg**

Tag der Einreichung: 14.01.2004

Tag der Verteidigung: 22.04.2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	2
1. Einleitung	
1.1 Motivation	3
1.2 Aufgabenstellung	4
2. Strahlenphysikalische Grundlagen	
2.1 Erzeugung und Wechselwirkung von Photonenstrahlung	5
2.2 Strahleninduzierte Schädigung von Zellen	6
2.3 Chromosomenaberrationen	9
2.4 Harlekin-Chromosomen	13
3. Material und Methoden	
3.1 Brustdrüsenepithelzelllinie MCF-12A	16
3.2 Bestrahlungen	16
3.3 Herstellung der Präparate	18
3.3.1 Colcemidzugabe	18
3.3.2 Das Zellpellet	18
3.3.3 Präparation der Objektträger	18
3.4 Färbungen der Objektträger	19
3.4.1 Giemsa-Färbung	19
3.4.2 BrdU-Färbung	19
4. Ergebnisse	
4.1 Chromosomenaberrationen	20
4.2 BrdU-Färbung	24
5. Diskussion	25
6. Zusammenfassung	27
7. Literaturverzeichnis	28
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

A.d.	Aqua dest. (destilliertes Wasser)
ATCC	American Type Culture Collection
BrdU	(+)-5-Brom-2-desoxyuridin
c	Lichtgeschwindigkeit, $c = 2,9979 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELBE	Elektronen-Linearbeschleuniger
E_{Ph}	Photonenenergie
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LET	lineares Energieübertragungsvermögen
m_e	Ruhemasse des Elektrons, $m_e = 9,10 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$
NaCl	Natriumchlorid
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	di-Natriumphosphatdodecahydrat
$\text{Na}_3\text{O}_7\text{C}_6\text{H}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	tri-Natriumcitratdihydrat
PBS	Phosphate Buffered Saline
RBW	relative biologische Wirksamkeit
rpm	revolution per minute (Umdrehungen pro Minute)
SSC	Lösung aus Natriumcitrat und Natriumchlorid (Sodium citrate, Sodium chloride) in destilliertem Wasser

1. Einleitung

1.1 Motivation

Am Forschungszentrum Rossendorf wird zurzeit die Strahlungsquelle ELBE (Elektronen-Linearbeschleuniger) in Betrieb genommen. Das Kernstück der Strahlungsquelle ist der Linearbeschleuniger, der einen Elektronenstrahl mit einer maximalen Energie von 40 MeV und einem maximalen Strahlstrom von 1 mA liefert. Mit diesem werden verschiedene Arten von Sekundärstrahlung (hochenergetische Bremsstrahlung, niederenergetische quasi-monochromatische Photonenstrahlung, Infrarotstrahlung, Neutronenstrahlung und Positronenstrahlung) erzeugt, die für Grundlagenexperimente und angewandte Forschung genutzt werden sollen.

Von einer Arbeitsgruppe des Institutes für Kern- und Hadronenphysik werden derzeit Zellbestrahlungsexperimente vorbereitet, mit denen die strahleninduzierte biologische Wirkung von niederenergetischer Photonenstrahlung untersucht werden soll. Die Photonenstrahlung wird an ELBE durch Channeling der Elektronen in einem Diamantkristall erzeugt (Abb. 1) und ist quasi-monochromatisch, wobei die Photonenenergie E_{Ph} im Bereich von 10 – 100 keV durch Variation der Elektronenenergie durchstimmbare ist. Ein zellbiologisches Labor wurde im ELBE-Gebäude eingerichtet und dient zur Vorbereitung der Zellproben vor den Experimenten, sowie zur Bestimmung der strahleninduzierten biologischen Wirkung nach erfolgter Bestrahlung.

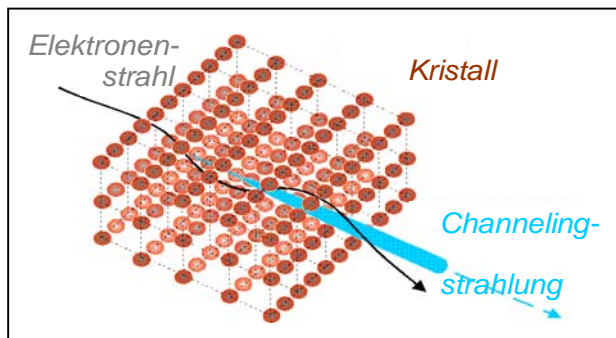


Abb. 1: Die Erzeugung von Channeling-Photonenstrahlung durch Channeling der Elektronen in einem Diamantkristall

Die an ELBE vorbereiteten Experimente haben das Ziel die biologische Wirksamkeit niederenergetischer Photonenstrahlung in Abhängigkeit von der Photonenenergie E_{Ph} zu bestimmen. Diese Art Strahlung wird in der Röntgendiagnostik, z.B. Mammographie ($E_{\text{Ph}} \leq 30$ keV), und in der Strahlentherapie, z.B. Brachytherapie, eingesetzt. Dabei ist bereits bekannt, dass Photonenstrahlung mit einer Energie $E_{\text{Ph}} \leq 100$ keV eine gesteigerte biologische Wirksamkeit aufweist [Schm02]. Die Größe der Steigerung ist abhängig von vielen Faktoren, wie z.B. den verwendeten Zellen, dem untersuchten biologischen Endpunkt (Art der Strahlenwirkung) und der Photonenenergie. Deshalb wurden parallel zur Vorbereitung der ELBE-Experimente bereits Zellbestrahlungen an Röntgenröhren durchgeführt. Da Röntgenröhren jedoch Photonenstrahlung mit einem breiten Energiespektrum erzeugen, konnte der Einfluss der Photonenenergie nur eingeschränkt untersucht werden. Daher konzentrierten sich die bisherigen Zellbestrahlungen auf den Einsatz verschiedener Zelllinien und die Bestimmung zweier biologischer Endpunkte: des reproduktiven Zelltodes und der Chromosomenaberration.

Zur Bestimmung des reproduktiven Zelltodes (Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit der Zellen) wurde der Koloniebildungstest durchgeführt. Hierbei wurde eine bekannte Anzahl

bestrahlter und unbestrahlter Zellen ausgesät und inkubiert. Anhand der Anzahl gebildeter Kolonien kann man Rückschlüsse darüber gewinnen, wie viele Zellen die Bestrahlung überlebt haben, d.h. sich weiterhin reproduzieren konnten.

Strahleninduzierte Chromosomenaberrationen wurden anhand der Bildung von Mikrokernen mit dem Mikronukleustest untersucht. Dieser Mikrokern wird gebildet, wenn abgespaltene Stücke der Chromosomen bei der Teilung aus dem Kern ausgeschieden werden. Die ausgeschiedenen Stücke sind dann im Cytoplasma als Mikrokern sichtbar.

Diese wie auch Arbeiten anderer Gruppen, z.B. [Schm02], ergaben eine erhöhte biologische Wirksamkeit (RBW >1) für niederenergetische Photonenstrahlung.

Für die Abschätzung des strahleninduzierten Risikos bei der Mammographie sind die obigen Experimente jedoch nicht ausreichend. Mit dem Koloniebildungstest lässt sich die Strahlenempfindlichkeit der Zellen in der Strahlentherapie bestimmen. Da bei der Durchleuchtung in der Mammographie aber nur kleine Strahlendosen eingesetzt werden, die nicht zum Zelltod führen, ist dieser Test für eine Risikoabschätzung nicht relevant. Hierfür wäre es wünschenswert, die strahleninduzierten Genveränderungen als Grundlage einer möglichen Krebserkrankung zu bestimmen. Ein Teil dieser Veränderungen ist als Chromosomenaberrationen sichtbar, wobei die oben erwähnten Mikrokerne als Folge einer Art von Chromosomenaberrationen (azentrische Fragmente) auftreten.

1.2 Aufgabenstellung

Wie oben geschildert, wurde bisher nur eine Art strahleninduzierter Chromosomenschäden mittels Mikronukleustest untersucht. Daraus leitet sich die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit ab:

1. Etablierung einer zellbiologischen Methode zur Bestimmung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen.
2. Einsatz dieser Methode zur Untersuchung von Chromosomenaberrationen an Brustdrüsenepithelzellen nach Bestrahlung mit niederenergetischer Photonenstrahlung (Röntgenstrahlung) an einer Röntgenröhre.

2. Strahlenphysikalische Grundlagen

2.1 Erzeugung und Wechselwirkung von Photonenstrahlung

Niederenergetische Photonenstrahlung (Röntgenstrahlung) nimmt im elektromagnetischen Spektrum ungefähr den Bereich von 5 – 100 keV ein.

Sie entsteht z.B. wenn Elektronen abgebremst oder von ihrer Bahn abgelenkt werden. In einer konventionellen Röntgenröhre werden die Elektronen durch die Hochspannung beschleunigt, auf ein Target (Anode) geschossen und dort abgebremst. Die dabei entstehende Röntgenstrahlung setzt sich aus zwei Anteilen zusammen: zum einen aus der charakteristischen Strahlung mit einer vom Targetmaterial abhängenden spezifischen Energie und zum anderen aus einem kontinuierlichen Strahlungsanteil („Bremskontinuum“), der durch die Ablenkung der Elektronen im Kernfeld hervorgerufen wird (vgl. Abb. 2). Die Maximalenergie des kontinuierlichen Anteils ist dabei durch die Beschleunigerspannung festgelegt.

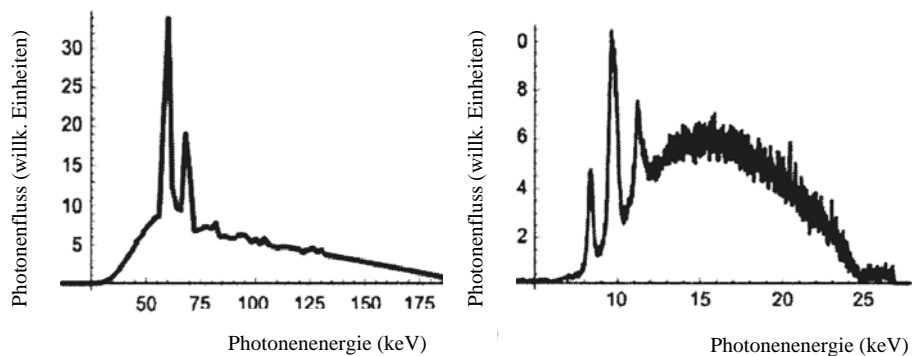


Abb. 2: Dargestellt ist der Photonenfluss in Abhängigkeit von der Photonenenergie zweier Röntgenröhren mit einer Wolframanode. Man erkennt, dass nicht nur Photonen einer Energie, sondern ein breites Energiespektrum erzeugt wird. Links ist das Spektrum einer mit 200 kV betriebenen Röntgenröhre (0,5 mm Cu - Filter) und rechts das der mit 25 kV betriebenen Röntgenröhre (0,3 mm Al - Filter) dargestellt, nach [Pant03].

Voraussetzung einer biologischen Wirkung ist die Absorption von Strahlungsenergie durch die bestrahlte Materie. Dabei gibt es vier Arten der Wechselwirkung von Photonen mit den Atomen der bestrahlten Materie: Rayleigh-Streuung, Compton-Effekt, Photoeffekt und Paarbildungseffekt.

Bei der Rayleigh-Streuung ändert sich die Energie des Photons nicht, es wird also keine Energie von der bestrahlten Materie absorbiert. Deshalb ist sie hier vernachlässigbar.

Die anderen drei Wechselwirkungen führen jeweils zur Erzeugung von Sekundärelektronen, die dann die Energie an die Materie in einer Reihe von Ionisations- und Anregungsprozessen übertragen. Deshalb spricht man bei Photonenstrahlung auch von indirekt ionisierender Strahlung.

Beim Compton-Effekt kommt es zur Streuung eines Photons an einem Hüllenelektron, wobei die Energie des Photons größer ist als die Bindungsenergie des Elektrons und das Elektron frei oder schwach gebunden sein muss. Dieses wird aus dem Verband gelöst und übernimmt einen Teil der Energie des Photons. Das Photon bewegt sich mit verringerter Energie unter anderem Winkel weiter. Die Wahrscheinlichkeit für diese Art der Wechselwirkung sinkt mit steigender Photonenenergie.

Beim Photoeffekt wird das Photon dagegen vollständig von der Atomhülle absorbiert und überträgt seine gesamte Energie einem Hüllenelektron. Das Elektron verlässt mit dieser Energie abzüglich seiner Bindungsenergie als Photoelektron den Atomverband; die freiwerdende Bindungsenergie wird vom Atomrumpf aufgenommen. Der Photoeffekt hat bei niedrigen Photonenenergien einen großen Einfluss, der mit steigender Energie abnimmt.

Bei einer Photonenenergie von mehr als der doppelten Elektronenruheenergie ($2m_e c^2 = 1,022 \text{ MeV}$) besteht die Möglichkeit, dass das Photon vom Coulomb-Feld des Atomkerns vollständig absorbiert wird und dabei ein Elektron und ein Positron freigesetzt werden. Dieser Prozess heißt Paarbildungseffekt. Das hierbei erzeugte Positron hat eine kurze Lebensdauer und vereinigt sich nach Abgabe seiner kinetischen Energie mit dem Elektron unter Emission von zwei Photonen (Annihilationsstrahlung). Der Paarbildungseffekt tritt besonders bei Elementen mit hoher Ordnungszahl auf. Seine Wahrscheinlichkeit steigt mit wachsender Photonenenergie und nimmt bei hohen Energien einen konstanten Wert an.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei der Bestrahlung von Materie mit Photonen alle drei Prozesse, mit unterschiedlichen Anteilen je nach Photonenenergie, gleichzeitig ablaufen können. Die Energiebereiche, in denen die jeweiligen Wechselwirkungen dominieren, sind in Abb. 3 gezeigt.

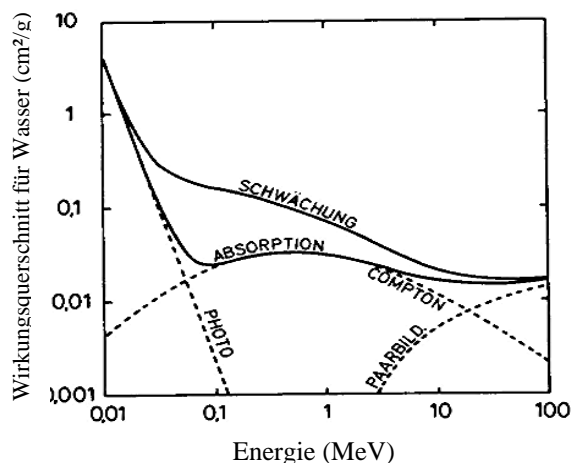


Abb. 3.: Die Anteile von Photoeffekt, Compton-Effekt und Paarbildungseffekt in den einzelnen Energiebereichen bei der Bestrahlung von Wasser mit Photonen, nach [Kief89].

Die Gesamtwechselwirkung ergibt sich additiv aus den einzelnen Anteilen für Photoeffekt, Compton-Effekt und Paarbildungseffekt. In allen drei Fällen treten Sekundärelektronen als eigentliche Überträger der Strahlungsenergie an die bestrahlte Materie auf. Die Sekundärelektronen sind somit für den biologischen Effekt maßgeblich, wobei ihr Spektrum von der Photonenenergie abhängig ist.

2.2 Strahleninduzierte Schädigung von Zellen

Die biologische Wirkung von Strahlung basiert auf der Energieübertragung an das bestrahlte Gewebe durch Ionisation und Anregung, wodurch biochemische und biologische Reaktionen an den Molekülen, Zellbestandteilen oder den Zellen im Ganzen ausgelöst werden.

Die Messgröße für den Energieübertrag ist die Dosis D , definiert durch

$$D = \frac{\Delta E}{\Delta m} \tag{1}$$

mit der Einheit Gray (Gy) = $1 \text{ J} / \text{kg}$, wobei ΔE die absorbierte Energie pro Masseinheit Δm ist.

Unterschiedliche Strahlenarten können trotz gleicher applizierter Dosis D unterschiedliche Schädigungen hervorrufen; die biologische Wirkung ist also abhängig von der Qualität der Strahlung.

Deshalb vergleicht man die biologische Wirkung einer Strahlenart mit der einer Referenzstrahlung. Als Maß hierfür dient die relative biologische Wirksamkeit (RBW), die folgendermaßen definiert ist:

$$RBW = \frac{D_r}{D_x} \Big|_{E_x = E_r}, \quad (2)$$

wobei D_x die Dosis der Strahlung x, D_r die Dosis der Referenzstrahlung r, E_x der Effekt der Strahlung x hervorgerufen durch die Dosis D_x und E_r der Effekt der Referenzstrahlung r hervorgerufen durch die Dosis D_r bezeichnen.

Die Definition setzt voraus, dass die zu vergleichenden Dosen gleiche biologische Effekte hervorrufen. Die RBW einer Strahlung ist abhängig von der Dosis, der Dosisleistung und vom untersuchten Effekt.

Um die Unterschiede in der RBW verschiedener Strahlenqualitäten zu verstehen, muss man den Energieübertrag mikroskopisch, d.h. auf zellulärer Ebene, betrachten.

Es ist bekannt, dass die DNS (Desoxyribonukleinsäure) in jeder Zelle die gesamte Erbinformation enthält und die wesentliche Zielstruktur der biologischen Strahlenwirkung ist. Der Energieübertrag auf das bestrahlte Gewebe erfolgt für alle Strahlenarten immer über geladene Teilchen, d.h. bei Photonenstrahlung durch die bei obigen Wechselwirkungsprozessen erzeugten Elektronen. Diese, wie auch andere geladene Teilchen, deponieren ihre Energie entlang der Teilchenbahn in einer Abfolge von Ionisationen, wobei die Dichte der Ionisationsorte von der Teilchenart und -energie, sowie von der Zusammensetzung des Stoffes abhängt.

Ein Maß für den Energieverlust der geladenen Teilchen bzw. Sekundärteilchen in Gewebe stellt der LET (linear energy transfer) dar, der als Quotient aus lokal absorbiertener Energie dE und der dabei durchlaufenen Wegstrecke dx definiert ist:

$$LET = \frac{dE}{dx}. \quad (3)$$

Einen Vergleich der LET in Gewebe in Abhängigkeit von der Teilchenart und -energie zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: LET-Werte in Standardgewebe in Abhängigkeit von der Teilchenart und -energie

Energie in MeV	LET in keV/μm		
	Elektronen	Protonen	α -Teilchen
0,0001	55,2		
0,01	0,98		
0,1	0,152		
1	0,060	13,9	182
10		1,83	24,7

Aus experimentellen und theoretischen Betrachtungen für geladene Teilchen ergibt sich, dass die RBW mit dem LET ansteigt, ein Maximum bei $LET \approx 110 \text{ keV}/\mu\text{m}$ hat und dann bei weiter ansteigendem LET wieder absinkt.

Abbildung 4 erklärt den Unterschied in der biologischen Wirkung von Strahlung mit unterschiedlichem LET. Photonenstrahlung (γ -Strahlung) als Niedrig-LET-Strahlung erfordert im Vergleich zu Strahlung schwerer geladener Teilchen (z.B. α -Strahlung) als Hoch-LET-Strahlung eine viel größere Anzahl an den Zellkern durchlaufenden Strahlspuren, um in diesem die gleiche Dosis zu deponieren. Dieser Unterschied spiegelt sich auch in der Anzahl der Ionisationsereignisse pro Weglänge entlang der Teilchenspur wieder. Bei der Niedrig-LET-Strahlung ist die Ionisationsdichte gering, weshalb es bevorzugt zu einzelnen, einfachen Schäden (z.B. Einzelstrangbrüche) an der DNS kommt, die von der Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit und Genauigkeit repariert werden können. Mit steigendem LET wächst die Ionisationsdichte, was zu einer Zunahme von mehrfachen, komplexeren Schäden (z.B. Doppelstrangbrüche) an der DNS führt. Diese Schäden werden von der Zelle mit verringerter Wahrscheinlichkeit und Genauigkeit repariert. Bei kleiner Energie (einige keV) wird Photonenstrahlung zu einer Hoch-LET-Strahlung.

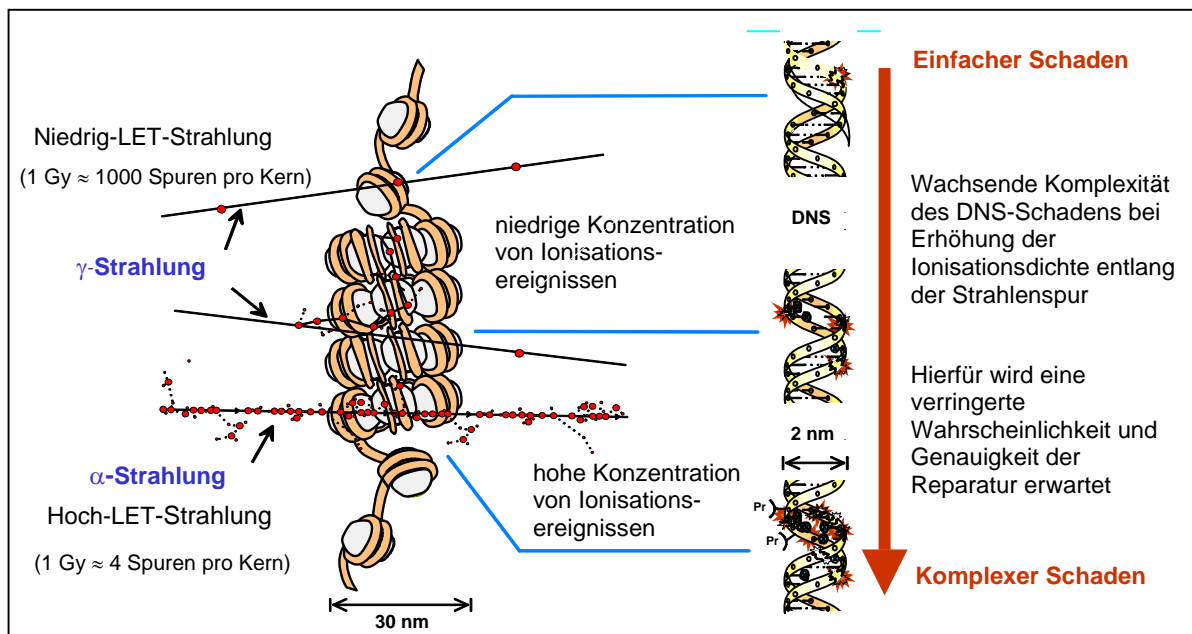


Abb. 4: Einfluss des LET einer Strahlung auf die Schädigung der DNS, nach [Hill00].

Eine vereinfachte Beschreibung der Abhängigkeit der Schäden von der Strahlenqualität und -dosis, ohne Betrachtung der komplexen strahlenphysikalischen und biochemischen Prozesse, bietet die Theorie der dualen Strahlenwirkung nach [Dörs92]. Danach benötigt man zur Ausbildung eines biologisch relevanten Effektes zwei oder mehr Einzelstörungen, die für sich allein keinen solchen Effekt verursachen würden, in enger räumlicher und zeitlicher Nähe. Die primäre Schädigung als Funktion der Dosis (Dosis-Effekt-Kurve) lässt sich dann mit der Gleichung

$$Y(D) = k(\lambda D + D^2) \quad (4)$$

beschreiben, wobei Y die mittlere Anzahl der Primärschäden, k eine Proportionalitätskonstante unabhängig von der Strahlungsart und λ ein Parameter ist, der die Eigenschaften der Strahlung widerspiegelt und mit wachsendem LET zunimmt.

Hoch-LET-Strahlung (z.B. Protonen, Neutronen, α -Teilchen) weist eine annähernd lineare Dosis-Effekt-Kurve auf, während bei Niedrig-LET-Strahlung (z.B. γ -Strahlung, Elektronen,

Positronen) das quadratische Glied in Gleichung (4) dominiert. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass mehrere Einzelstörungen in der nötigen räumlichen und zeitlichen Nähe zur Ausbildung eines biologischen Effekts auftreten, steigt mit der Dosis und dem LET. Daraus folgt, dass der biologische Effekt sowohl von der Dosis als auch von der Strahlqualität abhängt.

Die Theorie der dualen Strahlenwirkung ist besonders im Bereich sehr niedriger Dosen nicht ohne Widersprüche, liefert aber dennoch eine anwendbare Beschreibung der Abhängigkeit der biologischen Strahlenwirkung von der Dosis und dem LET.

Eine häufig verwendete Form der Gleichung (4) ist

$$Y(D) = aD + bD^2 \tag{5}$$

mit den Parametern $a = k \cdot \lambda$ und $b = k$.

Wenn man Gleichung (5) um den Parameter c erweitert, erhält man die in der vorliegenden Arbeit zur Regression der Datenpunkte (siehe Kapitel 4.1) verwendete Gleichung

$$Y(D) = aD + bD^2 + c, \tag{6}$$

wobei c die strahlenunabhängige Schädigung repräsentiert und somit alle anderen Stressfaktoren für die Zellen beinhaltet. Im vorliegenden Versuch wurden die Schäden, die die unbestrahlten Zellen (Kontrolle) aufwiesen, für den konstanten Parameter c eingesetzt.

2.3 Chromosomenaberrationen

Irreparable Schäden und strukturelle Veränderungen, die an der DNS auftreten, können entweder sofort zum Verlust der Replikationsfähigkeit und damit zum Zelltod führen oder sie werden vererbt und können in späteren Zellgenerationen Mutationen auslösen.

Um strukturelle Schäden an der DNS gut feststellen zu können, muss man einen bestimmten Zeitraum innerhalb des in Abb. 5 dargestellten Zellzyklus auswählen, da die DNS während der verschiedenen Phasen ihr äußeres Erscheinungsbild verändert.

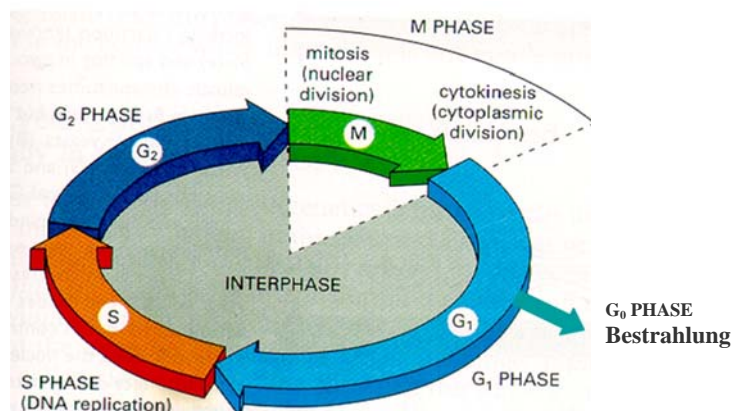


Abb. 5: Der Zellzyklus, den die Zelle während der Teilung durchläuft, mit der G_0 -Phase als Überdauerungsphase bei schlechten äußeren Bedingungen [Albe02]. In der G_1 - und der G_2 -Phase befinden sich Kontrollpunkte, an denen kontrolliert wird, ob die nächste Phase eintreten soll oder ob Schäden (an der DNS oder andere) aufgetreten sind. Ist dies der Fall wird der Zellzyklus an dieser Stelle für die betroffene Zelle angehalten (G_1 - oder G_2 -Arrest).

So liegt sie in der Interphase als langes fädiges Chromatin vor, das dann während der M-Phase zu Chromosomen, die aus zwei identischen Chromatiden bestehen, kondensiert. In der M-Phase ist es möglich, die einzelnen Chromosomen zu unterscheiden und strukturelle Aberrationen an ihnen festzustellen, zu zählen und zu vergleichen.

Chromosomenaberrationen treten als strukturelle und numerische Veränderungen auf. Die strukturellen Veränderungen können unterschieden werden in Chromatidaberrationen an nur einer Chromatide des Chromosoms und (die eigentlichen) Chromosomenaberrationen, die bei beiden parallel auftreten. Numerische Aberrationen (Änderung der Chromosomenanzahl)

spielen im Bereich der Erbkrankheiten eine große Rolle, werden im vorliegenden Versuch aber nicht berücksichtigt.

Sowohl bei Chromatid- als auch bei Chromosomenaberration unterscheidet man zwischen Deletionen (Bruchstückverlust) und Austauschveränderungen. Letztere können in einem Chromatid oder zwischen den Chromatiden eines oder mehrerer Chromosomen auftreten, was zu einer großen Vielzahl möglicher Aberrationen führt, wovon einige in Abbildung 6 dargestellt sind.





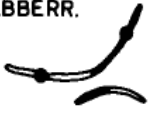






	INTER-AUSTAUSCH 	INTER-ARM- INTRA-AUSTAUSCH 	INTRA-ARM- INTRA-AUSTAUSCH 	" BRUCH" 
ASYMMETRISCH	DIZENTRISCHE ABBERR. ★ 	ZENTRISCHER RING ★ 	DELETION ★ 	DELETION ★ 
SYMMETRISCH	TRANSLOKATION 	INVERSION 	INVERSION 	

Abb. 6: Verschiedene Arten von Chromosomenaberrationen, wobei die Chromosomen zur besseren Übersicht nur einfach (beide Chromatiden zusammen) gezeichnet sind, nach [Kief89]. Die mit Sternchen markierten Aberrationen waren im Versuch sichtbar und unterscheidbar.

Wie die verschiedenen Aberrationen entstehen, ist noch nicht exakt geklärt, weshalb für die hier untersuchten Aberrationen (siehe Abb. 6) nur eine schematische Erklärung gegeben werden kann.

Die verschiedenen Deletionen entstehen dadurch, dass die einfallende Strahlung einen DNS-Doppelstrangbruch verursacht (siehe Abb. 7a). Falls es zu Falschreparatur kommt oder eine Reparatur nicht möglich ist, wird das Bruchstück nach der Replikation aus dem Chromosom ausgeschieden. Je nach Lage des Verlustes, entweder an den Telomeren (terminal) oder innerhalb des Chromosoms (interstitiell), werden die einzelnen Deletionen unterschieden. Beispiele für Deletionen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden, zeigen die Abbildungen 7b und 7c. Zwischen den beiden Formen der Deletionen war im vorliegenden Versuch keine Unterscheidung möglich. Die Deletionen unterscheiden sich sowohl in Form als auch in der Größe. Sie kann von punktförmig bis Chromosomenlänge stark variieren.

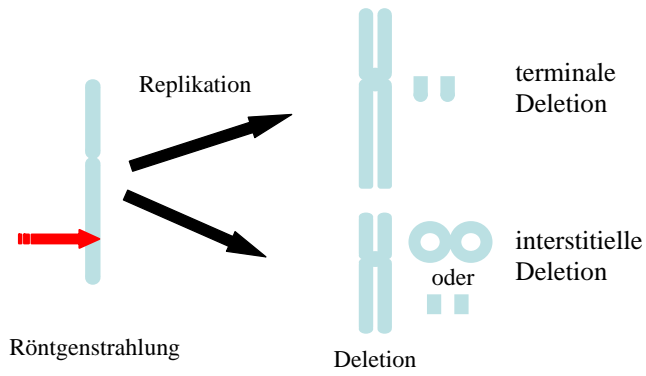


Abb. 7a: Der durch Strahlung erzeugte DNS-Doppelstrangbruch resultiert in einem Bruchstückverlust im Chromosom. Dieses und das Bruchstück verdoppeln sich während der anschließenden Replikation.

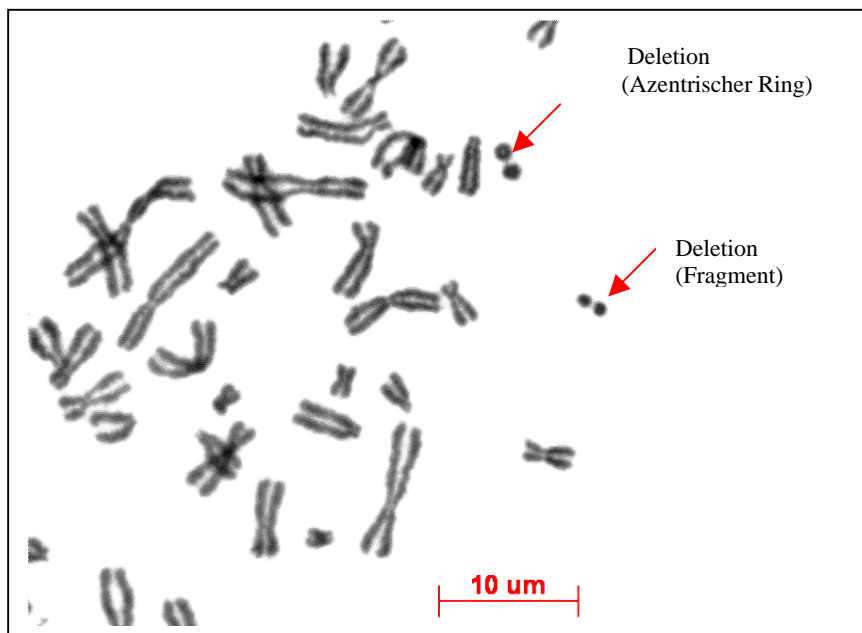


Abb. 7b: Humane Brustdrüsenepithelzelllinie MCF-12A, mit Giemsa gefärbt, Ausschnitt aus dem Chromosomensatz einer mit 5 Gy (200 kV) bestrahlten Zelle.

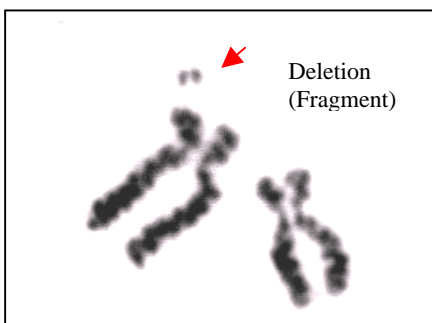


Abb. 7c: Humane Brustdrüsenepithelzelllinie MCF-12A, mit Giemsa gefärbt, zwei Chromosomen mit Fragment einer unbestrahlten Zelle.

Verursacht die einfallende Strahlung dagegen Bruchstückverlust an zwei nahe beieinander liegenden Chromosomen, so kann es passieren, dass fälschlicherweise die beiden Chromosomen und die beiden Bruchstücke verbunden werden und nicht die zueinander gehörigen Teile. Während der Verdopplung entstehen dann, wie in Abb. 8a schematisch dargestellt, ein dizentrisches Chromosom und ein dazugehöriges azentrisches Fragment. Ein Beispiel zeigt Abbildung 8b. Da mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methode die terminalen und interstitiellen Deletionen sowie azentrische Fragmente nicht unterschieden werden können, werden sie im folgenden zusammenfassend als Fragment bezeichnet.

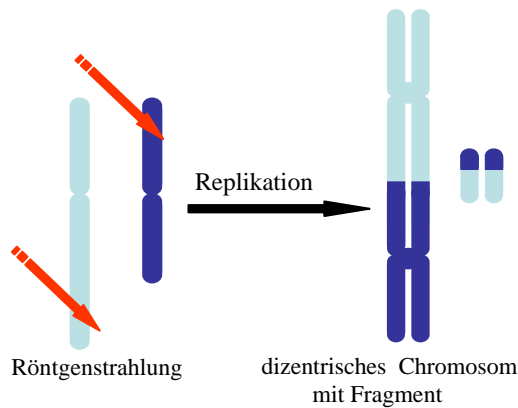


Abb. 8a: Die durch Strahlung erzeugten Doppelstrangbrüche verursachen an den beiden Chromosomen einen Bruchstückverlust. Durch falsches Verbinden der freien Enden entstehen ein dizentrisches Chromosom und das dazugehörige Fragment.

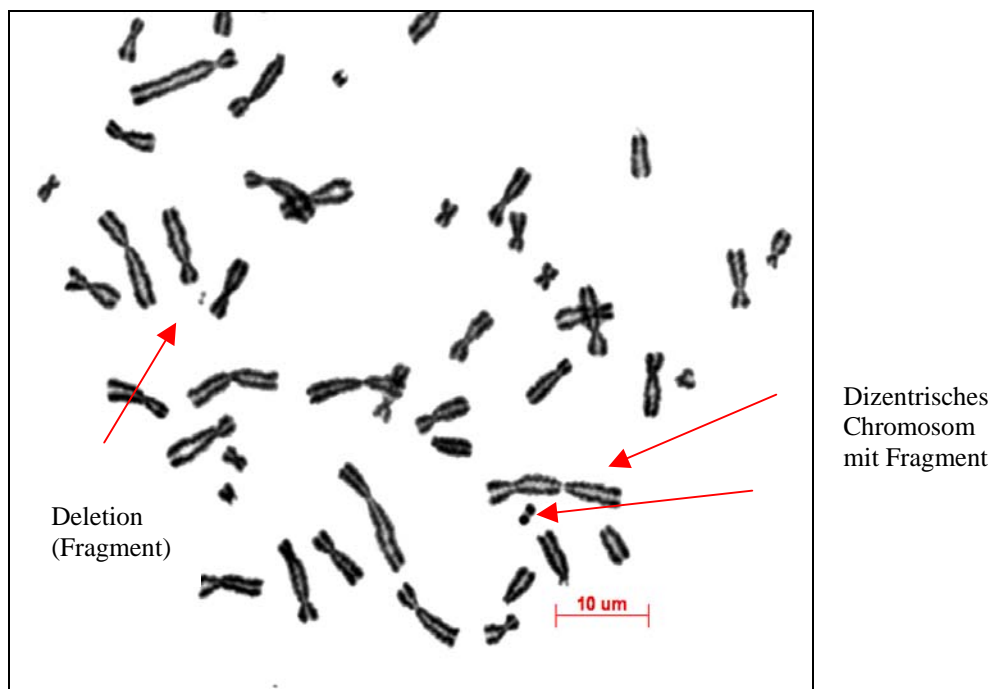


Abb. 8b: Humane Brustdrüsenepithelzelllinie MCF-12A, Ausschnitt aus dem Chromosomensatz einer mit Giemsa gefärbten und mit 5 Gy (200 kV) bestrahlten Zelle.

Es ist aber auch möglich, dass die einfallende Strahlung Bruchstückverluste an beiden Enden eines Chromosoms verursacht. Die freien Enden der Chromosomen können sich dann zu einem zentrischen Ring verbinden (Abb. 9a). Dieser sollte nicht verwechselt werden mit einem Ring, der aus der Überlagerung von ringförmigen Fragmenten entsteht und keinen Zentromer besitzt. Abbildung 9b zeigt einen zentrischen Ring in einer Brustdrüsenepithelzelle.

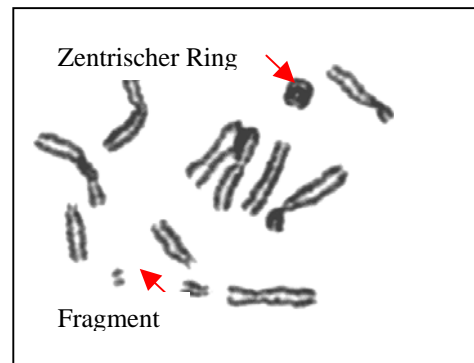
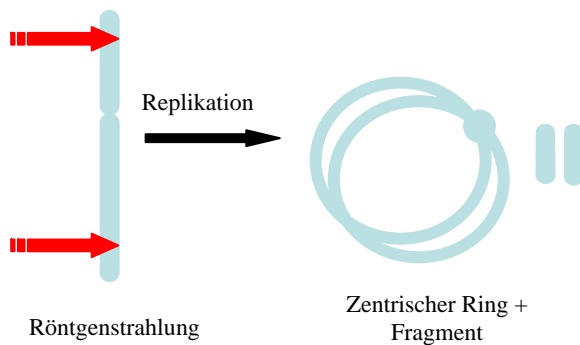


Abb. 9a: Durch einfallende Strahlung kommt es zu Verlust an den beiden Telomeren eines Chromosoms. Die dabei entstehenden Enden verbinden sich zu einem zentrischen Ring und die beiden Bruchstücke zu einem Fragment.

Abb. 9b: Humane Brustdrüsenepithelzelllinie MCF-12A, Ausschnitt aus dem Chromosomensatz einer mit Giemsa gefärbten und mit 5 Gy (200 kV) bestrahlten Zelle.

Da sowohl beim dizentrischen Chromosom als auch beim zentrischen Ring die Kombination zweier nahe liegender Schäden benötigt wird, werden beide im vorliegenden Versuch zu einer Klasse von Aberrationen gezählt.

2.4 Harlekin-Chromosomen

Im vorliegenden Versuch war es wichtig, dass sich die Zellen vor der Bestrahlung möglichst im selben Stadium des Zellzyklus befanden. Dies spielt für die Auswertung des Versuchs eine Rolle, da nur die Primärschäden aussagekräftig sind, und nicht die verbliebenen Schäden nach erfolgter Zellteilung; denn mit Ablauf des Zellzyklus werden Schäden repariert und die azentrischen Fragmente ausgeschieden.

Die Gleichschaltung der Zellen wurde durch Wachstum bis zum Erreichen der Konfluenz erlangt. Ab diesem Zeitpunkt sind so viele Zellen vorhanden, dass die Oberfläche der Kulturflasche komplett bedeckt ist. Die verwendeten Zellen sind „contact inhibited“, d.h. sobald Kontakt zu Nachbarzellen existiert, lässt die Proliferation (Zellteilung) nach und die Zellen gehen über in die G_0 -Phase. Um dabei ein Absterben der Zellen zu verhindern, wird das Medium regelmäßig ausgetauscht.

Bis nach der Bestrahlung trifft diese Gleichheit auch auf die meisten Zellen zu. Mit der Bestrahlung werden, je nach verabreichter Dosis, in den Zellen Schäden induziert. Da die Zellen nach der Bestrahlung in kleinerer Anzahl neu ausgesät und inkubiert werden, können sie die G_0 -Phase verlassen und im normalen Zellzyklus fortschreiten.

Die Zellen, deren Chromosomen durch die Bestrahlung beschädigt wurden, werden an einem der beiden Kontrollpunkte des Zellzyklus (siehe Abb. 5) arretiert. Der Zellzyklus ist für diese Zellen damit unterbrochen, während er für diejenigen mit unbeschädigten Chromosomen normal abläuft. Die Arretierung muss aber nicht dauerhaft sein, sondern die Schäden können repariert werden und die Zellen durchlaufen dann ebenfalls den Zellzyklus. So ist es zu erklären, dass in der Kontrolle (ohne Bestrahlung) mehr Zellen zu finden sind, die einen oder

zwei Zellzyklen durchlaufen haben, als bei den mit 5 Gy bestrahlten, wo ein großer Teil der Zellen beschädigte DNS enthält, die eventuell nicht reparierbar ist.

Um nachzuweisen wie viele Zellzyklen die Zelle nach der Bestrahlung bis zur Fixierung durchlaufen hat, benutzt man den Nachweis mit BrdU (Bromdesoxyuridin), einer Substanz die als Thymidinanalogon in die DNS eingebaut werden kann. Die unbeschädigten oder reparierten Zellen durchlaufen die S – Phase, in der die DNS repliziert wird. Während der Replikation wird das im Medium befindliche BrdU anstelle des Thymidins eingebaut. Man erhält Chromosomen, die jeweils einen mit BrdU substituierten DNS – Strang besitzen. Ab der zweiten Replikation existieren dann Chromosomen, bei denen beide Stränge einer Chromatide substituiert sind (siehe Abb. 10).

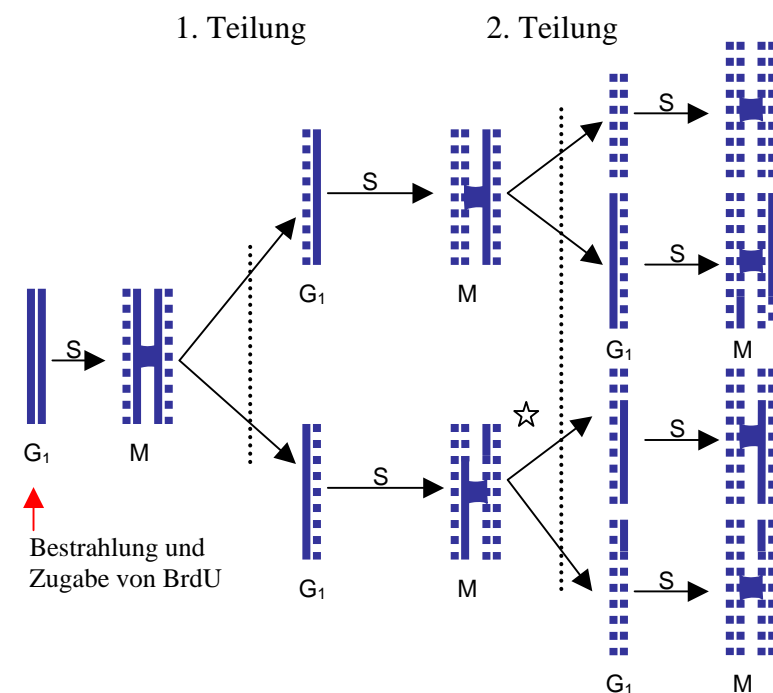


Abb. 10: Einbau des BrdU in die DNS während bestimmter Phasen des Zellzyklus. Die DNS-Stränge sind durch Linien (..... mit BrdU substituiert, — unsubstituiert) dargestellt. Ein Chromosom in der Metaphase M besteht aus zwei mit einem Zentromer verbundenen Chromatiden. G₁ und S bezeichnen weitere Phasen des Zellzyklus. Mit ☆ ist ein Beispiel des Austauschs von Schwesterchromatidstücken gekennzeichnet.

Die Farbunterschiede ergeben sich durch die Behandlung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, UV-Licht und anschließender Färbung mit Giemsa (siehe 3.4.1). Durch die UV-Bestrahlung kommt es zur Photolyse der substituierten DNS, sie wird durch das Licht abgebaut. Bei der Giemsa-Färbung wird der Strang, der weniger DNS besitzt nicht so stark angefärbt und erscheint hell. Eine Chromatide erscheint aber erst hell, wenn beide Stränge mit BrdU substituiert sind (siehe 3.4.2). Durch die Färbung ist es ebenfalls möglich, den Schwesterchromatidaustausch (SCE, sister chromatid exchange) zu erkennen, da die Chromatiden mit ausgetauschten DNS-Stücken mehrfarbig (namensgebend für „Harlekin“) erscheinen.

In den vorliegenden Versuchen war es wichtig, die Zellen in der ersten Mitose nach der Bestrahlung anzuhalten (entspricht der Mitose vor der ersten Teilung in Abb. 10), d.h. es sollten so wenig wie möglich Harlekin vorliegen, da diese erst nach der ersten Teilung auftreten können.

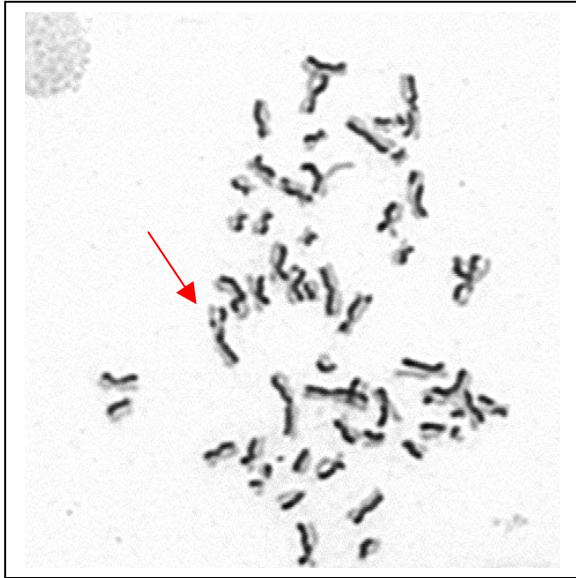


Abb. 11: Humane Brustdrüsenepithelzelllinie MCF-12A, Chromosomensatz einer unbestrahlten mit BrdU gefärbten Zelle. Durch die Harlekin-Färbung werden die Schwesterchromatidaustausch-Fälle sichtbar (ein Beispiel ist mit dem Pfeil gekennzeichnet).

Durch Auszählen kann man den Anteil derjenigen Zellen bestimmen, die bis zur Fixierung zwei Zellzyklen durchlaufen haben. Da bei diesen Zellen die Möglichkeit besteht, dass Primärschäden repariert wurden und sie so das Ergebnis verfälschen können, wird versucht, deren Anteil durch Wahl einer optimalen Inkubationszeit so gering wie möglich zu halten.

3. Material und Methoden

3.1 Brustdrüsenepithelzelllinie MCF-12A

Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um MCF-12A (ATCC), modifizierte weibliche Brustdrüsenepithelzellen humanen Ursprungs. Diese Zellen sind genetisch so verändert, dass die Apoptose ausgeschaltet ist und sie sich unter idealen Wachstumsbedingungen endlos teilen [Pain 92]. Aufgrund dieser Veränderung besitzen sie eine erhöhte Chromosomenzahl (hier 64), statt der üblichen 46 in humanen Zellen.

Die Zellen werden in einem Medium inkubiert, dass aus DMEM/Ham's F12 (1:1; Biochrom), 5 % Pferdeserum (Biochrom), 500 ng/ml Hydrocortison (Sigma), 0,01 mg/ml (Rinder-) Insulin (Sigma), 100 ng/ml Cholera Toxin (Merck Biosciences) und 20 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor (Becton Dickinson) besteht.

Wachstum und Inkubation der Zellen erfolgen in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C in Luft mit 5 % CO₂-Gehalt. Um die Proliferation konstant zu halten, wurden die Zellen bei ~ 70 % Konfluenz in neue Kulturgefäße ausgesät (trypsinisiert).

Bei der Trypsinierung wird zuerst das alte Nährmedium entfernt und die Zellen anschließend mit 0,25 % / 0,03 % Trypsin/EDTA-Lösung in PBS (Phosphat Buffered Saline, Biochrom) gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Um die Zellen vom Boden abzulösen, wird nochmals dieselbe Menge Trypsin hinzugegeben, 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch leichtes Abschlagen und Abspülen so viele Zellen wie möglich in Lösung gebracht. Nach Zugabe von frischem Medium wird die Lösung in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 4°C und 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und erneut frisches Medium hinzugegeben. Diese Zellsuspension wird durchmischt und im Verhältnis 1:4 zu Trypan-Blau-Lösung gegeben. Die Trypan-Blau-Lösung wurde aus Trypan-Blau (Biochrom) und PBS (Biochrom) im Verhältnis 1:1 hergestellt. Für die Bestimmung der Zellkonzentration wurde ein Tropfen der obigen Mischung in eine Neubauerkammer überführt und die Zellen ausgezählt. Mit der daraus berechneten Zellkonzentration erfolgte die Aussaat der gewünschten Menge an Zellen in neue Flaschen.

3.2 Bestrahlungen

Für die Bestrahlungen wurden ca. sieben Tage zuvor Zellen in Kulturflaschen ausgesät und unter den üblichen Bedingungen bis zum Erreichen der Konfluenz inkubiert. Um hierbei ein Absterben zu verhindern, wurde das Medium jeden dritten Tag ausgetauscht.

Die Bestrahlungen fanden an der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus (Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie) statt.

Für die Bestrahlung mit 200 kV wurde eine Röntgenanlage Isovolt 320/13 (Seifert Röntgenwerke), die mit einer Wolframanode ausgestattet ist, verwendet. Gearbeitet wurde mit einem 0,5 mm Kupferfilter, einem Röhrenstrom von 20 oder 5 mA und bei einer Distanz von 45,5 cm zwischen Kulturflasche und Strahlfokus.

Zur Bestrahlung mit 25 kV wurde eine Darpac 150-MC Röntgenanlage (Forward Raytech, GB) mit einer Wolframanode, einem Röhrenstrom von 20 mA und einem 0,3 mm Aluminiumfilter verwendet, bei 25 cm Fokus-Objekt-Abstand.

Die Dosisinhomogenität bei Bestrahlung mit 200 kV betrug $\pm 3,4$ % und bei 25 kV Bestrahlung $\pm 3,9$ %.

An beiden Röhren erfolgte eine Einzelbestrahlung der Kulturflaschen und die verschiedenen Dosiswerte wurden über unterschiedlich lange Bestrahlungszeiten erreicht.

Die für die Bestrahlung verwendeten Parameter sind für beide Röhren in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Bestrahlungsparameter der Röntgenröhren

Röntgenröhre	200 kV		25 kV
	20mA	5mA	
D_L in Gy/min	1,1262	0,3108	1,924
D_{20} in Gy	0,2766	0,07938	

D_L = Dosisleistung; D_{20} = Dosis, die nach 20 s erreicht wird. Dieser Wert wird benötigt, da die Leistung parallel zum Strom aufgebaut wird und so erst 20 s nach dem Einschalten ihren Sollwert erreicht.

Die Bestrahlungszeiten für die 200 kV Röntgenröhre wurden nach

$$t_x = 20 \text{ s} + \frac{D_x - D_{20}}{D_L} * 60 \text{ s / min} \quad (7)$$

t_x ... Bestrahlungszeit in Sekunden, D_x ... benötigte Dosis in Gy

berechnet.

Für die 25 kV Röntgenröhre wird die Bestrahlungszeit nach

$$t_x = \frac{D_x}{D_L} \quad (8)$$

bestimmt, da hier der Einschaltvorgang vernachlässigt werden kann.

Nach diesen Formeln ergeben sich die jeweiligen Bestrahlungszeiten, die in Tabelle 3 zusammengefasst sind.

Tab. 3: Bestrahlungszeiten an der 200 kV und der 25 kV Röhre für die jeweilige Dosis

Dosis in Gy	Zeit bei 200 kV in s	Zeit bei 25 kV in s
0,5	101	15,6
1	198	31,2
2	112	62,4
3	165	93,6
5	272	155,9

Die Bestrahlungszeiten wurden mit obigen Formeln berechnet, wobei die Bestrahlung an der 200 kV Röntgenröhre für 0,5 Gy und 1 Gy mit 5 mA und für die übrigen mit 20 mA erfolgte.

Nach erfolgter Bestrahlung wurden die Zellen mit Eis gekühlt, um die zelleigenen Reparaturmechanismen zu verlangsamen, und so schnell wie möglich ins Labor transportiert. Anschließend wurden die mit Giemsa zu färbenden Zellen trypsiniert, in 25 cm²-Flaschen jeweils 300.000 Zellen pro Dosispunkt ausgesät und nochmals 36 h inkubiert. Die Zellen für die BrdU-Färbung wurden ebenfalls trypsiniert und in Medium das 0,5 % frisch hergestellte und steril filtrierte BrdU-Lösung (1 mg/ml BrdU, Sigma, in Wasser) enthielt, ausgesät und anschließend ebenfalls 36 h inkubiert. Um das BrdU vor Licht zu schützen, wurden die Flaschen mit Aluminiumfolie umwickelt und das Licht bei der Zugabe so gut wie möglich vermieden.

3.3 Herstellung der Präparate

Die Präparation der Chromosomen erfolgte nach [Fres94], wobei die einzelnen Schritte und Parameter wurden experimentell für diese Zelllinie optimiert.

3.3.1 Colcemidzugabe

Nach der Inkubation wurde zuerst am Mikroskop beobachtet wie viele Zellen sich in Teilung befinden. Diese Zellen sind rund, etwas vom Boden abgehoben und reflektieren das Licht, während die anderen Zellen am Boden anhaften und sehr flach sind.

Bei steigender Anzahl sich in Teilung befindlicher Zellen erfolgte die Zugabe von 0,3 µg/ml Colcemid (Biochrom) in das Medium und weitere drei Stunden Inkubation. Das Colcemid dient als Spindelgift, das die Zellen in der Metaphase arretiert. Die Wirkung des Colcemids kann man am Mikroskop beobachten, denn die Metaphasezellen lösen sich vom Boden und schwimmen im Medium. Auch wird ihre Anzahl stetig größer [IAEA86].

3.3.2 Das Zellpellet

In diesem Schritt und in allen weiteren wurde stets darauf geachtet, die Suspensionen mit BrdU im Dunkeln zu handhaben, da die Substanz stark lichtempfindlich ist.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Flaschen aus dem Brutschrank entnommen und kräftig gegen einen festen Untergrund geschlagen. Zusätzlich wurde mit einem Zellschaber gearbeitet, um so viele Zellen wie möglich vom Boden der Flasche zu lösen. Anschließend wurden diese in 50 ml Röhrchen überführt und bei 15°C und 1500 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 37°C warmen hypotonischem Puffer, bestehend aus 6 mg/ml tri-Natriumcitratdihydrat und 4,7 mg/ml KCl (beides Sigma) in destilliertem Wasser, gewaschen. Da der hypotonische Puffer eine niedrigere Salzkonzentration als das Zellinnere besitzt, diffundiert Wasser zum Ausgleich in die Zelle hinein. Die Zellen schwellen an, wodurch die Chromosomen voneinander getrennt und damit besser unterscheidbar werden.

Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen 15 min bei 37°C in Puffer inkubiert und danach mit kalter Fixierlösung (Methanol und 99%ige Essigsäure, beides Merck, im Verhältnis 3:1) dreimal gewaschen.

Die erhaltene Zellsuspension kann man direkt auf den Objektträger aufbringen, oder zur Aufbewahrung mit 7 ml Fixierlösung auffüllen und im Kühlschrank lagern.

3.3.3 Präparation der Objektträger

Die benötigten Objektträger wurden vor Gebrauch in 80%igem Ethanol (Merck) eingelegt und im Kühlschrank aufbewahrt. Zum Präparieren wurden sie aus dem Alkohol entfernt und unter fließendem kaltem Wasser abgewaschen.

Vom Zentrifugat wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit einer kleinen Menge Fixierlösung unter Schütteln so aufgefüllt, dass eine milchig trübe Lösung entstand. Die Objektträger wurden erneut intensiv unter kaltem Wasser abgespült und 25 µl Zellsuspension auf diese aufgetragen. Anschließend wurden jene, die nur mit Giemsa gefärbt werden sollten, an der Luft getrocknet. Die Objektträger für die BrdU-Färbung lagerten noch 3 – 7 Tage im Dunkeln.

3.4 Färbungen der Chromosomenpräparate

3.4.1 Giemsa-Färbung

Für die Giemsa – Färbung wird eine frisch hergestellte Giemsa – Lösung, bestehend aus 2,1% Giemsa (Merck) in PBS (Biochrom) verwendet. Die Färbezeit beträgt 15 min und danach werden die Objektträger zweimal mit A.d. gespült.

3.4.2 BrdU-Färbung

Für die Färbung der mit BrdU versetzten Zellen wurden verschiedene Lösungen benötigt: Zum einen Weise-Puffer, der aus einer Mischung von 150,4 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ und 36,3 g/l KH_2PO_4 in A.d. besteht. Zum zweiten wurde aus 0,1 mg/ml Hoechst (Bisbenzimid H33258 bzw. Benzimidtrihydrochlorid, Sigma) in Weise-Puffer die Hoechst-Lösung hergestellt. Die dritte benötigte Lösung war eine zweifach konzentrierte 61°C warme SSC-Lösung (Sodium citrate / Sodium chloride) zusammengesetzt aus 6,58 g/l NaCl und 1,10 g/l $\text{Na}_3\text{O}_7\text{C}_6\text{H}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in A.d. Die SSC-Lösung diente zum Auswaschen der DNS, die durch das UV-Licht photolytisch und degradiert wurde.

Die Präparate wurden zuerst 10 min in der Hoechst-Lösung gefärbt und anschließend mit A.d. gewaschen. Danach wurden sie mit Weise-Puffer überschichtet und eine Stunde mit UV-Licht bestrahlt. Das UV-Licht löst dabei die Photolyse der BrdU substituierten DNS aus, die anschließend zum Teil abgebaut wird.

Nach 30 Minuten Inkubation in 61°C SSC-Lösung wurden sie mit A.d. gespült und abgekühlt. Danach erfolgte die in Abschnitt 3.4.1 beschriebene Giemsa-Färbung (25 – 30 min). Die Stränge mit der degradierten DNS wurden schwächer angefärbt, da sich das Giemsa nicht anlagern konnte. Zum Schluss wurden die Objektträger noch zweimal mit A.d. gespült und an der Luft getrocknet.

4. Ergebnisse

4.1 Chromosomenaberrationen

Die nach der Bestrahlung inkubierten Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit Colcemid behandelt und die so erhaltenen Metaphasenzellen auf Objektträger gebracht (Kapitel 3.3). Nach der Färbung der Chromosomen mit Giemsa (Kapitel 3.4) wurden für jeden Dosiswert bei beiden Röntgenenergien möglichst 500 Zellen gezählt und die Anzahl der Aberrationen bestimmt. Dabei wurden die dizentrischen Chromosomen und die zentrischen Ringe, wie schon in 2.3 erwähnt, als zu einer Klasse von Aberrationen gehörig gezählt. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst.

Tab. 4: Auswertung der Chromosomenaberrationen nach 200 kV Röntgenbestrahlung

Dosis in Gy	gezählte Metaphasenzellen (N_0)	Anzahl Fragmente	Anzahl DzR	C_F	C_{DzR}
0	500	61	1	$0,122 \pm 0,016$	$0,002 \pm 0,002$
0,5	500	72	11	$0,144 \pm 0,017$	$0,022 \pm 0,007$
1	500	115	15	$0,230 \pm 0,021$	$0,030 \pm 0,008$
2	500	144	29	$0,288 \pm 0,024$	$0,058 \pm 0,011$
3	402	148	23	$0,368 \pm 0,030$	$0,057 \pm 0,012$
5	500	444	118	$0,888 \pm 0,042$	$0,236 \pm 0,022$

Tab. 5: Auswertung der Chromosomenaberrationen nach 25 kV Röntgenbestrahlung

Dosis in Gy	gezählte Metaphasenzellen (N_0)	Anzahl Fragmente	Anzahl DzR	C_F	C_{DzR}
0	500	71	1	$0,142 \pm 0,017$	$0,002 \pm 0,002$
0,5	500	126	5	$0,252 \pm 0,022$	$0,010 \pm 0,004$
1	500	166	6	$0,332 \pm 0,026$	$0,012 \pm 0,005$
2	500	246	21	$0,492 \pm 0,031$	$0,042 \pm 0,009$
3	500	370	49	$0,740 \pm 0,038$	$0,098 \pm 0,014$
5	160	208	29	$1,300 \pm 0,090$	$0,181 \pm 0,034$

DzR: dizentrische Chromosomen und zentrische Ringe, C_F : Konzentration der Fragmente pro Zelle,

C_{DzR} : Konzentration an dizentrischen Chromosomen und zentrischen Ringen pro Zelle

Zur Auswertung der erhaltenen Ergebnisse wurden die Poissonverteilung und die Fehlerfortpflanzung (Größtfehlerrechnung) benutzt. Die Poissonverteilung wird angewendet für seltene Ereignisse wie radioaktiven Zerfall und stochastische Prozesse in der Biologie, so wie auch für die Beschreibung der Chromosomenaberrationen [IAEA86]. Für diese Verteilung gilt, dass der Erwartungswert μ gleich der Varianz σ^2 entspricht, wobei die Standardabweichung (Fehler) σ durch

$$\sigma = \sqrt{\mu} \quad (9)$$

gegeben ist.

Die Fehlerfortpflanzung wird benutzt um den Fehler einer Größe zu bestimmen, die von mehreren Variablen abhängt. Für den Quotienten zweier Variablen x und y wird bei bekannten Standardabweichungen Δx und Δy der Fehler durch

$$\Delta\left(\frac{x}{y}\right) = \frac{1}{y^2} \sqrt{\Delta x^2 * y^2 + \Delta y^2 * x^2} \quad (10)$$

bestimmt.

Im vorliegenden Versuch wurde die Konzentration der Aberrationen C durch den Quotienten aus der Anzahl der Aberrationen N und der Anzahl der ausgewerteten Metaphasenzellen N_0 bestimmt:

$$C = \frac{N}{N_0} \quad , \quad (11)$$

wobei N für die Anzahl der Fragmente (F) bzw. der dizentrischen Chromosomen und zentrischen Ringe (DzR) steht.

Wendet man Gleichung (10) auf Gleichung (11) an ergibt sich

$$\Delta C = \frac{1}{N_0^2} \sqrt{\Delta N^2 * N_0^2 + \Delta N_0^2 * N^2} \quad . \quad (12)$$

Hierbei gilt $\Delta N_0 = 0$, da davon ausgegangen wird, dass die Anzahl der gezählten Zellen exakt ist. Aufgrund dieser Annahme vereinfacht sich Gleichung (12) zu

$$\Delta C = \frac{\Delta N}{N_0} \quad . \quad (13)$$

Aus Gleichung (13) folgt mit $\Delta N = \sqrt{N}$ (siehe Gleichung (9))

$$\Delta C = \frac{\sqrt{N}}{N_0} \quad . \quad (14)$$

Damit ergibt sich die Konzentration der Aberrationen pro Zelle als

$$C = \frac{N}{N_0} \pm \frac{\sqrt{N}}{N_0} \quad . \quad (15)$$

Mit den für verschiedene Strahlendosen D ermittelten Konzentrationen der Aberrationen wurden Dosis-Effekt-Kurven $C(D)$ für beide Röntgenenergien berechnet. Hierzu wurden die Daten aus Tabelle 4 und 5 mit dem Programm Origin der Gleichung (6) angepasst („Fit“). Dabei war c durch die Konzentration der Aberrationen in der Kontrolle gegeben. Das Ergebnis für beide Röntgenenergien ist in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt und die bei der Regression bestimmten Parameter a , b und r enthält Tabelle 6, wobei r für den Regressionskoeffizienten steht.

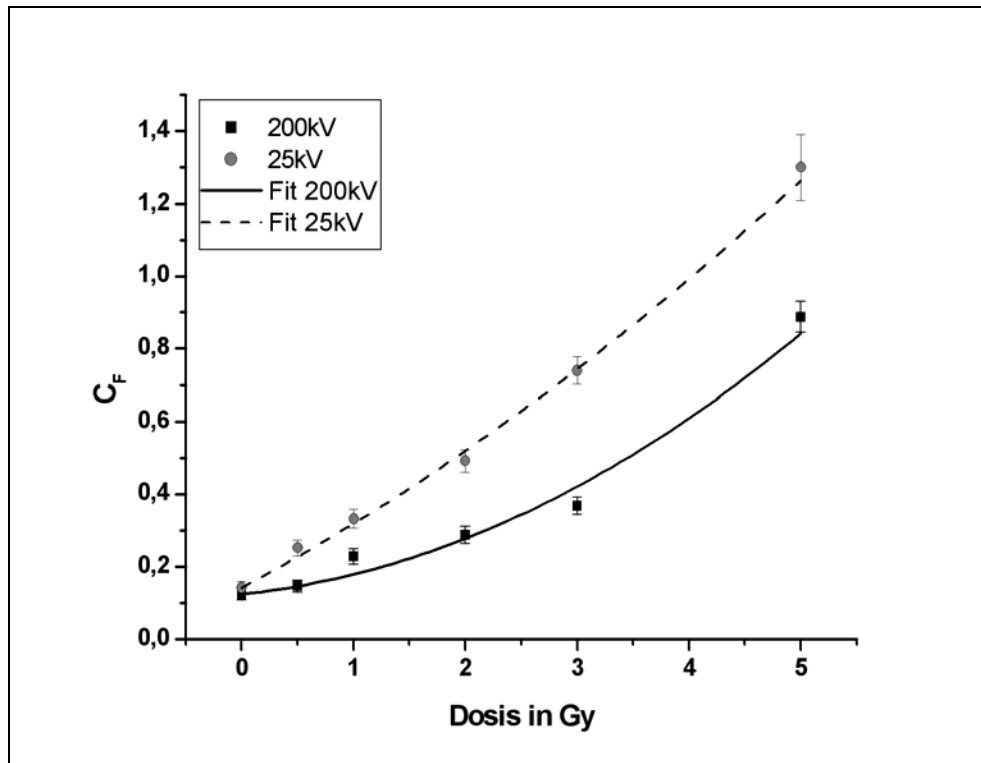


Abb. 12: Graphische Darstellung der erhaltenen Konzentrationen von Fragmenten C_F pro Zelle in Abhängigkeit von der Dosis für zwei Röntgenenergien. Die Berechnung von C_F einschliesslich des Fehlers erfolgte mit Gleichung (15).

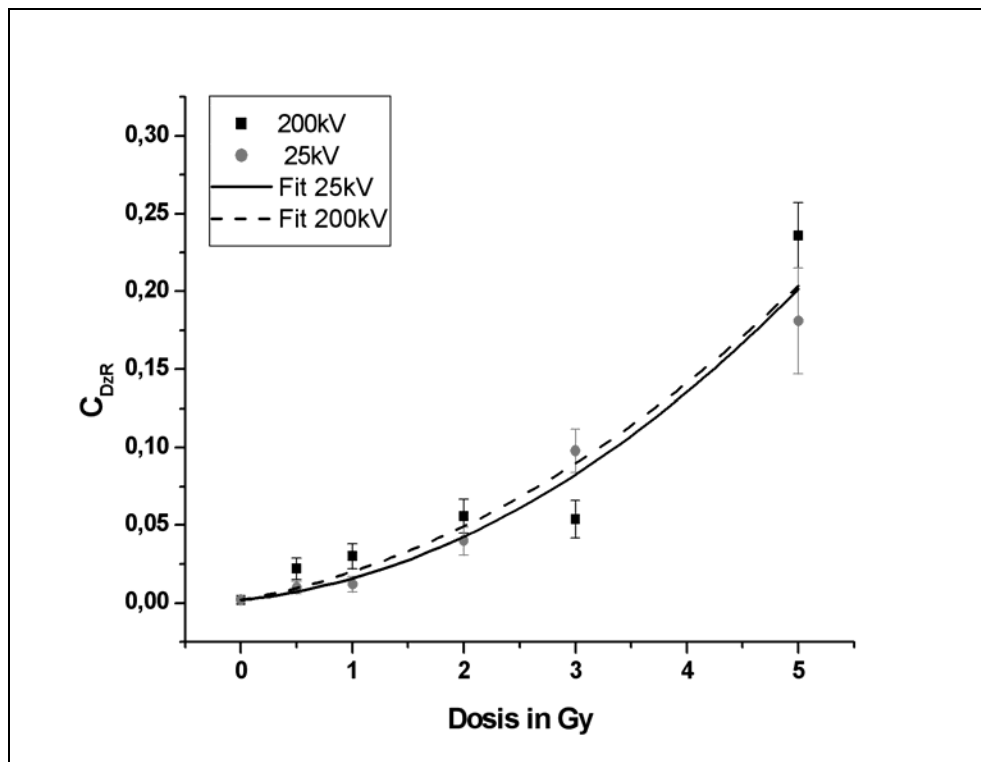


Abb. 13: Graphische Darstellung der erhaltenen Konzentrationen von dizentrischen Chromosomen und zentrischen Ringen C_{DzR} pro Zelle in Abhängigkeit von der Dosis für zwei Röntgenenergien. Die Berechnung von C_{DzR} einschliesslich des Fehlers erfolgte mit Gleichung (15).

Abbildung 12 kann man entnehmen, dass die Anzahl der Fragmente pro Zelle bei 25 kV Röntgenstrahlung höher liegt als bei 200 kV Röntgenstrahlung. Abbildung 13 zeigt die Anzahl der dizentrischen Chromosome und azentrischen Ringe pro Zelle für beide Röntgenenergien. Aus den angepassten Kurven (siehe auch Tab. 6) ist kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Tab. 6: Die aus der linear-quadratischen Regression der Daten gewonnenen Parameter

Parameter	C_F		C_{DzR}	
	Fit 25 kV	Fit 200 kV	Fit 25 kV	Fit 200 kV
a in Gy^{-1}	0,165±0,015	0,039±0,022	0,0074±0,0039	0,0147±0,0114
b in Gy^{-2}	0,012±0,005	0,021±0,006	0,0066±0,0015	0,0051±0,0033
c	0,142±0,017	0,122±0,016	0,002±0,002	0,002±0,002
r	0,994	0,971	0,972	0,910

Durch Kombination der Gleichungen (2) und (6) erhält man Gleichung (16) zur Berechnung der RBW:

$$RBW = \frac{E_x}{E_{ref}} \bigg|_{D_x = D_{ref}} = \frac{a_x D + b_x D^2 + c}{a_{ref} D + b_{ref} D^2 + c}. \quad (16)$$

Dabei steht x für die 25 kV Röntgenstrahlung und ref für die 200 kV Referenz-Röntgenstrahlung. Aus dieser Gleichung lässt sich durch den Grenzübergang $D \rightarrow 0$ die RBW_M bestimmen:

$$RBW_M = \frac{a_x}{a_{ref}}. \quad (17)$$

Dieser Wert liefert die maximale relative biologische Wirksamkeit einer Strahlung bei niedriger Dosis. Der Fehler von RBW_M wurde mit Gleichung (10) bestimmt.

Für die untersuchte 25 kV Röntgenstrahlung ergab sich für die Schädigung in Form von Fragmentbildung eine RBW_M von $4,2 \pm 2,4$, sowie für die Bildung von dizentrischen Chromosomen und zentrischen Ringen eine RBW_M von $0,5 \pm 0,5$.

In den berechneten Werten der RBW_M spiegelt sich auch der in den Abbildungen 12 und 13 ersichtliche Unterschied in den Anstiegen wieder. So ist in Abbildung 12 zu erkennen, dass die Konzentration der Fragmente pro Zelle bei einer Bestrahlung mit 25 kV steiler mit der Dosis ansteigt, als für 200 kV. Dieser große Unterschied führt zu einer relativen hohen RBW_M . Abbildung 13 zeigt hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kurven, was sich auch im Wert der RBW_M widerspiegelt, der sich im Bereich von eins bewegt.

4.2 BrdU-Färbung

In diesem Teilversuch ging es darum, parallel zur Bestimmung der Chromosomenaberrationen den hierbei gewählten Zeitpunkt der Fixierung zu kontrollieren, um zu gewährleisten, dass sich möglichst viele Zellen in der ersten Metaphase befanden (siehe Kap. 2.4). Hierzu wurden die dafür ausgewählten Zellen nach der Bestrahlung in Medium ausgesät, das BrdU enthielt (siehe Kapitel 3.2). Alle übrigen Schritte zur Herstellung der Präparate, bis auf die in Kap. 3.4.2 beschriebene Färbung wurden analog zur Herstellung der Chromosomenaberrationspräparate durchgeführt.

Die Überprüfung der Fixierungszeitpunkte erfolgte für unbestrahlte (Kontrolle) und mit 5 Gy bestrahlte Zellen für beide Röntgenenergien. Zur Auswertung wurden für jedes Präparat möglichst 500 Zellen gezählt und bewertet. Die Berechnung der Fehler erfolgte nach Gleichung (14), wobei N dem Anteil der Zellen mit zwei Replikationen entspricht und $N_0 = 100$ der Bezugswert ist. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Auswertung der mit BrdU gefärbten Zellen

Präparat	Anzahl der gezählten Metaphasenzellen	Anzahl der Harlekin-Chromosomen	Anteil der Zellen mit mehr als einer Replikation in %
200 kV, K* + BrdU	500	63	12,6±0,04
200 kV, 5 Gy + BrdU	500	16	3,2±0,02
25 kV, K* + BrdU	500	130	26,0±0,05
25 kV, 5 Gy + BrdU	426	8	1,9±0,02

*K... Kontrolle, d.h. ohne Bestrahlung

Den erhaltenen Werten kann man entnehmen, dass der Anteil an Zellen, die bereits zwei Zellzyklen durchlaufen haben, bei der Kontrolle höher ist als bei den mit 5 Gy bestrahlten Zellen. Dies ist unabhängig von der benutzten Röntgenenergie.

5. Diskussion

Die im vorliegenden Versuch gewonnene RBW_M von $4,2 \pm 2,4$ für die strahleninduzierte Erzeugung von Fragmenten bestätigt die Hypothese der gesteigerten biologischen Wirkung niederenergetischer Röntgenstrahlung im Vergleich zu 200 kV Referenz-Röntgenstrahlung. Dieser große Unterschied im Grad der Schädigung war schon in der graphischen Darstellung der Messergebnisse sichtbar, aus der letztendlich durch Regression die Parameter a zur Berechnung der RBW_M bestimmt wurde. Der ermittelte Wert für die RBW_M weist allerdings einen sehr großen Fehler auf, der dadurch zustande kommt, dass nur wenige Daten für die Bestimmung von a zur Verfügung standen. So wurden z.B. bei [Schm02] mehrere Zehntausend Zellen ausgezählt, während es im vorliegenden Versuch nur 5562 waren. Durch Erhöhung der Zahl ausgezählter Zellen ist es sicherlich möglich, die RBW_M exakter zu bestimmen, d.h. den Fehler zu minimieren.

Die bestimmte RBW_M für die strahleninduzierte Erzeugung dizentrischer Chromosomen und zentrischer Ringe liegt mit $0,5 \pm 0,5$ innerhalb des Fehlers im Bereich von Eins. Damit ist eine gesteigerte biologische Wirkung der niederenergetischen Röntgenstrahlung im Vergleich zur 200 kV Referenz-Röntgenstrahlung für diese Chromosomenaberrationen im vorliegenden Versuch nicht bestätigt. Da dizentrische Chromosomen und erst recht zentrische Ringe auch bei höherer Dosis selten auftreten (Vergleich mit Tabelle 4 und 5), weist diese RBW_M einen großen Fehler auf. Noch mehr als bei den Fragmenten ist es deshalb wichtig, durch Erhöhung der Anzahl der ausgewerteten Zellen den Fehler zu minimieren.

Einen Hinweis auf die gesteigerte biologische Wirkung niederenergetischer Röntgenstrahlung auch für dizentrische Chromosomen und zentrische Ringe liefert die Arbeit von Schmid und anderen [Schm02]. Für die Bestrahlung von Lymphozyten mit 29 kV Röntgenstrahlung ermittelten sie eine RBW_M von $1,6 \pm 0,3$ für dizentrische Chromosomen. Inwieweit diese Daten von [Schm02] oder anderen Gruppen, die mit Lymphozyten gearbeitet haben, zum Vergleich herangezogen werden können, ist davon abhängig, ob Lymphozyten und Brustdrüsenepithelzellen gleichermaßen auf Strahlung reagieren. Für die Untersuchung von Brustdrüsenepithelzellen gibt es weder für die strahleninduzierte Erzeugung von Fragmenten noch für die von dizentrischen Chromosomen und zentrischen Ringen Vergleichsdaten.

Teil zwei des Versuchs bestand darin die Anzahl der Replikationen bis zum Ende der Inkubationszeit durch Färbung mit BrdU zu überprüfen.

Wie in Tabelle 7 zu sehen ist, lag der Anteil der Zellen mit zwei vollendeten Zellzyklen bei den Präparaten ohne Bestrahlung deutlich höher, als bei denen, die mit hoher Dosis (5 Gy) bestrahlt wurden. Dies war zu erwarten, da die unbestrahlten Zellen weniger strahleninduzierte Chromosomenschäden aufweisen und deshalb an den Kontrollpunkten nicht arretiert werden bzw. die Schäden so schnell repariert werden können, dass die Arretierung innerhalb der Inkubationszeit wieder aufgehoben wird. Diese Zellen sind somit in der Lage, den Zellzyklus in der Inkubationszeit zweimal zu durchlaufen. Das gleiche wird auch für die Bestrahlung mit niedrigen Dosen bis 1 Gy erwartet, da bei diesen die Schädigungen gering sind. Bei den höheren Dosen ist der Anteil der Zellen mit Chromosomenaberrationen erwartungsgemäß höher. Hier werden mehr Zellen arretiert, auch wird die Arretierung länger dauern bzw. von Dauer sein, da die Schädigungen oftmals komplex und damit entweder schwer oder gar nicht zu reparieren sind.

Die Bestrahlungen mit 25 kV und 200 kV erfolgten an zwei verschiedenen Tagen, wobei die BrdU-Färbung der Kontrolle im ersten Fall einen höheren Anteil an Harlekin-Chromosomen aufweist (Vergleich Tabelle 7). Die unvermeidbare Änderung der äußeren Bedingungen führte dazu, dass in diesem Fall die Inkubationszeit von 36 Stunden möglicherweise zu lang

war. Diese Inkubationszeit wurde in mehreren Vorversuchen vor der Bestrahlung bestimmt und optimiert. Die höhere Anzahl der sich in der zweiten Metaphase befindlichen Zellen wird jedoch bei der Kontrolle keinen Einfluss auf das Ergebnis der Chromosomenaberrationen haben, da sie unbestrahlt sind und die Anzahl der Aberrationen in allen Zellzyklen ungefähr konstant ist. Es kann jedoch einen Einfluss auf das Ergebnis bei niedrigen Dosen geben, da auch hier ein größerer Teil der Zellen eventuell mehrere Zyklen durchlaufen hat. So ist es möglich, dass die bestimmte Konzentration von Chromosomenaberrationen nach oben korrigiert werden muss.

Inwieweit diese Annahme zutrifft, kann nicht gesagt werden, da für diese Dosiswerte keine Untersuchungen mit BrdU gemacht wurden. Für zukünftige Experimente ist es wichtig, möglichst vergleichbare äußere Bedingungen (z.B. Zelltransport, Temperaturänderung) für die verschiedenen Bestrahlungen zu gewährleisten.

Zusammenfassend kann man aber sagen, dass zumindest das Ergebnis für die strahleninduzierte Erzeugung von Fragmenten die in Kapitel 1.1 gestellte These, dass die RBW für niederenergetische Röntgenstrahlung erhöht ist gegenüber höherenergetischer Strahlung, bestätigt. Dies kann bedeuten, dass das Risiko bei der Mammographie durch die Röntgenstrahlung Schädigungen an der DNS zu induzieren, höher ist als bisher angenommen. Um jedoch genaue Aussagen darüber zu liefern wie hoch das Risiko ist, sind weitere Untersuchungen bei verschiedenen Röntgenenergien nötig, die mit einer höheren Anzahl an Zellen durchgeführt werden sollten um die Fehler zu minimieren. Diese Untersuchungen können nach Fertigstellung des ELBE-Beschleunigers mit Channeling-Röntgenstrahlung einer einstellbaren Energie im Bereich von 10 bis 100 keV direkt im Forschungszentrum Rossendorf durchgeführt werden. Damit entfällt auch der Stress, den die Zellen beim Transport von und zu den Röntgenquellen an die TU Dresden erleiden.

6. Zusammenfassung

Im vorliegenden Versuch wurde eine Methode zur Bestimmung der Chromosomenaberrationen etabliert, um die relative biologische Wirksamkeit von niederenergetischer Photonenstrahlung an Brustdrüsenepithelzellen zu untersuchen. Zur Bestimmung der relativen biologischen Wirksamkeit wurden die Zellen mit 25 kV Röntgenstrahlung und 200 kV Referenz-Röntgenstrahlung bestrahlt und die dabei entstandenen Konzentrationen an Chromosomenaberrationen verglichen.

Nach Auswertung der bestrahlten Zellen wurde für die strahleninduzierte Erzeugung von Fragmenten ein RBW_M -Wert von $4,2 \pm 2,4$ ermittelt. Dieses Ergebnis bestätigt die angenommene gesteigerte biologische Wirkung niederenergetischer Röntgenstrahlung.

Für die strahleninduzierte Erzeugung dizentrischer Chromosomen und zentrischer Ringe wurde ein RBW_M -Wert von $0,5 \pm 0,5$ bestimmt. In weiteren Experimenten mit einer erheblich größeren Anzahl an ausgewerteten Metaphasezellen sollte die Genauigkeit dieses Wertes verbessert werden, um zu eindeutigen Schlussfolgerungen zu gelangen.

Parallel zur Auswertung der Chromosomenaberrationen wurde die Anzahl der von den Zellen durchlaufenen Zellzyklen mittels BrdU-Färbung kontrolliert. Wie erwartet war der Anteil der mit 5 Gy bestrahlten Zellen, die mehr als einen Zellzyklus durchlaufen haben, für beide Röntgenenergien mit 1,9 % (25 kV) bzw. 3,2 % (200 kV) sehr gering. Im Unterschied hierzu betrug dieser Anteil bei den unbestrahlten Zellen 26,0 % (Kontrolle für die 25 kV Bestrahlung) bzw. 12,6 % (Kontrolle für die 200 kV Bestrahlung), was auf einen unterschiedlichen Einfluss der äußeren Bedingungen an den Bestrahlungstagen hindeutet.

Die hier etablierte Untersuchung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen soll zur Bestimmung der Abhängigkeit der RBW von der Photonenenergie mit monochromatischer Channeling-Röntgenstrahlung an ELBE fortgeführt werden.

7. Literaturverzeichnis

- [Albe02] Alberts, B. et al.: Molecular Biology of the cell. 4. Auflage, Garland Science, 2002
- [Dörs92] Dörschel, B., Schuricht, V., Steuer, J.: Praktische Strahlenschutzphysik. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 1992
- [Fres94] Freshney, R.I.: Culture of animal cells – A manual of basic technique. 3. Auflage, Wiley – Liss, 205 – 207, 1994
- [Hill00] Hill, M.A.: Radiobiological investigations with monochromatic soft X-rays. Workshop on X-rays from electron beams, 24. – 26.02.2000, FZ Rossendorf
In: Prade, H. (Editor): Wissenschaftlich-Technische Berichte FZR-287, Forschungszentrum Rossendorf, 2000
- [IAEA86] International Atomic Energy Agency: Biological Dosimetry – Chromosomal aberration analysis for dose assessment. Technical Reports Series No. 260, Vienna, 1986
- [Kief89] Kiefer, J.: Biologische Strahlenwirkung. 2. Auflage, Birkhäuser Verlag, 1989
- [Lind00] Lindl, T.: Zell- und Gewebekultur. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2000
- [Pain92] Paine, T.M. et al.: Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. Int. J. Cancer 50, 463 – 473, 1992
- [Pant03] Panteleeva, A. et al.: Clonogenic survival of human keratinocytes and rodent fibroblasts after irradiation with 25 kV x-rays. Radiat. Environ. Biophys. 42, 95 – 100, 2003
- [Schm02] Schmid, E., Regulla, D., Kramer, H.-M., Harder, D.: The effect of 29 kV x rays on the dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes. Radiat. Research 158, 771 – 777, 2002

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jörg Pawelke, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit zu erstellen und der mich mit Diskussionen, Ratschlägen aber auch Kritik unterstützte.

Anna Panteleeva danke ich für die Anleitung und Unterstützung im praktischen Teil der Arbeit, für die Hilfe beim Auswerten der Ergebnisse und für Anregung und Kritik beim Schreiben.

Danke auch an Prof. M. Schlömann, der sich zur Betreuung und Korrektur dieser Arbeit bereit erklärt hat.

Mein Dank gilt auch Prof. W. Dörr für die Möglichkeit der Zellbestrahlungen an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der TU Dresden.

Connie Schulze danke ich für die grammatikalische Hilfe und für das Lesen der Arbeit aus studentischer Sicht.

Meinem Freund Markus danke ich für die Geduld und Unterstützung während des Schreibens.



Forschungszentrum Rossendorf
Postfach 51 01 19 • 01314 Dresden
Telefon +49 351 260-3657
Telefax +49 351 260-3700
Email: j.pawelke@fz-rossendorf.de
<http://www.fz-rossendorf.de>

Mitglied der Leibniz Gemeinschaft

Als Manuskript gedruckt
Alle Rechte beim Herausgeber