

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Kommissarische Direktorin: Frau PD Dr. med. habil. Gabriele Hänsgen

# **Interzelluläre Heterogenität strahleninduzierten DNS-Schadens im Comet-Assay**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von *Clemens Konstantin Seidel*  
geboren am 05. Februar 1979 in Halle (Saale)

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. Jürgen Dunst

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. Dunst (Lübeck)
2. PD Dr. H. Taubert
3. Prof. Dr. R. Fietkau (Rostock)

Verteidigungsdatum: 11.05.2006

**urn:nbn:de:gbv:3-000010338**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010338>]

*Meiner Familie*

## Referat

Einleitung: Leben ist heterogen. Gewebe und Zellen unterscheiden sich in ihrer Strahlenempfindlichkeit bzw. im DNS-Schaden nach Bestrahlung. Anhand von experimentellen Modellen wurde überprüft, ob die im Comet-Assay messbare Schadensheterogenität durch die Faktoren Chromatinstruktur/Histongehalt, Antioxidantien, Röntgenstrahlung, Reparatur strahlenbedingter DNS-Schäden und mehrfache Bestrahlung veränderlich ist. Methodik/Ergebnisse: Nach der Entfernung von Histonproteinen durch Lyse vor Bestrahlung war die Schadensvarianz größer als in Zellen, die vor Bestrahlung eine intakte Chromatinstruktur aufwiesen, während nach Zusatz des starken Antioxidanz DMSO zu dieser Lyselösung das Niveau der Schadensvarianz auf das von in intaktem Zustand bestrahlten Zellen reduziert wurde. Ein- und mehrfache Bestrahlung vergrößerten die Varianz des Schädigungsmittels, während Residualschaden nach ein- bzw. zweifacher Bestrahlung und Reparatur eine signifikant kleinere Varianz als Initialschaden zeigte. Insgesamt korrelierten Schädigungsmittel und –varianz hochgradig positiv miteinander, so dass auch Berechnungen mit mittelwertkorrigierten Varianzen, d.h. gegen Änderungen des Schädigungsmittelwertes stabilen Streuungsparametern, durchgeführt wurden, auf welche nur mehrfache Bestrahlung und Reparatur signifikante Effekte zeigten. Diskussion: Schadensheterogenität ist mit dem Comet-Assay diskriminierbar. Die erhaltenen Ergebnisse erlauben in Verbindung mit vorhandener Literatur die Hypothese, dass Heterogenität von DNS-Initialschaden einer Normalzellpopulation im Comet-Assay nicht durch interzelluläre Differenzen der Antioxidantienkonzentration bedingt ist, sondern Produkt chromatinmodulierter quantitativer Schadensunterschiede, bzw. der durch den DNS-Packungsgrad und vor allem den mittleren Schadensgrad beeinflussten Messbarkeit des Schadens mit dem Comet-Assay ist. Residual- und Basalschaden werden in ihrer Heterogenität entscheidend durch Reparatur beeinflusst. Implikation: Vergleichende Aussagen zur Schadensheterogenität zweier Zellpopulationen können insbesondere dann getroffen werden, wenn gegen Einflüsse des Schadensmittels stabile Parameter Verwendung finden, z.B. mittelwertkorrigierte Varianzen des Schädigungsmittelwertes.

Seidel , Clemens:

Interzelluläre Heterogenität strahleninduzierten DNS-Schadens im Comet-Assay  
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2005

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>iv</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Heterogenität von DNS-Schaden.....	1
1.2 Zielstellung dieser Arbeit.....	2
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>3</b>
2.1 Der Comet-Assay.....	3
2.1.1 <i>Entwicklung des Verfahrens</i> .....	3
2.1.2 <i>Prinzip des alkalischen Comet-Assay</i> .....	5
2.1.3 <i>Anwendungsbereiche</i> .....	6
2.2 Material .....	7
2.2.1 <i>Lösungen, Verbrauchsgegenstände, sonstige Hilfsmittel</i> .....	7
2.2.2 <i>Probandengruppe für Untersuchungen zur Heterogenität</i> .....	7
2.3 Methoden .....	8
2.3.1 <i>Blutentnahme</i> .....	8
2.3.2 <i>Objektträgerbeschichtung</i> .....	8
2.3.3 <i>Zellanzahlbestimmung</i> .....	9
2.3.4 <i>Bestrahlung</i> .....	9
2.3.5 <i>Reparatur</i> .....	10
2.3.6 <i>Lyse</i> .....	10
2.3.7 <i>Entwinden in Alkali</i> .....	11
2.3.8 <i>Elektrophorese</i> .....	12
2.3.9 <i>Neutralisation</i> .....	12
2.3.10 <i>Anfärbung</i> .....	12
2.3.11 <i>Auswertung</i> .....	12
2.4 Gliederung der Experimente zur Heterogenität.....	14
2.4.1 <i>Einfluss der Chromatinstruktur</i> .....	15
2.4.2 <i>Einfluss antioxidativer Substanzen</i> .....	16
2.4.3 <i>Einfluss der Reparatur auf die Schadensheterogenität</i> .....	16
a) <i>von DNS-Schaden nach Bestrahlung mit 4 Gy</i> .....	16
b) <i>von DNS-Basalschaden</i> .....	16

2.4.4	<i>Einfluss zweifacher Bestrahlung</i> .....	19
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>20</b>
3.1	Vereinfachung des Verfahrens .....	20
3.2	Untersuchungen zur Evaluation der Diskriminationsschärfe des Messverfahrens .....	21
3.3	Vorversuche zur Heterogenität von DNS-Schaden .....	24
3.3.1	<i>Bestrahlung und verschiedene Reparaturzeiten</i> .....	25
3.3.2	<i>Lysedauer nach Bestrahlung</i> .....	27
3.3.3	<i>Lysedauer vor Bestrahlung</i> .....	28
3.4	Ergebnisse der Untersuchungen zur Heterogenität .....	29
3.4.1	<i>Schadensvarianzen für alle Proben einzelner Probanden</i> .....	29
3.4.2	<i>Probandenübergreifende Varianzvergleiche – gegliedert nach Einflussfaktoren</i> .....	30
3.4.3	<i>Modell zur quantitativen Analyse varianzverändernder Faktoren</i> .....	39
3.4.4	<i>Zusammenhang zwischen Schadensmittelwert und Varianz des DNS-Schadens</i> .....	42
3.4.5	<i>Einfluss der einzelnen Faktoren auf mittelwertkorrigierte Varianzen</i> .....	44
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>46</b>
4.1	Wie entsteht die Heterogenität des Initialschadens? - Hypothesen .....	46
4.1.1	<i>Schadensheterogenität als Ergebnis ungleich vieler DNS-Strangbrüche durch interzellulär differierenden Antioxidantiengehalt</i> .....	47
4.1.2	<i>Heterogenität in Abhängigkeit von DNS-/Chromatinkonformation</i> .....	48
4.1.3	<i>Heterogenität durch Eigenschaften des Comet-Assay</i> .....	49
4.1.4	<i>Heterogenität in Abhängigkeit von anderen Faktoren</i> .....	51
4.2	Heterogenität des Residualschadens – welchen Einfluss hat die Schadensreparatur? .....	54
4.2.1	<i>Wie erfolgt die Reparatur von radiogenen DNS-Schäden?</i> .....	54
4.2.2	<i>Warum reparieren manche Zellen schneller als andere?</i> .....	55
4.3	Heterogenität des Basalschadens – ein Artefakt? .....	57
4.4	Praktische Implikationen .....	59
4.5	Zusammenfassung .....	60
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>63</b>

<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>69</b>
6.1	Materialien .....	69
	<i>Tabelle 6.1.1 Lösungen/Reagenzien</i> .....	69
	<i>Tabelle 6.1.2 Geräte/Hilfsmittel</i> .....	70
	<i>Tabelle 6.1.3 Verbrauchsmaterialien</i> .....	70
6.2	Ergebnisse .....	71
	<i>Tabelle 6.2.1 Ergebnisse von Vorversuchen</i> .....	71
	<i>Tabelle 6.2.2 Datenmatrices aller Probanden</i> .....	72
	<i>Tabelle 6.2.3 Ergebnisse zur Heterogenität/Varianzvergleich</i> .....	77
	<i>Tabelle 6.2.4 Vergleich mittelwertkorrigierter Varianzen</i> .....	78
<b>7</b>	<b>Thesen</b> .....	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Anm.	Anmerkung
Aqua dest.	Aqua destillata
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere
FKS	fetales Kälberserum
LET	linearer Energietransfer
LMP-Agarose	Low-Melting-Point-Agarose
Med	Median
min	Minute
Mw	Mittelwert
OH-	Hydroxyl-
OT	Objektträger
PBS	Phosphate buffered Saline
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI-Medium	im Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1966 entwickeltes Kulturmedium
s	Standardabweichung
sog.	sogenannte/-er
Tab.	Tabelle
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
Var	Varianz
Var/Mw	mittelwertkorrigierte Varianz = Quotient Varianz/Mittelwert
95% KI	95%iges Konfidenzintervall

## **1 Einleitung**

### **1.1 Heterogenität von DNS-Schaden**

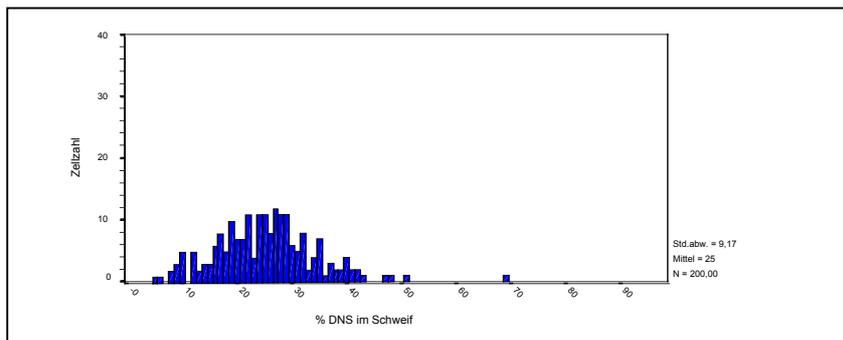
„The variability in the trees makes up the complexity of the forest“ (Heppner, Miller, 1998).

Die Heterogenität von Zellen und Zellpopulationen innerhalb eines Zellverbands befindet sich seit vielen Jahrzehnten im Fokus wissenschaftlichen Interesses. Hierbei ist die Liste von Charakteristika, in denen sich Zellpopulationen, z.B. innerhalb eines Tumors, voneinander unterscheiden können, lang. Sie umfasst alle Bereiche zellulären Lebens von Karyotyp und Enzymbestand über Zellmorphologie und Rezeptorbesatz bis zu Wachstums- und Metastasierungsrate, sowie die Empfindlichkeit gegenüber therapeutischer Intervention (Heppner, 1984). Verfahren zur Messung verschiedener Dimensionen zellulärer Heterogenität wurden folglich in großer Zahl entwickelt und angewandt.

So wurden auch Verfahren konzipiert, die genotoxische Effekte bzw. DNS-Schäden nicht einzig als Mittelwert für einen Zellverband bestimmen, sondern die in der Lage sind, Aussagen über die Heterogenität der Ausprägung von DNS-Schaden für alle Zellen innerhalb einer Population, bzw. unter Subpopulationen von Zellen zu treffen. Der Comet-Assay ist eines dieser Verfahren. Er weist als Besonderheit eine gute Auflösungsfähigkeit auf, die es erlaubt, Zellpopulationen zu unterscheiden, die sich nur geringgradig im jeweiligen mittleren DNS-Schaden unterscheiden (Olive et al., 1992)

Subpopulationen von verschiedenen chemosensitiven Zellen (Olive et al., 1997), wie auch euoxischen und hypoxischen Zellen nach Bestrahlung (Olive, Durand, 1992), wurden basierend auf unterschiedlich schwerem DNS-Schaden differenziert. Neben der reinen Differenzierung von Zellen anhand unterschiedlicher Quantität von DNS-Schaden wurden auch andere Möglichkeiten überprüft, anhand derer eine Unterscheidung separater Zellpopulationen in einem Zellverband möglich ist. Exemplarisch sollen hier nur Zellkerngröße, bzw. Form von Kopf und Schweif der „Kometen“ (Bock et al., 1999) oder die Verwendung von „Immunobeads“ zur Zellseparation erwähnt werden (Godard et al., 2002).

Bei Untersuchungen zu quantitativen Unterschieden im DNS-Schaden wurde jedoch der Heterogenität nur einer Population, die sich nach Auswertung mit dem Comet-Assay als eingipflige Häufigkeitsverteilung darstellen lässt (siehe *Abb. 1.1*), wenig Beachtung geschenkt. So ist auch nicht bekannt, wodurch diese Heterogenität des im Comet-Assay ersichtlichen DNS-Schadens innerhalb einer Zellpopulation zustande kommt.



*Abb. 1.1* Histogrammdarstellung einer mit 4 Gy bestrahlten Zellpopulation. Auf der Abszisse ist der DNS-Schadensgrad in %DNS im Schweif abgetragen auf der Ordinate die Zellzahl. Ausgewertet wurden 200 Zellen.

## 1.2 Zielstellung dieser Arbeit

Nach Schilderung einiger Ergebnisse von Vorversuchen zur Festlegung des experimentellen Aufbaus (Abschnitte **3.1** – **3.3**) soll dargelegt werden, ob und wodurch die im Comet-Assay gemessene Schadensheterogenität, also die interzellulär verschiedene Ausprägung von DNS-Schaden, verändert werden kann, oder ob diese Schadensheterogenität als unveränderliche Größe anzusehen ist.

Untersucht werden soll insbesondere, ob folgende Faktoren die Heterogenität des DNS-Schadens beeinflussen:

- Chromatinstruktur/Histongehalt,
- Antioxidantien (lösliche Radikalfänger),
- Röntgenstrahlung,
- Reparatur strahlenbedingter DNS-Schäden,
- mehrfache Bestrahlung

Als objektivierbares Maß für Schadensheterogenität sollen hierbei Varianzen - also quadrierte Standardabweichungen - von Schädigungsmittelwerten dienen, welche im Rahmen der statistischen Auswertung (im Abschnitt **3.4**) miteinander verglichen werden sollen.

Streuungsparameter wie die Varianz des Schädigungsmittelwertes werden verwendet werden, da diese im Gegensatz zur subjektiven, visuellen Interpretation von Häufigkeitsverteilungen und mathematisch aufwendiger Funktionsanalyse einfach zu gewinnende Parameter darstellen, die bei mehrfacher Durchführung gleicher Experimente unter Gewinnung statistisch signifikanter Aussagen vergleichbar sind. Eine kleine Varianz des Schadensmittelwertes kann als Ausdruck quantitativ homogenen DNS-Schadens angesehen werden, während große Varianzen im Sinne heterogenen DNS-Schadens interpretiert werden können.

Im Kontext vorhandener Literatur sollen im Zentrum dieser Arbeit (Abschnitte **4.1 – 4.3**) potentielle Mechanismen der Entstehung von Schadensheterogenität im Comet-Assay skizziert und diskutiert werden.

Abschließend (Abschnitt **4.4**) sollen Vor- und Nachteile sowie einige Anwendungsmöglichkeiten verschiedener Parameter zur Messung von Heterogenität erörtert werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Der Comet-Assay**

Die Einzelzellgelelektrophorese, bzw. der Comet-Assay dient zur Quantifizierung von DNS-Schäden. Er wurde basierend auf anderen Verfahren in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelt und in den nachfolgenden Jahrzehnten empirisch modifiziert und verbessert.

#### **2.1.1 Entwicklung des Verfahrens**

1976 erkannten Cook und Brazell, dass zelluläre DNS nach Lyse von Membranen und Entfernung von nukleären Proteinen in einer kernähnlichen Struktur - dem sog. Nukleoid - verbleibt (Cook, Brazell, 1976). Der Nukleoid besteht aus nukleären Matrixproteinen, der an sie fixierten DNS und einigen verbliebenen Proteinen.

Zwei Jahre später versuchten Rydberg und Johanson basierend auf diesen Erkenntnissen eine Messung strahleninduzierter DNS-Schäden. Sie lysierten in Agarose eingebettete Zellen in alkalischer Lösung nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und färbten dann die im Nukleoid verbleibende DNS mit einem interkalierenden Farbstoff (Acridinorange), wodurch sich Doppelstrang-DNS grün und Einzelstrang-DNS rot färbte. Mit zunehmender Strahlendosis erschienen die rot gefärbten Anteile diffuser (Rydberg, Johanssen, 1978), d.h. die Einzelstrang-DNS schien in eine größere Anzahl von Abschnitten unterteilt. Es gelang also, strahleninduzierte DNS-Einzelstrangbrüche nicht nur sichtbar, sondern auch quantifizierbar zu machen.

Im Jahre 1984 erreichten Östling und Johanson eine sensitivere und genauere Messung von DNS-Schäden, indem sie die DNS von Zellen, welche erst in Agarose eingebettet und dann lysiert worden waren, einer zusätzlichen Elektrophorese unterzogen (Östling, Johanson, 1984). Ein Teil der negativ geladenen DNS wurde zur Anode hin ausgezogen, so dass sich neben dem DNS-haltigen „Kopf“ ein ebenfalls DNS-haltiger „Schweif“ darstellte.

Nach Anfärbung mit interkalierenden Farbstoffen ähnelte die so verteilte DNS dem Bild eines Kometen (*siehe Abb. 2.5, S.13*), was dazu führte, dass die Einzelzellgelelektrophorese ihren weitaus bekannteren Namen – den des „Comet-Assays“ – erhielt.

Aus der von Östling et al. etablierten Technik leiteten sich in der Folgezeit verschiedene Formen des Comet-Assay ab. Neben dem alkalischen Comet-Assay, dessen noch heute übliche Form erstmals 1988 von Singh beschrieben wurde (Singh et al., 1988), führten Olive et al. 1991 den neutralen Comet-Assay ein.

Letzterer dient zur Bestimmung von Doppelstrangbrüchen der DNS, während mit dem alkalischen Comet-Assay vornehmlich Einzelstrangbrüche erfasst werden (Olive et al., 1991).

Das Prinzip des alkalischen Comet-Assay soll hier erläutert werden, da er im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden soll.

## 2.1.2 Prinzip des alkalischen Comet-Assay

Der alkalische Comet-Assay weist folgenden Struktur auf:

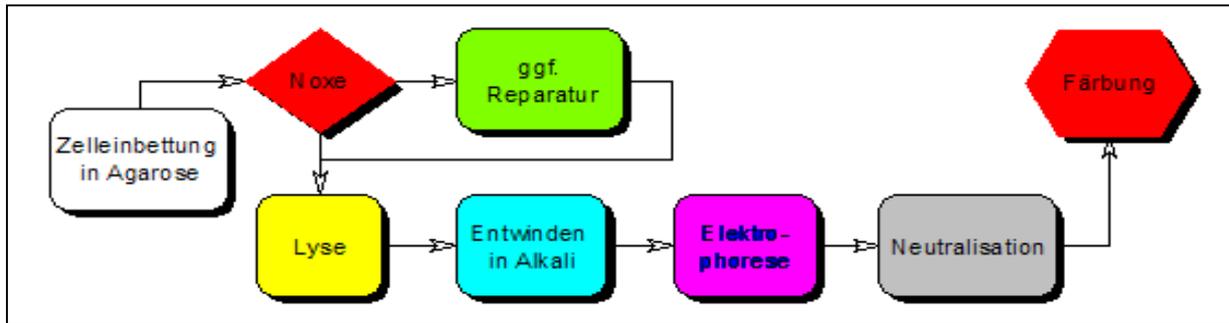


Abb. 2.1) Ablauf des alkalischen Comet-Assay

Zellen werden im Rahmen der Einbettung in Agarose von Agarose umschlossen. Nach der sich anschließenden Lyse, im Rahmen derer die Zellmembranen durch Detergentien durchgängig gemacht und zelluläre Proteine durch eine hohe Salzkonzentration entfernt werden, verbleibt aufgrund des hohen Molekulargewichts fast ausschließlich DNS in diesem Hohlraum, während andere Zellbestandteile in die Lyselösung diffundieren (Östling, Johanson, 1984).

Die verbleibende DNS ist strukturell verschieden von der DNS im Kern vollständiger, vitaler Zellen, denn neben extranukleären Proteinen werden auch nukleäre Proteine (Histone) mittels Lyse entfernt. Die Auflösung von Protein-DNS Bindungen durch die hohe Ionenkonzentration der Lyselösung führt auch zu einer starken Veränderung höhergradiger DNS-Konformation (Singh, 2000).

Die sich anschließende Behandlung mit alkalischer Lösung zieht einen Kollaps der DNS-Basenpaarung und das Entwinden der Doppelstrang-DNS nach sich (Collins, 1992), weiterhin wird eine Degradierung von RNS beschrieben (Singh, 2000).

Im Anschluss an das Entwinden erfolgt die Elektrophorese ebenfalls in alkalischer Lösung, in der die negativ geladene DNS zur Anode "strömt". Die Art und Weise, mit der dies geschieht, war und ist Gegenstand der Kontroverse. Östling berichtete von einer strangförmigen DNS-Struktur in Wanderungsrichtung der DNS, bezweifelte aber eine Wanderung von DNS-Abschnitten im herkömmlichen Sinne (Östling et al., 1987). Auch andere Autoren schlossen aus der konstanten Länge der Kometen bei verschiedenen DNS-Schadensgraden eher auf eine durch Strangbrüche induzierte Relaxation des „DNS-Supercoiling“ als auf Wanderung von DNS-Fragmenten im eigentlichen Sinne (Collins, 1992), (McKelvey-Martin et al., 1993).

Faibairn et al. beschrieben eine von der Dosis der schädigenden Noxe abhängige Veränderung des Wanderungsprinzips der DNS. Sie gingen davon aus, dass bei einer geringen Dosis und somit wenigen Strangbrüchen vornehmlich Dehnung der relaxierten DNS erfolgen würde, während bei einer größeren Anzahl von Strangbrüchen freie Migration der DNS anzutreffen sei (Fairbairn et al., 1995). Singh et al. waren ebenfalls der Auffassung, dass der dem Nukleoid nahe Teil der Kometen aus gedehnten DNS-Strängen bestünde, die an noch verbliebenen Anteilen der nukleären Matrix fixiert wären. Im Gegensatz dazu sei der bei höheren Dosen auftretende distale Teil der Kometen aus freien DNS-Fragmenten zusammengesetzt (Singh, 2000).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass sowohl die Relaxation hoch verdichteter DNS als auch das Vorliegen von DNS-Fragmenten, die Migration der DNS in Richtung Anode ermöglichen. Hierbei ist der erstgenannte Faktor derjenige, der bei niedrigen Schadensgraden überwiegt.

Ursachen für Relaxation und Fragmentation nukleärer DNS sind Diskontinuitäten innerhalb der DNS. Die vom alkalischen Comet-Assay vorwiegend erfasste Diskontinuitätsart stellen Einzelstrangbrüche dar. Neben der Erfassung von Einzelstrangbrüchen, die direkt durch schädigende Noxen (z.B. Röntgenstrahlen und  $H_2O_2$ ) verursacht sind, werden auch Strangbrüche registriert, die sekundär, z.B. durch den Bruch von vorgeschädigten DNS Bereichen bei basischem pH (sogenannte alkali-labile Stellen) oder nach Exzisions-Reparatur entstehen (Tice, Strauss, 1995), (Anderson, Plewa, 1998). Auch kann die Einwirkung von interkalierenden Stoffen (z.B. Cisplatin, Bleomycin, Mitomycin) gemessen werden, welche Verbindungen („cross-links“) zwischen DNS-Bereichen erzeugen. In solchen Fällen wird eine retardierte DNS-Migration beobachtet (Kassie et al., 2000).

### **2.1.3 Anwendungsbereiche**

Der Comet-Assay hielt insbesondere wegen seiner hohen Sensitivität und der Messbarkeit von DNS-Schäden auf zellulärer Ebene, sowie wegen des geringen finanziellen Aufwands in verschiedene wissenschaftliche Bereiche Einzug. Neben den „klassischen“ Bereichen wie Strahlenbiologie und Onkologie ist hier insbesondere der Bereich der Umweltmedizin zu nennen, in dem u.a. der Einfluss

verschiedener Faktoren (z.B. Ernährung, körperliche Anstrengung, schädigende Noxen der Umgebung) auf die DNS untersucht wurde.

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Lösungen, Verbrauchsgegenstände, sonstige Hilfsmittel**

Die Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen ist **Tabelle 6.1.1 - Lösungen und Reagenzien**, S. 69 - zu entnehmen. Alle benötigten Geräte, Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien sind ebenso im Anhang in **Tabelle 6.1.2 und 6.1.3**, S. 70 aufgeführt.

### **2.2.2 Probandengruppe für Untersuchungen zur Heterogenität**

Die Fragestellungen zur Heterogenität wurden mit Hilfe von Blutproben einer Probandengruppe untersucht. Diese Gruppe umfasste insgesamt 5 Probandinnen und Probanden (3 männl., 2 weibl.), die folgende Einschlusskriterien erfüllten:

- Alter: 20-25 Jahre
- Nichtraucher
- keine akuten oder chronischen Erkrankungen
- keine Medikamenteneinnahme am Tag der Probenentnahme sowie am Tag davor (Ausnahme: Kontrazeptiva bei Probandinnen)
- keine Vegetarier oder Veganer
- gleicher Wohnort

Die Probanden wurden weiterhin gebeten, sich am Tag der Probennahme sowie am Tag davor ausgewogen zu ernähren (keine Vitamin C und E Supplementation in Form von Tabletten, Brausetabletten etc.), sowie körperliche Extrembelastungen zu vermeiden.

Diese Auflagen waren aus unserer Sicht notwendig, weil Untersuchungen zeigten, dass neben dem Alter und Rauchen (Betti et al., 1994) auch Ernährung (Green et al., 1994), (Hartmann et al., 1995), (Duthie et al., 1996), körperliche Anstrengung (Hartmann et al., 1994), (Hartmann et al., 1998) und chronische Krankheiten wie

Diabetes (Betancourt et al., 1995), (Collins et al., 1998) Einfluss auf die Ergebnisse des Comet-Assay haben.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Blutentnahme

Jeder teilnehmenden Person wurde venöses Blut entnommen (1 Monovette EDTA-Blut, 1 Zitrat-Monovette). Aus EDTA-Blut wurden Blutbilder bestimmt, während ein Teil des Zitrat-Blutes für die nachfolgenden Schritte des Comet-Assays verwendet wurde.

### 2.3.2 Objektträgerbeschichtung

Objektträger wurden nach der „Sandwich-Layer“- Methode beschichtet, d.h. die zu bestrahlenden Zellen waren in einer mittleren Schicht aus Agarose eingebettet, welche von zwei Agarose Schichten umgeben war (siehe Abb. 2.2)

Die zu beschichtenden Objektträger wurden mit 1% Agarose vorbehandelt, welche über Nacht trocknete. Auf diesen Untergrund wurden zunächst 300 µl 0,6% Agarose aufgebracht. Während diese Schicht 10 min gekühlt gelierte, wurden 60 µl Blut in 1000 µl 0,5%-LMP Agarose eingebracht. Nach vorsichtiger Durchmischung dieser Lösung wurden 85 µl hiervon auf die mittlerweile verfestigte Schicht aus 0,6% Agarose gegeben. Als Deckschicht wurde wiederum eine Schicht aus 85 µl 0.5% LMP-Agarose aufgetragen.

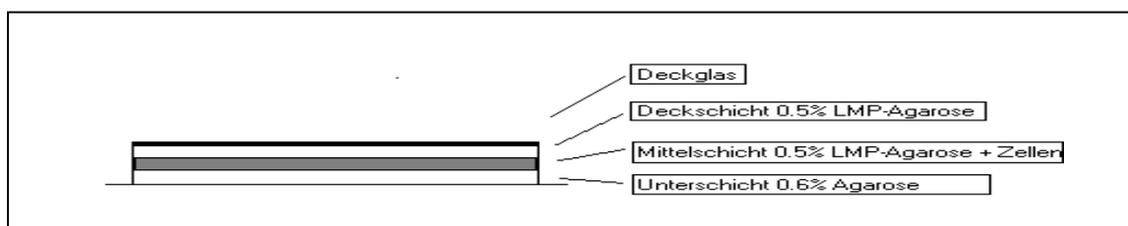


Abb. 2.2) Beschichteter Objektträger

### 2.3.3 Zellanzahlbestimmung

Aus dem automatisch bestimmten Blutbild wurde die Anzahl aller kernhaltigen Zellen (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) pro  $\mu\text{l}$  gewonnen. Diese lag für unsere Probanden in einem Bereich von  $5,2 - 7,9 \times 10^3$  Leukozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut. Da  $60 \mu\text{l}$  Blut mit  $1000 \mu\text{l}$  Agarose gemischt wurden (Verdünnungsverhältnis 1:17,7) und  $85 \mu\text{l}$  hiervon auf jeden Objektträger gegeben wurden, ergab sich die Anzahl der Leukozyten pro Objektträger aus der Formel.

$$\text{Zellzahl pro OT} = \frac{\text{Zellzahl pro } \mu\text{l Blut}}{17,7} \times 85$$

Eine Leukozytenanzahl zwischen ca. 25.000 und 38.000 wurde somit pro Objektträger aufgetragen.

### 2.3.4 Bestrahlung

Nach der Präparation der Objektträger erfolgte die Bestrahlung der Zellen unter Anwendung eines Röntgentiefentherapiegerätes (Philips RT 250) mit einer Dosisleistung von  $208,3 \text{ cGy/min}$  mit einem  $0,5 \text{ mm}$  Kupferfilter und  $200 \text{ kV}$  Röhrenspannung. Die Tubusgröße betrug  $15 \times 20 \text{ cm}^2$ .

Während der Bestrahlung lagen die Objektträger auf einer vorher gekühlten ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) Piacrylplatte. Sie waren gleichfalls von einer  $1 \text{ cm}$  starken Piacrylplatte bedeckt.

Der Versuchsaufbau ist *Abb. 2.3* zu entnehmen. Bestrahlungszeiten pro Strahlendosis sind in *Tabelle 2.1* aufgeführt.

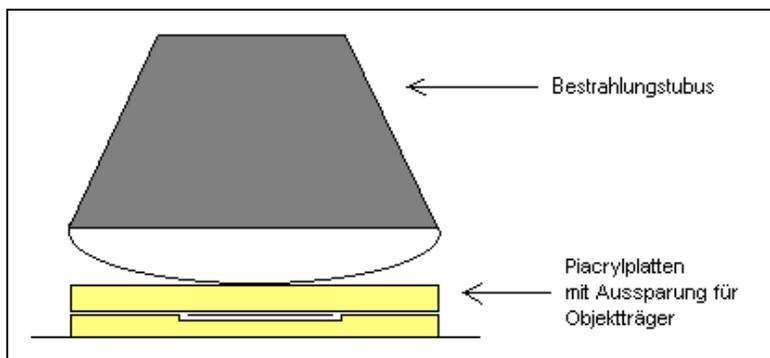


Abb. 2.3) Versuchsaufbau Bestrahlung

Tabelle 2.1) Bestrahlungszeiten pro applizierter Strahlendosis

Dosis (Gy)	0,25	0,5	0,7	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
Zeit (min)	0.12	0.24	0.34	0.48	0.96	1.92	2.88	3.84	4.82

### 2.3.5 Reparatur

Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Objektträger in Gewebekulturplatten mit je 6 ml Reparaturmedium bei 37 °C für die jeweils gewählte Reparaturzeit inkubiert.

Danach wurden sie entweder sofort in die Lyselösung gegeben oder im Falle einer mehrfachen Bestrahlung nochmals bestrahlt.

Sollte keine Reparatur erfolgen, wurden die Objektträger sofort nach der Bestrahlung in die Lyselösung gegeben.

### 2.3.6 Lyse

Um eine Ruptur der Zellmembranen sowie die Entfernung zelleigener Proteine zu bewirken, wurden die Proben für 3h – 4h 30 min bei 4 °C in einer Lyselösung inkubiert. Hervorzuheben ist, dass auf diese Weise die spiralisierte DNS kernhaltiger Blutzellen gebunden an nukleäre Matrix im Agarosegel zurückbleibt. So fanden ausschließlich kernhaltige Blutleukozyten in der späteren Auswertung Berücksichtigung und nicht Erythrozyten und Thrombozyten.

Die Lysegebrauchslösung wurde aus einer Lysestammlösung täglich frisch hergestellt. Alle Bestandteile dieser Lösungen sind mit ihren Konzentrationen *Tabelle 6.1.1*, S. 69, zu entnehmen, während die Funktionen der wichtigsten Lysebestandteile in *Tabelle 2.2* aufgeführt sind.

Tabelle 2.2) Funktionen der Lysebestandteile

Substanz	Funktion
Triton-X 100	Zerstörung von Zell- und Kernmembranen
DMSO (Dimethylsulphoxid)	Wirkung als lösliches Antioxidanz, bzw. als löslicher Radikalfänger
NaCl	Unterbrechung von Protein-Protein Wechselwirkungen

Alternativ zu dieser Lysegebrauchslösung wurde zur Untersuchung des Einflusses der Chromatinstruktur eine Lyse­lösung verwendet, die neben einer 1.5M NaCl-Lösung 1% Triton-X 100 und kein DMSO enthielt (siehe auch Abschnitt **2.4.1**, S.15) Weiterhin fand für Untersuchungen zum Einfluss einer Lyse vor Bestrahlung mit Antioxidantien eine Lösung mit 1.5M NaCl/1% Triton-X 100 und 90mM DMSO Verwendung (siehe auch Abschnitt **2.4.2**, S.16). DMSO ist ein stark wirksamer Radikalfänger, der durch Reaktion mit OH-Radikalen DNS-Schaden verhindert und selbst Sekundär­radikale hervorbringt, die unter Euoxie keine Strangbrüche hervorrufen (Milligan, Ward, 1994) sondern nur Basenschäden (Milligan et al., 1996). DMSO führt somit zur Reduktion messbarer Strangbrüche, wobei eine 90mM DMSO-Lösung eine antioxidative Wirkung aufweist, die der von löslichen intrazellulären Radikalfängern und Histonproteinen zusammen vergleichbar ist (Ljungman et al., 1991).

### **2.3.7 Entwinden in Alkali**

In stark alkalischem Milieu lösen sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Purin- und Pyrimidinbasen, da Purine und Pyrimidine ionisiert werden.

Hierbei entspiralisiert sich die Doppelstrang-DNS zu zwei Einzelsträngen und Alkali-labile Stellen werden zu Einzelstrangbrüchen konvertiert.

Aus diesem Grund wurden die Objektträger für 1 h in einer Kammer, in welcher später auch die Elektrophorese erfolgte, mit Elektrophoresepuffer (pH=13.4-13.6; T=12-14 °C, Zusammensetzung siehe Tabelle **6.1.1**, S. 69) inkubiert (siehe Abb. 2.4).

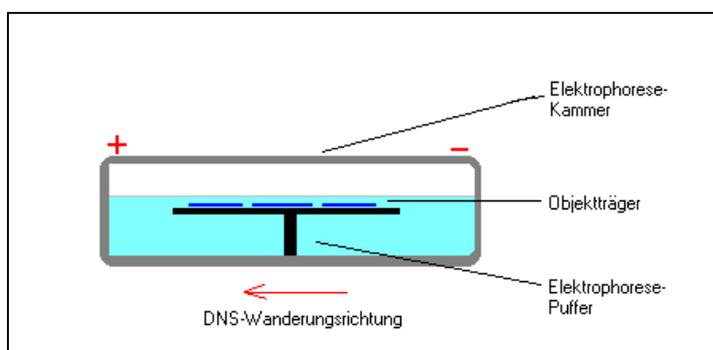


Abb. 2.4) Versuchsanordnung: Entwinden und Elektrophorese

### **2.3.8 Elektrophorese**

Die Elektrophorese erfolgte im selben Puffer und auch in der selben Kammer wie das Entwinden der DNS, d.h. ebenfalls bei pH=13,4-13,6; T=12-14 °C. Hierbei betrug die Elektrophoresedauer 30 min, bei einer Stärke des elektrischen Feldes von 0,8 V/cm<sup>2</sup>. Die Stromstärke betrug 298-303 mA, die Spannung 24-25 V. Spannung und Stromstärke wurden durch Zugabe von Elektrophoresepuffer reguliert.

### **2.3.9 Neutralisation**

Die beschichteten Objektträger wurden 12h in Neutralisationslösung inkubiert (pH=7,5), um ein späteres Anfärben der DNS zu ermöglichen.

### **2.3.10 Anfärbung**

Als Farbstoff diente Propidiumiodid. Diese Substanz interkaliert bzw. bindet zwischen DNS-Basen und wird durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt.

Jeder Objektträger wurde mit 100 µl 1%iger Propidiumiodidlösung eingedeckt. Nach 10 minütigem Einwirken der Farbstofflösung wurden die Objektträger dreifach mit *Aqua dest.* gespült, um Farbstoffkristalle zu entfernen und Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Zum Abschluss wurden sie mit 85 µl *Aqua dest.* überschichtet.

### **2.3.11 Auswertung**

#### **a) Visualisierung**

Die Bildgewinnung erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops mit angeschlossener CCD-Kamera. Lichtquelle war eine Quecksilberdampfampe, die Wellenlängen des Erregungs- und des Sperrfilters betrug 510-560 nm bzw. 590 nm. Die gewählte Vergrößerung betrug 200:1. Eine CCD-Kamera ermöglichte die Bildübertragung zum PC und folglich die sich anschließende Bildauswertung. Auf dem Bildschirm waren die geschädigten Zellen in Form einer Pixeldarstellung repräsentiert (*siehe Abbildung 2.5, S. 13*), die die Form eines Kometen aufwies.

Grundlage der Auswertung war die Tatsache, dass im „Kopf“ des Kometen DNS vorliegt, die im Zuge der Elektrophorese kaum wandert, während der „Schweif“ des

Kometen aus DNS besteht, die aufgrund von Strangbrüchen wanderungsfähig im elektrischen Feld ist (siehe Abschnitt **2.1.2**, S. 5, „Prinzip des alkalischen Comet-Assay“).

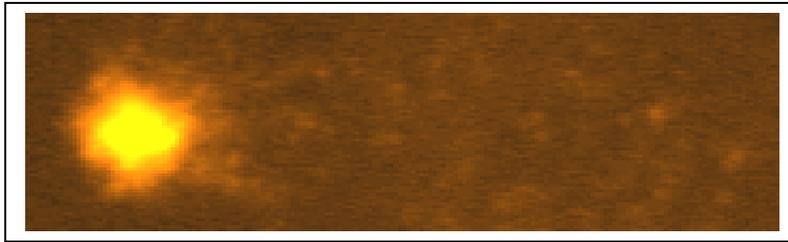


Abb. 2.5) Bildschirmdarstellung eines Kometen

*b) Auswertung der „Kometen“ mit der Comet 3.1 - Kinetic Imaging® Analysesoftware*

Im Rahmen der Auswertung wurde vom Benutzer zuerst ein Fenster (=region of interest=ROI) über den ausgewählten Kometen gelegt, dessen Inhalt dann vom Analyseprogramm Comet 3.1 nach dem Prinzip der integrierten Intensitätsprofilanalyse ausgewertet wurde. Dies bedeutet, dass die Helligkeitsintensitäten des Fensters (Komet und Hintergrund) senkrecht zur Richtung der Elektrophorese integriert, sowie nach einem spezifischen Algorithmus weiterverarbeitet wurden.

Das Programm ermittelte zunächst aus dem Intensitätsprofil des Fensters und dem des Hintergrunds ein Differenzprofil, welches die optische Intensität des Kometen repräsentierte. Ausgehend von diesem Differenzprofil wurden die Grenzen des Kopfes sowie die Grenzen des Schweifs ermittelt. Zur Bestimmung der Kopfgrenzen ging das Analyseprogramm nach folgendem Prinzip vor: Es bestimmte ausgehend vom schweifabgewandten Rand des vom Nutzer definierten Fensters den Punkt der höchsten Intensität, definierte diesen als Zentrum des Kopfes und bestimmte dann die linke, schweifabgewandte Grenze des Kopfes mithilfe des ersten links gelegenen Punktes, dessen Intensitätswert über dem sog. „Kopfschwellenwert“ lag. Zur Definition der rechten (schweifzugewandten) Kopfgrenze wurde das Profil der linken Kopfhälfte weitestgehend symmetrisch auf die rechte Kopfhälfte übertragen. Dann wurde zur Ermittlung des Schweifprofils das Kopfprofil vom Differenzprofil subtrahiert. Weiterhin wurden die Länge des Schweifs und andere Parameter ermittelt.

Die Kalkulationen von Kopf- und Schweifgrenzen erfolgten anwenderkontrolliert, d.h. bei Fehlkalkulationen, z.B. durch interferierende Bildhintergründe, wurden Kopf- und Schweifgrenzen manuell festgelegt.

Die Berechnung des von uns als Schadensmaß verwendeten Parameters %DNS im Schweif wurde durch die Analysesoftware Komet 3.1 folgendermaßen vorgenommen:

$$\% \text{ DNS im Schweif} = 100 - \left( \frac{\text{optische Intensität des Kopfes}}{\text{optische Intensität des Kopfes} + \text{optische Intensität des Schweifs}} \right) \times 100$$

%DNS im Schweif war als Parameter für den zellulären DNS-Schadensgrad gewählt worden, da sich dieser in vorhergehenden Versuchen (Müller, 2003) als verlässliche Messgröße erwiesen hatte.

In den Versuchen zur Heterogenität wurden je 200 Zellen bzw. Kometen pro Probe untersucht, während in Vorversuchen jeweils zwischen 50 und 200 Kometen pro Objektträger analysiert wurden. Hierbei wurden die jeweiligen Objektträger mäanderförmig nach Kometen durchsucht. Randbereiche und Kometen, die nahe beieinander lagen, wurden nicht in die Analyse einbezogen, um Analysefehlern durch Verunreinigungen und Überlagerungen vorzubeugen.

### *c) statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung erzielter Ergebnisse wurde mittels des Programms SPSS, *Version 10.0* vorgenommen. Für jede ausgewertete Probe wurde u.a. der Mittelwert des DNS-Schadens in %DNS im Schweif bestimmt, sowie seine Varianz. Für Untersuchungen zur Heterogenität wurden diese Varianzen zwischen verschiedenen Proben mittels einfaktorieller ANOVA verglichen (Einzelheiten siehe Abschnitt **3.4.2**, S. 30). Graphische Darstellungen wurden entweder mit SPSS 10.0 erstellt (Histogramme, Streudiagramme und Boxplots) oder mit Microsoft EXCEL 2000 (Säulendiagramme und Vergleiche von Mittelwerten mit Fehlerbalken).

## **2.4 Gliederung der Experimente zur Heterogenität**

Es erwies sich als notwendig, den „klassischen“ Ablauf des Comet-Assay zu modifizieren, um die Heterogenität des DNS-Schadens in Abhängigkeit von

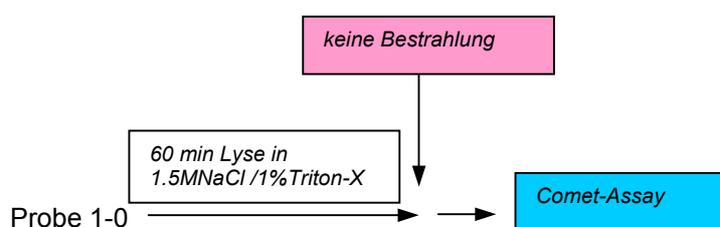
Chromatinstruktur, Antioxidantien, Reparatur und mehrmaliger Bestrahlung zu evaluieren. Für jeden dieser Einflussfaktoren wurden deshalb spezifische Versuchsdurchführungen konzipiert:

### 2.4.1 Einfluss der Chromatinstruktur

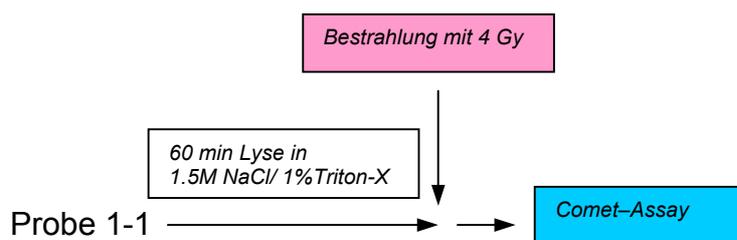
Der Einfluss der Chromatinstruktur wurde ermittelt, indem vor Bestrahlung eine Lyse in einer 1.5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 durchgeführt wurde, welche erstens zur Ruptur von Zell-/Kernmembranen führte und zweitens zur Entfernung eines Großteils zytoplasmatischer und nukleärer Proteine. So wurden an die DNS gebundene Histone entfernt und die *in-vivo* vorhandene Chromatinstruktur zerstört (Ljungman, 1991). Am Ende der Lyse konnte davon ausgegangen werden, dass im ehemaligen Zellkern nur noch DNS gebunden an nukleäre Matrix (im sog. Nukleoid) vorhanden war, sowie einige verbliebene Histonproteine.

Mit den Blutzellen jeder teilnehmenden Person wurden je 2 Proben (1 Probe = 2 Objektträger) vorbereitet, mit denen wie folgt verfahren wurde:

**Probe 1-0)** 60 min Lyse in 1,5M NaCl-Lösung mit 1%Triton-X 100 ohne Bestrahlung



**Probe 1-1)** 60 min Lyse in 1,5M NaCl-Lösung mit 1%Triton-X 100 vor Bestrahlung mit 4 Gy

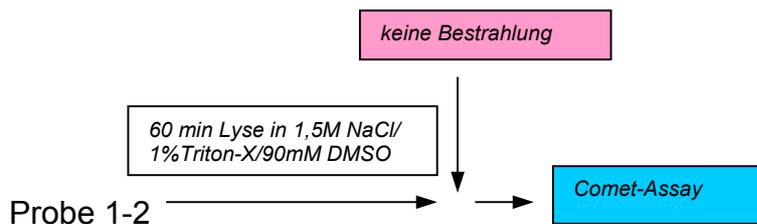


## 2.4.2 Einfluss antioxidativer Substanzen

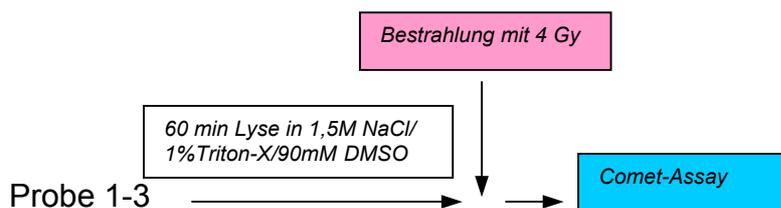
Es wurde erneut eine Lyse vor Bestrahlung durchgeführt, allerdings mit einer Lyselösung, die neben 1,5M NaCl-Lösung und 1% Triton-X als weiteren Bestandteil 90mM DMSO als hoch wirksame antioxidative Substanz enthielt. In diesem Fall konnte nach 60 minütiger Lyse vor Bestrahlung davon ausgegangen werden, dass sich im ehemaligen Zellkern ebenfalls nur der sog. Nukleoid befand, jedoch diesmal umgeben von hochkonzentrierter antioxidativer Lösung.

Je zwei Proben pro Proband wurden folgendermaßen behandelt:

**Probe 1-2)** 60 min Lyse in 1,5M NaCl-Lösung + 1% Triton-X 100 + 90mM DMSO  
ohne Bestrahlung



**Probe 1-3)** 60 min Lyse in 1,5M NaCl-Lösung + 1% Triton-X 100 + 90mM DMSO  
vor Bestrahlung mit 4 Gy



## 2.4.3 Einfluss der Reparatur auf die Schadensheterogenität

- von DNS-Schaden nach Bestrahlung mit 4 Gy,
- von DNS-Basalschaden

### a) DNS-Schaden nach Bestrahlung und Reparatur

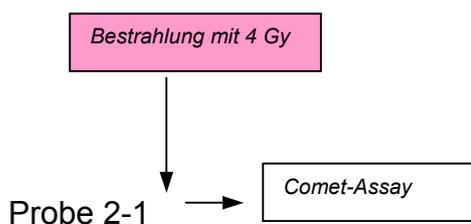
Der Einfluss der Reparatur auf DNS-Schaden bestrahlter Proben wurde bestimmt, indem Proben erst mit 4 Gy bestrahlt und dann für bestimmte Zeiten (0 min, 15 min,

45 min) in ein Reparaturmedium gegeben wurden, in dem Schadensreparatur erfolgte.

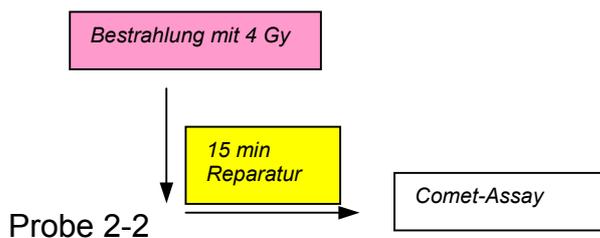
**Hinweis zur Nomenklatur:** Im folgenden wird der DNS-Schaden unbestrahlter Proben als Basalschaden, solcher von bestrahlten Proben, die nicht in Reparaturmedium inkubiert wurden, als Initialschaden und DNS-Schaden von Proben, die in Reparaturmedium inkubiert wurden, als Residualschaden bezeichnet.

Aus Blutproben der teilnehmenden Personen wurden je 3 Proben (Nr. 2-1 bis 2-3) wie folgt präpariert:

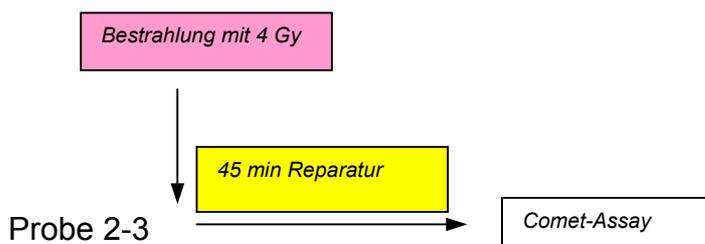
**Probe 2-1) Initialschaden nach 4 Gy:**



**Probe 2-2) Residualschaden nach 15 min Reparatur**



**Probe 2-3) Residualschaden nach 45 min Reparatur**

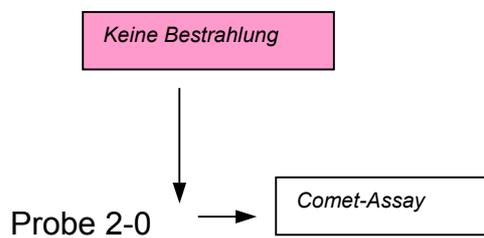


*b) DNS-Schaden in unbestrahlten Proben*

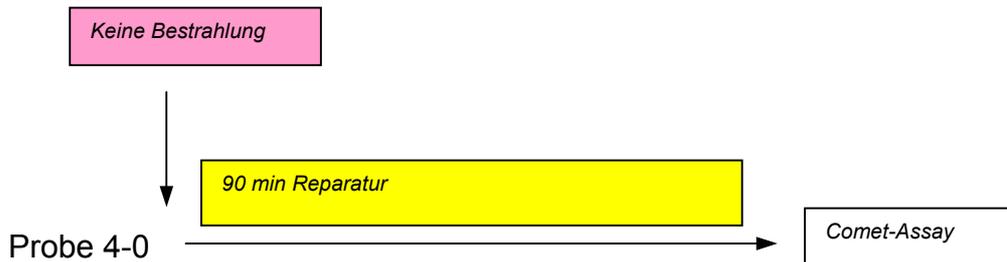
Der Einfluss der Reparatur auf DNS-Schaden unbestrahlter Proben wurde ermittelt, indem der Basalschaden entweder nach 0 min bzw. 90 min Reparatur gemessen wurde.

Aus Blutproben der teilnehmenden Personen wurden je 2 Proben (Nr. **2-0** und **4-0**) wie folgt präpariert:

**Probe 2-0)** Basalschaden = DNS-Schaden ohne Bestrahlung nach 0 min Reparatur



**Probe 4-0)** Residualer Basalschaden nach 90 min Reparatur



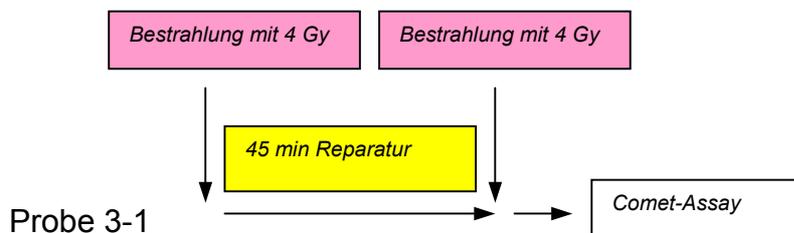
## 2.4.4 Einfluss zweifacher Bestrahlung

Der Einfluss zweifacher Bestrahlung wurde mittels des folgenden Versuchsaufbaus überprüft:

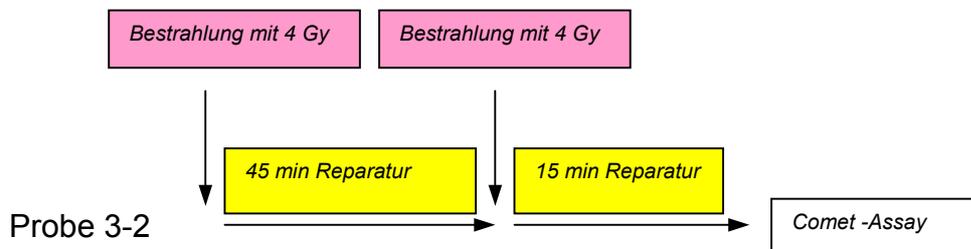
Nach einer initialen Bestrahlung mit 4 Gy reparierten die Zellen 45 Minuten und wurden dann mit einer zweiten Dosis von 4 Gy bestrahlt. Dann erfolgte Reparatur für 0, 15 und 45 min.

3 Proben (Nr. **3-1–3-3**) wurden vorbereitet und wie folgt präpariert:

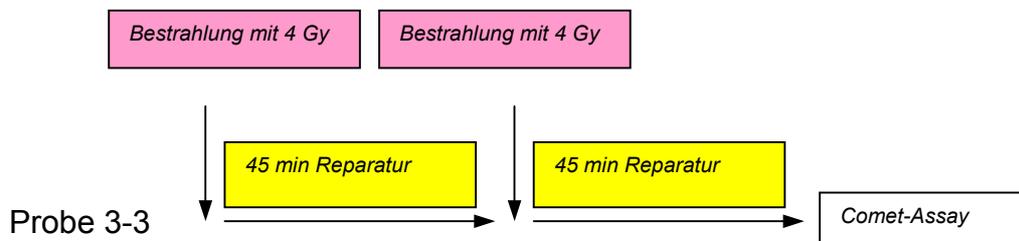
**Probe 3-1)** Initialschaden nach Bestrahlung mit 2 x 4 Gy



**Probe 3-2)** Residualschaden nach 2 x 4 Gy und 15 min Reparatur



**Probe 3-3)** Residualschaden nach 2 x 4 Gy und 45 min Reparatur



### 3 Ergebnisse

Vor den eigentlichen Hauptuntersuchungen zur Heterogenität, deren Aufbau im vorhergehenden Kapitel erläutert wurde, wurden verschiedene andere Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse in diesem Abschnitt kurz dargelegt werden sollen. Es werden nur die wesentlichen Ergebnisse dieser Experimente erläutert, detaillierte Angaben zu den Resultaten aller durchgeführten Vergleiche sind *Tabelle 6.2.1, S. 71*, des Anhangs zu entnehmen. Alle in diesem Kapitel aufgeführten Vergleiche wurden mit einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) vorgenommen. Unterschiede wurden unter einer Schwelle von  $\alpha < 0,05$  als signifikant betrachtet.

#### 3.1 Vereinfachung des Verfahrens

##### Erläuterung

Vor Durchführung aller anderen Experimente wurde der Comet-Assay auf mögliche Modifikationen zwecks einer Vereinfachung des experimentellen Ablaufs untersucht. Besondere Aufmerksamkeit galt hierbei der Zusammensetzung der Lysestammlösung. Es wurde überprüft, ob eine angemessene Lyse auch ohne das Detergenz Na-Lauryl-Sarkosinat, welches in vielen Versuchsprotokollen Bestandteil der Lysestammlösung ist, möglich sein würde. Hierzu wurden Dosis-Wirkungskurven für die Lyse nach Bestrahlung (mit - und ohne 40 g/l Na-Lauryl-Sarkosinat) erstellt.

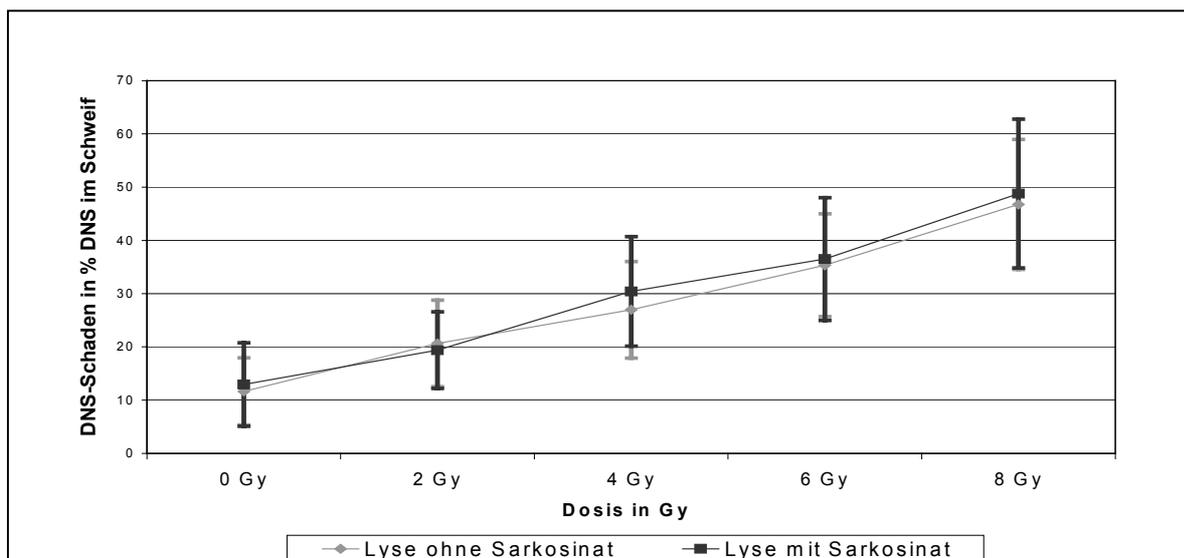


Abb. 3.1) Lyse mit – und ohne Na-Lauryl-Sarkosinat

Dargestellt sind Schädigungsmittelwerte aus  $n = 100$  Zellen in %DNS im Schweif in Abhängigkeit von der applizierten Strahlendosis bei zwei verschiedenen

Lyseverfahren: Lyse mit Na-Lauryl-Sarkosinat und Lyse ohne Na-Lauryl-Sarkosinat.  
Die Fehlbalken repräsentieren die doppelte Standardabweichung des Schädigungsmittelwertes.

### Ergebnisse:

1. Die Mittelwerte des DNS-Schadens nach Lyse mit - und ohne Sarkosinat unterschieden sich bei einer Bestrahlungsdosis von 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy und 8 Gy nicht signifikant ( $F \leq 1,67$ ;  $p \geq 0,198$ ), allein bei 4 Gy war der Schadensmittelwert nach Lyse ohne Na-Lauryl-Sarkosinat signifikant kleiner als nach Lyse mit Na-Lauryl-Sarkosinat ( $F=6,386$ ;  $p=0,012$ ).

2. Bei linearer Korrelation nach Pearson ergab sich mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$  für Lyse ohne Na-Lauryl-Sarkosinat ein Korrelationskoeffizient von Energiedosis und Schädigungsmittelwert von  $r=0,995$ , während dieser für Lyse mit Na-Lauryl-Sarkosinat 0,994 betrug ( $p < 0,001$ ). Nach linearer Regression ergab sich für Lyse ohne Sarkosinat mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$  ein Regressionskoeffizient von 4,249 sowie eine Konstante von 11,270 ( $p=0,002$ ). Nach Lyse mit Sarkosinat errechnete sich ein linearer Regressionskoeffizient von 4,440 ( $p=0,001$ ) und eine Konstante von 11,838 ( $p=0,003$ ).

*(Vollständige Darlegung von Schädigungsmittelwerten, Standardabweichungen und Vergleichsergebnissen siehe Tabelle 6.2.1, S. 71, im Anhang)*

Schlussfolgerung: Ein linearer Zusammenhang zwischen Dosis und Schadensmittelwert war im Falle beider Lyselösungen ersichtlich. Insofern war eine Lyse ohne Na-Lauryl-Sarkosinat bei weiteren Experimenten möglich, ohne die Messgenauigkeit des Verfahrens zu verschlechtern. Alle Lyselösungen bei Untersuchungen zur DNS-Schadensheterogenität enthielten somit kein Na-Lauryl-Sarkosinat.

### **3.2 Untersuchungen zur Evaluation der Diskriminationsschärfe des Messverfahrens**

#### Erläuterung:

Im Rahmen eines abschätzenden Experiments zur Auflösungsfähigkeit des Comet-Assay hinsichtlich unterschiedlich geschädigter Zellpopulationen wurden Blutproben

eines Probanden verwendet. Erst wurden diese mit verschiedenen Energiedosen (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy) bestrahlt, anschließend wurden je 30 µl aus zwei dieser Proben gemischt, in Agarose eingebettet, auf Objektträger aufgebracht und nach dem in Abschnitt 2.3, S. 8, beschriebenen Ablauf des Comet-Assay weiter verarbeitet. Zwischen gemischten Proben aus Zellen, die mit 0 Gy und 2 Gy, 2 Gy und 4 Gy bzw. 4 Gy und 8 Gy bestrahlt wurden, erfolgte sowohl hinsichtlich der Schadensmittelwerte (siehe Abbildung 3.2) als auch der Histogrammverteilungen (siehe Abbildung 3.3, S. 23) ein Vergleich mit ungemischten Proben

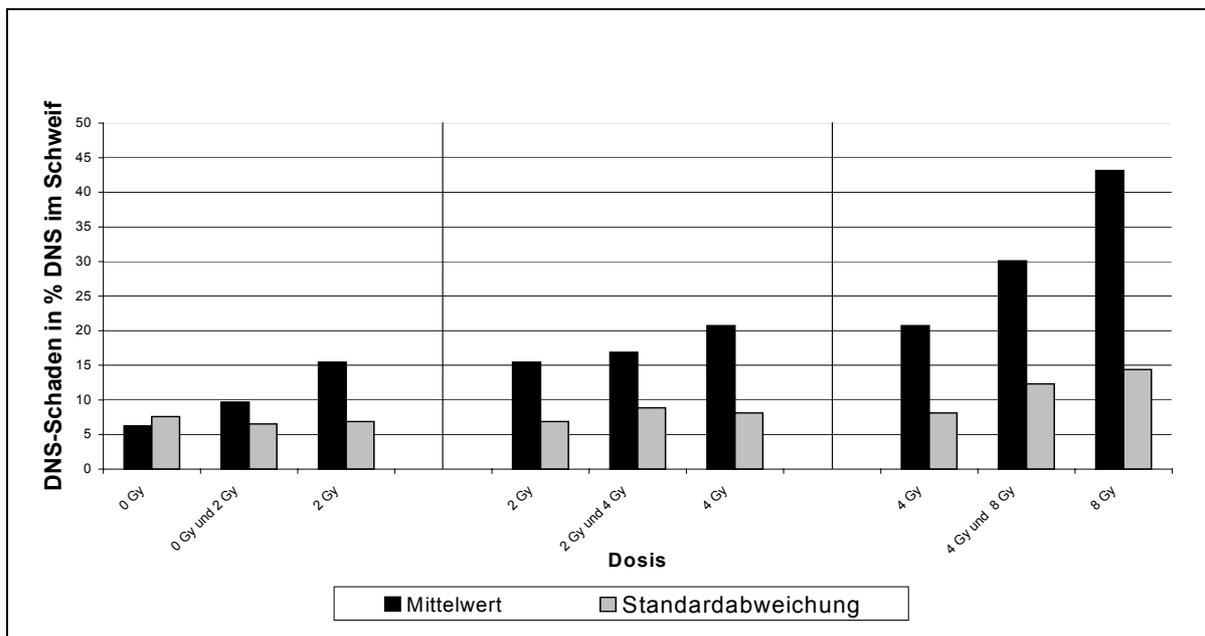


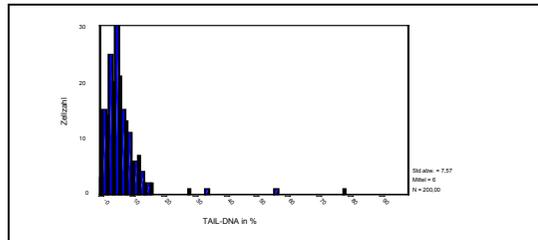
Abb. 3.2) Vergleich von Mittelwerten und Standardabweichungen bei verschiedenen Strahlendosen und gemischten Proben

Dargestellt sind Schädigungsmittelwerte und Standardabweichungen aus  $n=200$  Zellen in %DNS im Schweif zwischen verschiedenen Proben. Verglichen wurden:

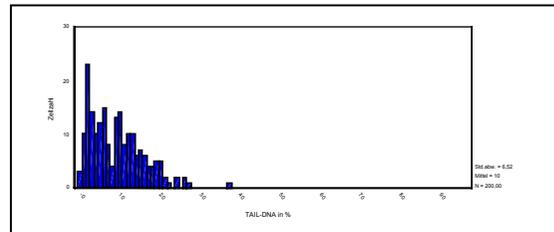
1. Probe unbestrahlter Leukozyten (0 Gy); Mischprobe aus mit 0 und 2 Gy bestrahlten Blutleukozyten (0 Gy und 2 Gy); Leukozytenprobe nach Bestrahlung mit 2 Gy (2 Gy)
2. Probe mit 2 Gy bestrahlter Leukozyten (2 Gy); Mischprobe aus mit 2 und 4 Gy bestrahlten Blutleukozyten (2 Gy und 4 Gy); Leukozytenprobe nach Bestrahlung mit 4 Gy (4 Gy)
3. Probe mit 4 Gy bestrahlter Leukozyten (4 Gy); Mischprobe aus mit 4 und 8 Gy bestrahlten Blutleukozyten (4 Gy und 8 Gy); Leukozytenprobe nach Bestrahlung mit 8 Gy (8 Gy)

Abb. 3.3) Histogramme als Ergebnis von Experimenten, im Rahmen derer mit verschiedenen Energiedosen bestrahlte Zellen gemischt wurden. Aufgetragen sind Zellhäufigkeiten in Abhängigkeit vom DNS-Schaden in %DNS im Schweif

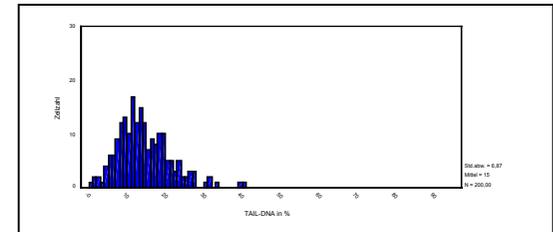
**0 Gy**



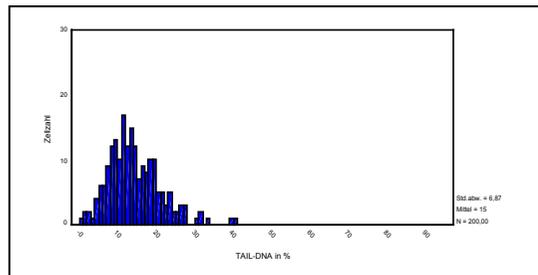
**0 Gy und 2 Gy**



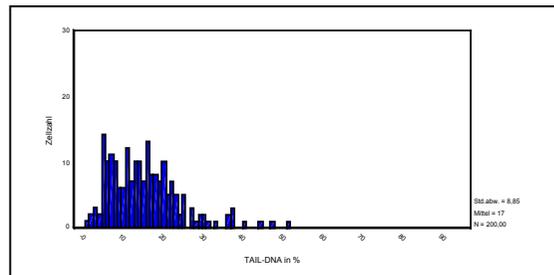
**2 Gy**



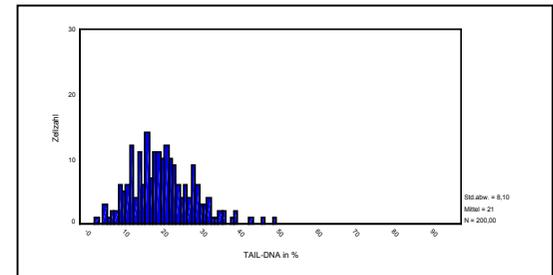
**2 Gy**



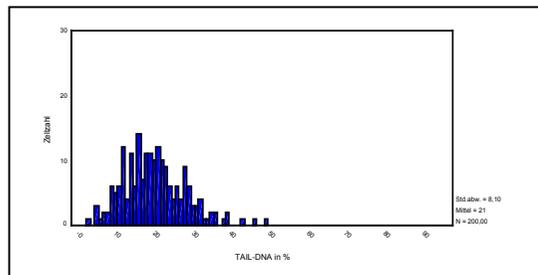
**2 Gy und 4 Gy**



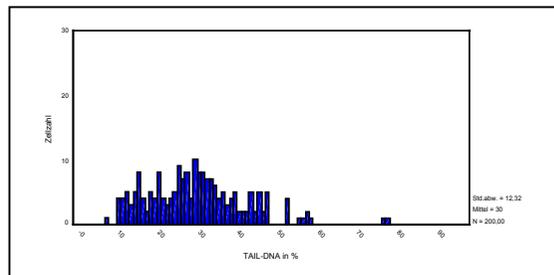
**4 Gy**



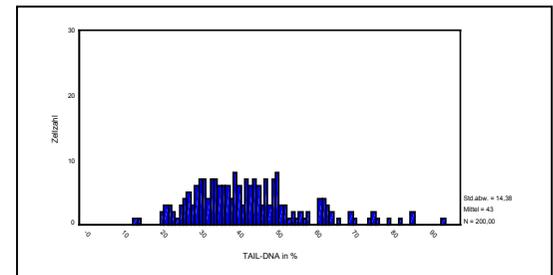
**4 Gy**



**4 Gy und 8 Gy**



**8 Gy**



## Ergebnisse:

1. Nach statistischer Auswertung zeigte sich, dass alle Mittelwerte ( $F \geq 24,03$ ;  $p < 0,001$ ) hoch signifikant voneinander verschieden waren, abgesehen von jenen der Proben 2 Gy und 2 Gy + 4 Gy ( $F=3,220$ ;  $p=0,073$ ). Auch die Standardabweichungen differierten.

2. In den in *Abb. 3.3, S.23* dargestellten Histogrammverteilungen, waren innerhalb der Mischproben 0 Gy + 2 Gy bzw. 2 Gy + 4 Gy jeweils zwei Populationen unterschiedlich stark geschädigter Zellen in Form zweier Scheitelpunkte der Verteilungskurve erkennbar. Diese Unterteilung war bei der Probe 0 Gy + 2 Gy ausgeprägter als bei der Probe 2 Gy + 4 Gy. Bei der Mischprobe 4 Gy + 8 Gy hingegen überlagerten sich die beiden Populationen von mit 4 Gy bzw. 8 Gy geschädigten Zellen derart, dass nur ein Gipfel innerhalb der Verteilung entstand. Dieser Gipfel lag bei einem Schadensgrad von ca. 30 %DNS im Schweif und somit etwa in der Mitte der beiden ursprünglichen Scheitelpunkte.

*(Anm.: Vollständige Darlegung von Schädigungsmittelwerten, Standardabweichungen und Vergleichsergebnissen siehe Tabelle 6.2.1, S. 71, im Anhang)*

**Schlussfolgerung:** Der Comet-Assay kann Subpopulationen von Zellen darstellen, auch wenn sie sich hinsichtlich des Schadensgrades nicht wesentlich unterscheiden. Voraussetzung für eine hohe Trennschärfe des Comet-Assay ist allerdings, dass die Häufigkeitsverteilungen geschädigter Zellen Hüllkurven mit starker Steigung aufweisen, was insbesondere bei niedrigen Strahlendosen (0 Gy bis ca. 4 Gy) der Fall ist. Bei größeren Dosen und somit höheren Schadensgraden tritt gleichzeitig eine Verflachung der einhüllenden Kurve auf, so dass in Bezug auf den Schadensgrad nahe beieinander liegende Populationen schwerer zu diskriminieren sind.

### **3.3 Vorversuche zur Heterogenität von DNS-Schaden**

Die Versuche, deren Ergebnisse im folgenden dargelegt werden (**3.3.1 – 3.3.3**), sind als Vorversuche zu Untersuchungen zur Heterogenität aufzufassen. Sie wurden

durchgeführt, um erstens das in Abschnitt 2.4, S.14, beschriebene experimentelle Design festzulegen und zweitens, um mögliche Störfaktoren zu ermitteln.

### 3.3.1 Bestrahlung und verschiedene Reparaturzeiten

#### Erläuterung:

Hinsichtlich der experimentellen Anordnung von Reparaturuntersuchungen wurde der Effekt verschiedener Reparaturzeiten nach Bestrahlung auf Schädigungsmittelwerte und Standardabweichungen untersucht. Hierbei wurde insbesondere überprüft, ob eine Reparaturzeit von 24 h nach Bestrahlung Ergebnisse liefern könne, die eine zweite Strahlungsfraktion nach diesem Zeitraum zuließen.

Blutleukozyten wurden mit 2 Gy bestrahlt und dann Initialschaden sowie Residualschaden nach 10 min, 60 min und 24 h bestimmt. Darauf folgte ein Vergleich zwischen Schädigungsmittelwerten und Standardabweichungen von Residualschäden (nach 10 min/ 60 min/ 24 h Reparatur) und Initialschaden.

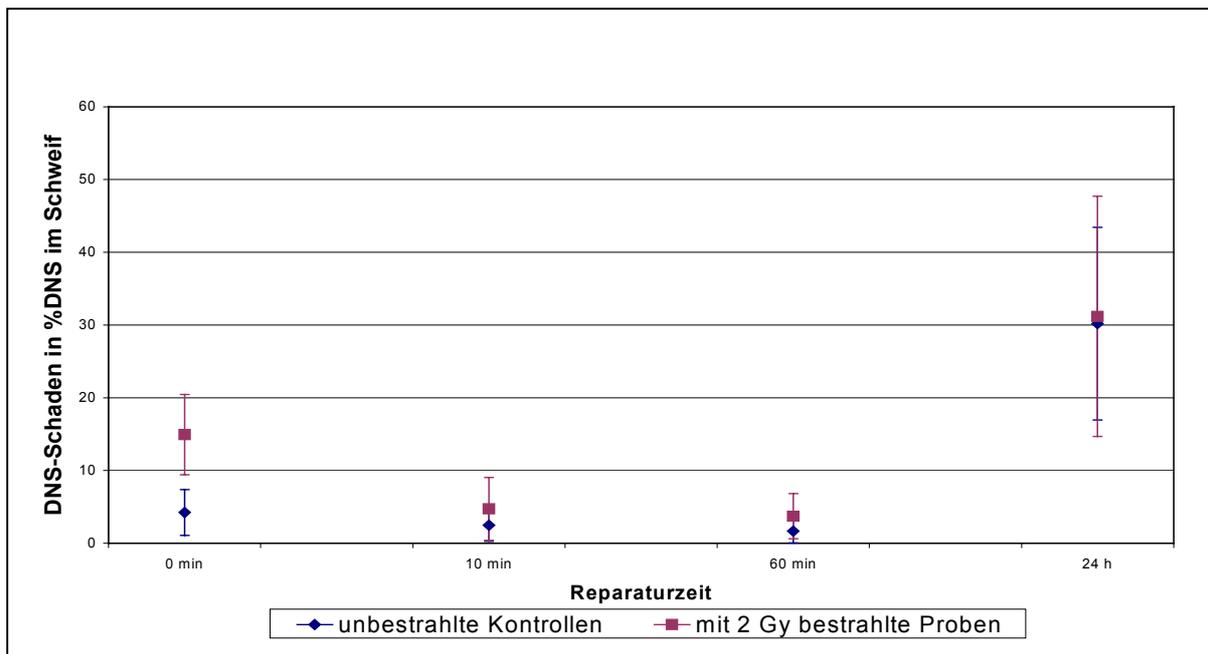


Abb. 3.4) Bestrahlung und verschiedene Reparaturzeiten

Dargestellt sind Schädigungsmittelwerte aus  $n=50$  Zellen in %DNS im Schweif bei mit 2 Gy bestrahlten Proben und unbestrahlten Kontrollen in Abhängigkeit von der Reparaturdauer (0 min, 10 min, 60 min und 24 h).

Fehlerbalken repräsentieren die doppelte Standardabweichung des gemessenen Schadensmittelwertes.

### Ergebnisse:

1. Nach 10 min bzw. 60 min Reparatur ergab sich im Vergleich zum Initialschaden nach 0 min Reparatur eine signifikante Abnahme ( $F \geq 11,68$ ;  $p \leq 0,001$ ) des DNS-Schadens sowohl bei unbestrahlten Kontrollen als auch bei bestrahlten Proben. Auch die Standardabweichung war nach 10 und 60 min im Vergleich zur Standardabweichung des Initialschadens verringert.
2. Im Gegensatz dazu war nach 24 h Reparatur im Vergleich zum Schadensgrad direkt nach Bestrahlung eine signifikante Zunahme des DNS-Schadens sowohl unter den mit 2 Gy bestrahlten Zellen ( $F=43,54$ ;  $p < 0,001$ ) als auch in unbestrahlten Kontrollen ( $F=181,73$ ;  $p < 0,001$ ) zu beobachten. Die Standardabweichung des DNS-Schadens nahm ebenfalls zu.
3. Der Schadensgrad unbestrahlter Kontrollen näherte sich nach 24 h Reparatur dem von mit 2 Gy bestrahlten Zellen an.

(Anm.: Vollständige Darlegung von Schädigungsmittelwerten, Standardabweichungen und Vergleichsergebnissen siehe Tabelle 6.2.1, S. 71, im Anhang)

Schlussfolgerung: Nach einer 24-stündigen *in-vitro* Reparatur der Zellen in von Reparaturmedium bedeckten Objektträgern waren die Zellen überproportional stark, vermutlich wegen nutritiver Einschränkungen, geschädigt. Eine *in-vitro* Fraktionierung in 24-stündigem Abstand, also in einer Form, die besser vergleichbar mit klinischen Anwendungen gewesen wäre, ließ sich mit diesem experimentellen Aufbau deshalb nicht durchführen. Im Rahmen der Experimente zur Heterogenität wurden folglich weitaus kürzere Reparaturzeiten gewählt.

### 3.3.2 Lysedauer nach Bestrahlung

#### Erläuterung:

Es erwies sich für die Versuche zur Heterogenität aus praktischen Gründen als notwendig, Proben, welche nach Bestrahlung unterschiedlich lange in Reparaturmedium inkubiert werden sollten, nacheinander in eine Lyselösung zu geben und folglich zwischen 3h und 4h 30 min variierende Lysezeiten in Kauf zu nehmen. Entsprechend musste der Einfluss der Lysezeit auf den DNS-Schaden überprüft werden. Verglichen wurden unbestrahlte und mit 4 Gy bestrahlte Proben nach 3h 45 min Lyse bzw. 4h 30 min Lyse mit Proben, die nach Bestrahlung 3h lysiert worden waren. Ausgewertet wurden jeweils 50 Zellen.

#### Ergebnis:

1. Eine signifikante Veränderung der Schädigungsmittelwerte wurde im Vergleich mit den Werten nach 3h Lyse weder für den Wert nach 3h 45 min Lyse noch nach 4h 30 min Lyse festgestellt. Dies galt sowohl für bestrahlte ( $F \leq 0,852$ ;  $p \geq 0,358$ ) als auch unbestrahlte ( $F \leq 3,42$ ;  $p \geq 0,067$ ) Proben.
2. Die Standardabweichungen schwankten zwischen den einzelnen Messwerten, eine einheitliche im Zusammenhang mit der Lysedauer stehende Veränderung der Standardabweichungen wurde jedoch nicht beobachtet.

*(Anm...: Vollständige Darlegung von Schädigungsmittelwerten, Standardabweichungen und Vergleichsergebnissen siehe Tabelle 6.2.1, S. 71, im Anhang)*

**Schlussfolgerung:** Zwischen 3h und 4h 30 min variierende Lysezeiten nach Bestrahlung konnten bei den Untersuchungen zur Heterogenität verwendet werden, da sie keine signifikanten Veränderungen der Schädigungsmittelwerte bewirkten und auch kein einheitlicher Einfluss auf die Standardabweichungen zu beobachten war.

### 3.3.3 Lysedauer vor Bestrahlung

#### Erläuterung:

Für Untersuchungen zur Heterogenität, insbesondere zur Klärung des Einflusses der Chromatinstruktur auf die Heterogenität sollten einige Proben vor Bestrahlung in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 lysiert werden (siehe **2.4.1**, S.15). Vorab wurden deshalb zwei verschiedene Lysezeiten (15 min und 60 min) in ihrer Wirkung auf den DNS-Schaden bei mit 4 Gy bestrahlten und unbestrahlten Proben untersucht. Verglichen wurde der Schädigungsmittelwert von je 50 Zellen pro Probe.

#### Ergebnis:

Zwischen unbestrahlten Proben ergab sich nach 15 bzw. 60 min Lyse vor Bestrahlung kein signifikanter Unterschied ( $F=0,428$ ;  $p=0,514$ ) des Schädigungsmittels, während mit 4 Gy bestrahlte Proben nach 15 bzw. 60 min Lyse einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Schadensmittelwertes aufwiesen ( $F=22,162$ ;  $p<0,001$ ). Der DNS-Schaden war nach 60 min Lyse in 1,5M NaCl/1%Triton-X 100 und 4 Gy Bestrahlung signifikant größer als nach 15 min Lyse und 4 Gy.

*(Anm.: Vollständige Darlegung von Schädigungsmittelwerten, Standardabweichungen und Vergleichsergebnissen siehe Tabelle 6.2.1, S. 71, im Anhang)*

**Schlussfolgerung:** Die Tatsache, dass nach 15 min Lyse und 4 Gy Bestrahlung der mittlere DNS-Schadensgrad geringer war als nach 60 min Lyse und Bestrahlung lässt die Interpretation zu, dass nach 15 min Lyse Histonproteine noch nicht in dem Maß extrahiert waren wie nach 60 min Lyse. Folglich wurde bei Experimenten mit Lyse vor Bestrahlung eine 60-minütige Lysedauer verwendet.

### 3.4 Ergebnisse der Untersuchungen zur Heterogenität

#### 3.4.1 Schadensvarianzen für alle Proben einzelner Probanden

Zuerst wurden unter anderen Parametern auch die Varianzen mittleren DNS-Schadens für alle in Abschnitt 2.4 beschriebenen Leukozytenproben jedes einzelnen Probanden erhoben, welche in Abschnitt 6.2.2, S.72-76, für alle Probanden aufgezeigt werden. In Abb. 3.5 werden die ermittelten Schadensvarianzen exemplarisch für einen Probanden graphisch dargestellt und im Textabschnitt darunter erläutert.

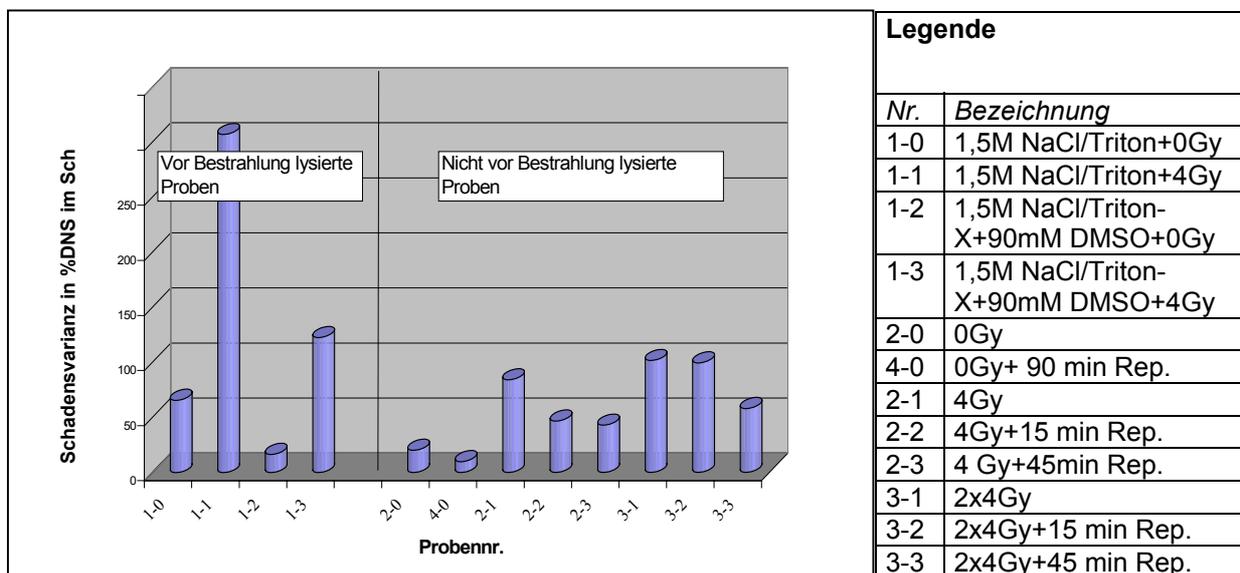


Abb. 3.5)

Schädigungsvarianzen aller Proben exemplarisch dargestellt für Proband Nr. 1.;

Dargestellt sind die aus n=200 Zellen gewonnenen DNS-Schadensvarianzen aller gemessenen Proben eines Probanden.

Auf der Abszisse sind die Probenbezeichnungen abgetragen, auf der Ordinate die jeweilige Schadensvarianz in %DNS im Schweif.

#### a) Zur Varianz des DNS-Schadens von nicht vor Bestrahlung lysierten Proben:

Die Varianz des Basalschadens, also des DNS-Schadens der nicht bestrahlten Probe (Probe: 2-0) war nach 90-minütiger Reparatur (Probe: 4-0) kleiner. Nach Bestrahlung mit 4 Gy (2-1) war die Varianz des Schadens größer als die Varianz des Basalschadens (2-0). Nach Reparatur über 15 (2-2) und 45 (2-3) Minuten war die Varianz des Residualschadens kleiner als die des Initialschadens nach 4 Gy (2-1). Im Anschluss an eine nochmalige Bestrahlung mit 4 Gy war die Varianz erhöht (3-1)

und nahm dann während der nächsten 15 Minuten (3-2) nicht, während der nächsten 45 Minuten (3-3) Reparatur jedoch deutlich ab.

*b) Zur Varianz des DNS-Schadens von vor Bestrahlung lysierten Proben:*

Die Varianz der mit 0 (1-0) bzw. 4 Gy (1-1) bestrahlten Proben war nach Lyse in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 größer als die von vergleichbaren nicht vor Bestrahlung lysierten Proben. Lyse vor Bestrahlung mit 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 und 90mM DMSO als Antioxidanz (1-2, 1-3) ergab eine weitaus kleinere Varianz als Lyse in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 ohne DMSO (1-0, 1-1).

**3.4.2 Probandenübergreifende Varianzvergleiche –  
gegliedert nach Einflussfaktoren**

Neben den in Abschnitt **3.4.1** dargelegten Ergebnissen zu intraindividuellen Vergleichen von Schadensvarianzen wurde untersucht, wie sich die über alle Probanden gemittelten Varianzen durch die untersuchten Einflussfaktoren verändern ließen. Es wurde also untersucht, ob intraindividuelle Veränderungen der Heterogenität auch unter Berücksichtigung interindividueller bzw. interexperimenteller Variabilität noch messbar sind.

Aus den Varianzen von einander entsprechenden Proben aller 5 Probanden wurden Varianzmittelwerte ermittelt. Jene wurden zwischen verschiedenen Proben mit einfaktorieller ANOVA verglichen. Die Vergleiche erfolgten entsprechend der untersuchten Einflussfaktoren (Lyse vor Bestrahlung zur Entfernung von Histonproteinen, Lyse vor Bestrahlung mit Antioxidantien, Bestrahlung, Reparatur, mehrfache Bestrahlung). Unterschiede der Varianzen wurden bei einem  $\alpha \leq 0,05$  als signifikant betrachtet. Alle ermittelten Zahlenwerte und Vergleiche sind in Tabelle **6.2.3**, S. 77, des Anhangs zu finden.

*a) Einfluss einer Lyse vor Bestrahlung zur Entfernung von Histonproteinen*

Erläuterung:

Verglichen wurden mit 4 Gy bestrahlte und unbestrahlte Proben, die sich hinsichtlich einer Lyse vor Bestrahlung unterschieden. Ein Teil der Proben war nicht vor

Bestrahlung lysiert worden, während ein anderer Teil der Proben in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 vor Bestrahlung lysiert worden war.

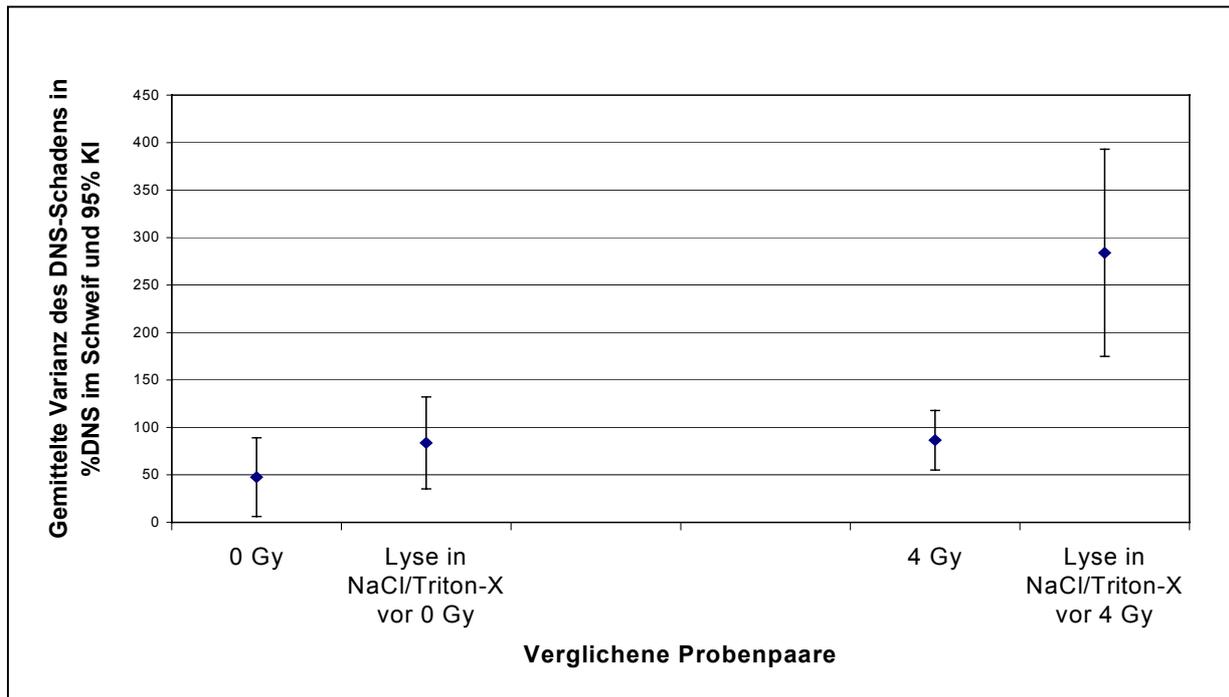


Abb. 3.6) Einfluss einer Lyse vor Bestrahlung zur Entfernung von Histonproteinen auf die Schadensvarianz

Dargestellt sind über  $n=5$  Probanden gemittelte Schadensvarianzen (in %DNS im Schweif) im Vergleich zwischen verschiedenen Proben. Verglichen wurden:

1. Unbestrahlte Proben (0Gy) und ebenfalls unbestrahlten Proben nach Lyse in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100
2. Mit 4 Gy bestrahlte Proben und solche, die vor Bestrahlung mit 4 Gy in 1,5M NaCl-Lösung und 1% Triton-X 100 lysiert worden waren

Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall der jeweiligen Varianz.

### Ergebnisse:

1. Bei unbestrahlten Proben ergab sich hinsichtlich der Varianz kein signifikanter Unterschied ( $F=2,493$ ;  $p=0,153$ ).
2. Bei bestrahlten Proben trat ein signifikanter Unterschied dahingehend auf, dass die Schadensvarianz der vor Bestrahlung lysierten Proben signifikant größer war als jene der nicht vor Bestrahlung lysierten Proben ( $F=23,365$ ;  $p=0,001$ ).

**Zusammenfassung:** Nach der Entfernung von Histonproteinen durch Lyse in 1,5M NaCl und Bestrahlung mit 4 Gy war die Schadensvarianz größer als in Zellen, die in intaktem Zustand bestrahlt worden waren.

### b) Einfluss einer Lyse mit Antioxidantien vor Bestrahlung

#### Erläuterung:

Verglichen wurden bestrahlte und unbestrahlte Proben, die 60 min Lyse in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 und 90mM DMSO als hochkonzentriertem löslichen Radikalfänger erfuhren und Proben, die keiner Lyse vor Bestrahlung ausgesetzt waren.

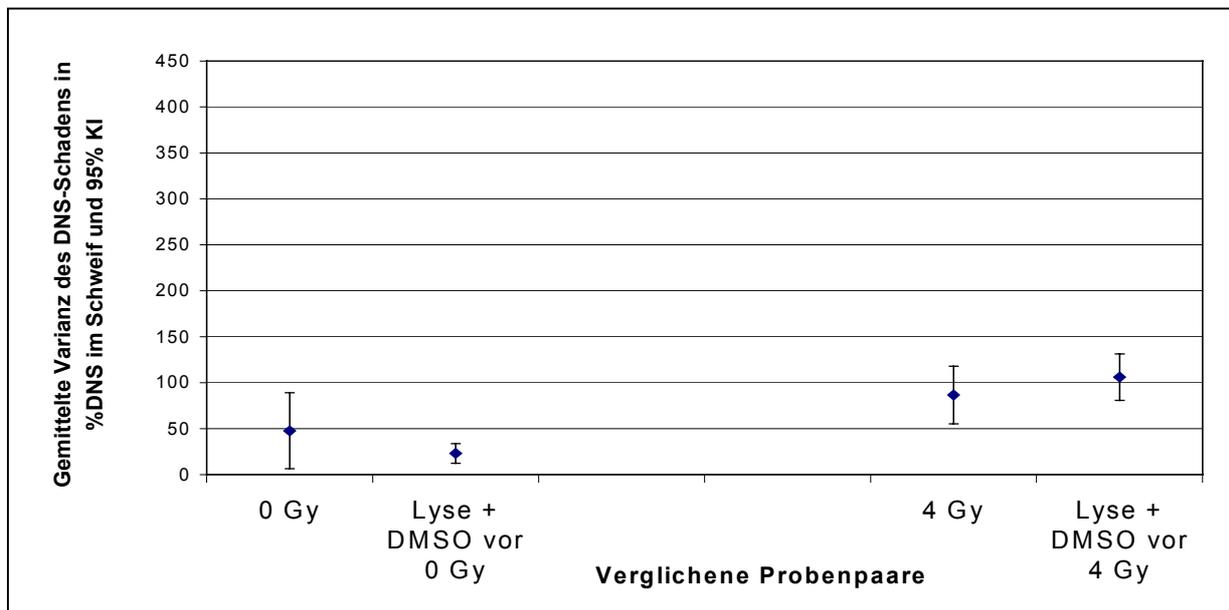


Abb. 3.7) Einfluss einer Lyse vor Bestrahlung mit Antioxidantien auf die Schadensvarianz

Dargestellt sind über  $n=5$  Probanden gemittelten Schadensvarianzen (in %DNS im Schweif) im Vergleich zwischen verschiedenen Proben. Verglichen wurden:

1. Unbestrahlte, nicht-lysierte Proben (0Gy) und ebenfalls unbestrahlte Proben nach Lyse mit DMSO
2. Mit 4 Gy bestrahlte, nicht vor Bestrahlung lysierte Proben und Proben nach Lyse mit DMSO und Bestrahlung

Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall der jeweiligen Varianz.

## Ergebnisse:

1. Im Vergleich von nicht-lysierten Proben zu den in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 und 90mM DMSO lysierten Proben ergab sich keine signifikante Veränderung. Dies war für unbestrahlte ( $F=2,551$ ;  $p=0,149$ ), wie auch bestrahlte Proben ( $F=1,807$ ;  $p=0,216$ ) der Fall.

**Zusammenfassung:** Nach Zusatz des starken Radikalfängers DMSO in einer Konzentration von 90mM zu einer Lösung, welche Histonproteine entfernt, war das Niveau der Schadensvarianz gleich dem von in intaktem Zustand bestrahlten Zellen.

### c) Einfluss einer Bestrahlung mit 4 Gy

#### Erläuterung:

Verglichen wurden die gemittelten Varianzen unbestrahlter und bestrahlter Proben, welche unterschiedliche experimentelle Anordnungen durchlaufen hatten.

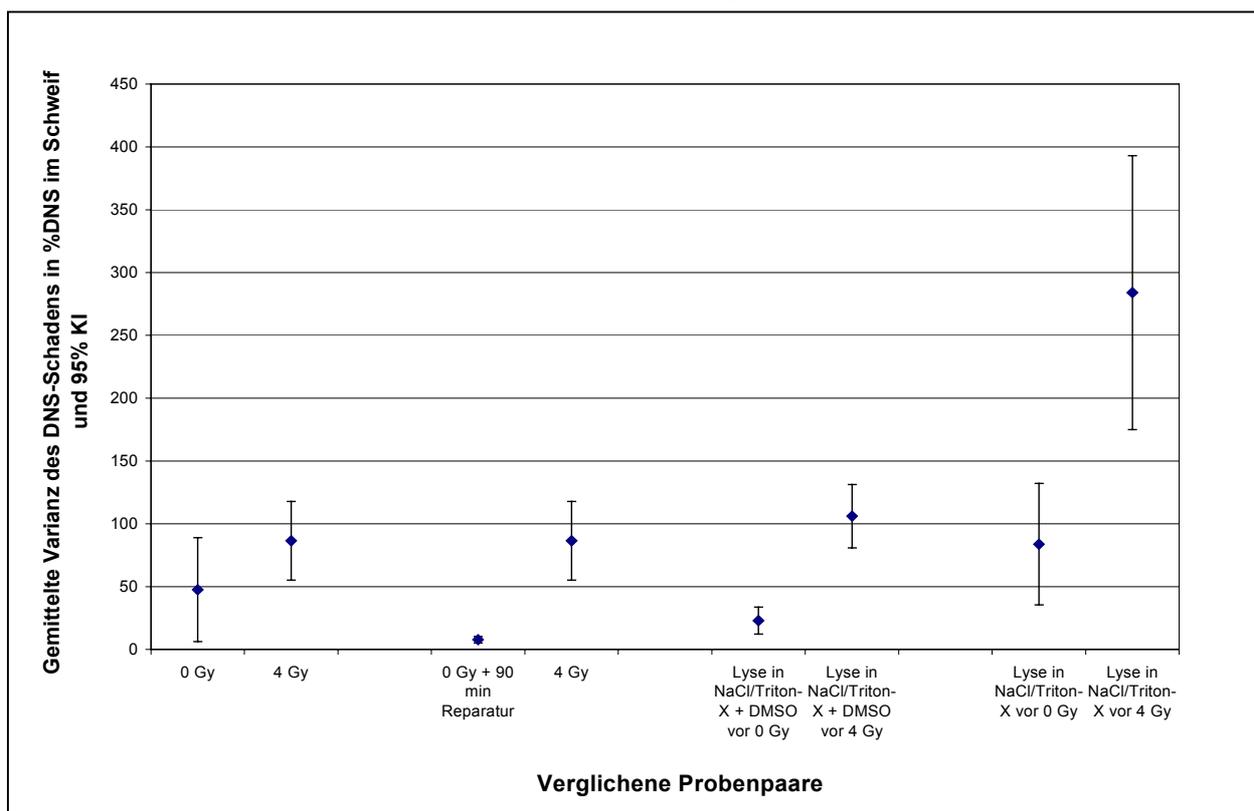


Abb. 3.8) Einfluss einer Bestrahlung mit 4 Gy auf die Schadensvarianz

Dargestellt sind über  $n=5$  Probanden gemittelte Schadensvarianzen (in %DNS im Schweif) im Vergleich zwischen verschiedenen Proben. Verglichen wurden:

1. Unbestrahlte Proben (0Gy) und Proben nach Bestrahlung (4 Gy)
2. Unbestrahlte Proben nach 90 min Reparatur des Basalschadens (0 Gy + 90 min Reparatur) und Proben nach Bestrahlung mit 4 Gy (4 Gy)
3. Unbestrahlte Proben nach Lyse in 1,5M NaCl-Lösung mit Triton-X 100 + 90mM DMSO und Proben nach identischer Lyse und Bestrahlung (4 Gy)
4. Unbestrahlte Proben nach Lyse in 1,5M NaCl-Lösung mit Triton-X 100 und Proben nach identischer Lyse und Bestrahlung (4 Gy)

Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall der jeweiligen Varianz.

### Ergebnisse:

1. Im Vergleich der gemittelten Schädigungsvarianz unbestrahlter Proben mit der entsprechenden Varianz von mit 4 Gy bestrahlten Proben, ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $F=4,328$ ;  $p=0,072$ ), auch wenn die Varianz nach Bestrahlung größer war.
2. Nach 90-minütiger Reparatur des Basalschadens (0 Gy + 90 Minuten Reparatur) ergab sich jedoch im Vergleich zur Varianz von mit 4 Gy bestrahlten Proben ein signifikanter Unterschied ( $F=48,372$ ;  $p<0,001$ ). In diesem Fall war nach Bestrahlung die Varianz signifikant größer.
3. Ein ähnlicher Effekt wurde beim Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben beobachtet, die in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 und 90mM DMSO lysiert worden waren ( $F=70,647$ ;  $p<0,001$ ).
4. In Proben, welche vor Bestrahlung in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 lysiert worden waren, ergab sich nach Bestrahlung mit 4 Gy eine signifikant größere Schadensvarianz als in unbestrahlten Proben ( $F=21,728$ ;  $p=0,002$ ).

**Zusammenfassung:** Nach Bestrahlung war die Varianz des Schädigungsmittels größer als die Varianz von DNS-Schaden in unbestrahlten Proben.

- d) *Einfluss der Reparatur nach Bestrahlung mit 4 Gy/Einfluss der Reparatur auf die Varianz des Basalschadens*

### Erläuterung:

Verglichen wurden Proben, die sich nach Bestrahlung mit 4 Gy untereinander hinsichtlich ihrer Reparaturzeiten unterschieden, sowie Proben die unreparierten

Basalschaden aufwiesen (0 Gy) mit Proben, die den Basalschaden 90 Minuten während Inkubation in Reparaturmedium reparierten (0 Gy + 90 min Reparatur)

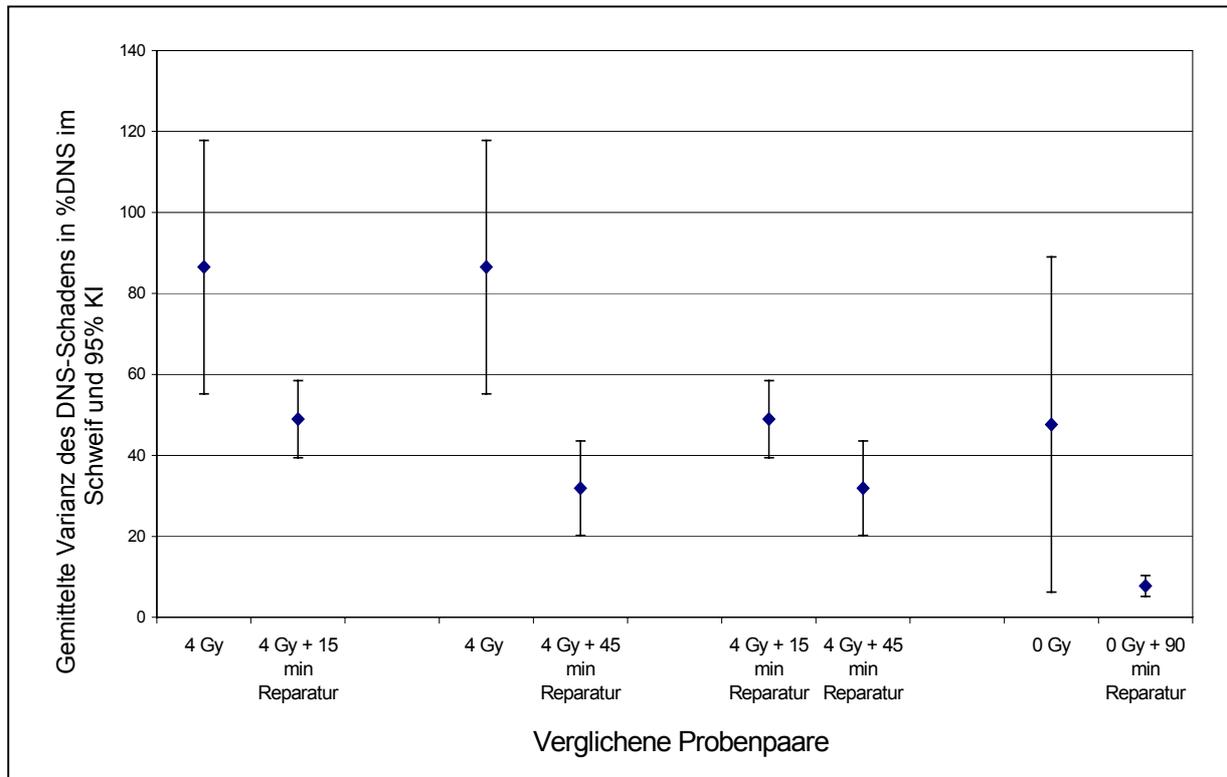


Abb. 3.9) Einfluss der Reparatur auf die Schadensvarianz

Dargestellt sind über  $n=5$  Probanden gemittelte Schadensvarianzen (in %DNS im Schweif) im Vergleich zwischen verschiedenen Proben. Verglichen wurden:

1. Proben mit Initialschaden (4 Gy) und Proben mit Residualschaden (4 Gy + 15 min Reparatur)
2. Proben mit Initialschaden (4 Gy) und Proben mit Residualschaden (4 Gy + 45 min Reparatur)
3. Proben mit Residualschaden (4 Gy + 15 min Reparatur) und Proben mit Residualschaden (4 Gy + 45 min Reparatur)
4. Proben mit nicht-repariertem Basalschaden (0 Gy) und unbestrahlte Proben nach 90 min Reparatur (0 Gy + 90 min Reparatur)

Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall der jeweiligen Varianz.

### Ergebnisse:

1. Sowohl für Proben, die nach Bestrahlung mit 4 Gy 15 min in Reparaturmedium inkubiert wurden, als auch für Proben, deren Zellen 45 min nach Bestrahlung mit 4

Gy reparierten, ergab sich im Varianzvergleich mit Proben mit Initialschaden nach 4 Gy ein signifikanter Unterschied der gemittelten Varianzen im Sinne einer verkleinerten Varianz ( $F=19,140$ ;  $p=0,013$ , bzw.  $F=20,575$ ;  $p=0,002$ ).

2. Gleichmaßen ergab der Vergleich zwischen Proben mit 15 bzw. 45 min Reparaturzeit nach 45 min eine signifikant kleinere Varianz ( $F=9,887$ ;  $p=0,014$ ).
3. Nach 90-minütiger Inkubation in Reparaturmedium zeigte sich auch für den Basalschaden eine signifikante Verkleinerung der Varianz ( $F=7,119$ ;  $p=0,028$ )

**Zusammenfassung:** Residualschaden zeigte eine signifikant kleinere Varianz als Initialschaden bzw. initialer DNS-Basalschaden.

e) Einfluss der Reparatur nach Bestrahlung mit 2x4 Gy

Erläuterung:

Gemittelte Varianzen von Proben, die nach zweimaliger Bestrahlung mit 4 Gy unterschiedlichen Inkubationszeiten in Reparaturmedium (0 min, 15 min, 45 min) ausgesetzt waren, wurden verglichen.

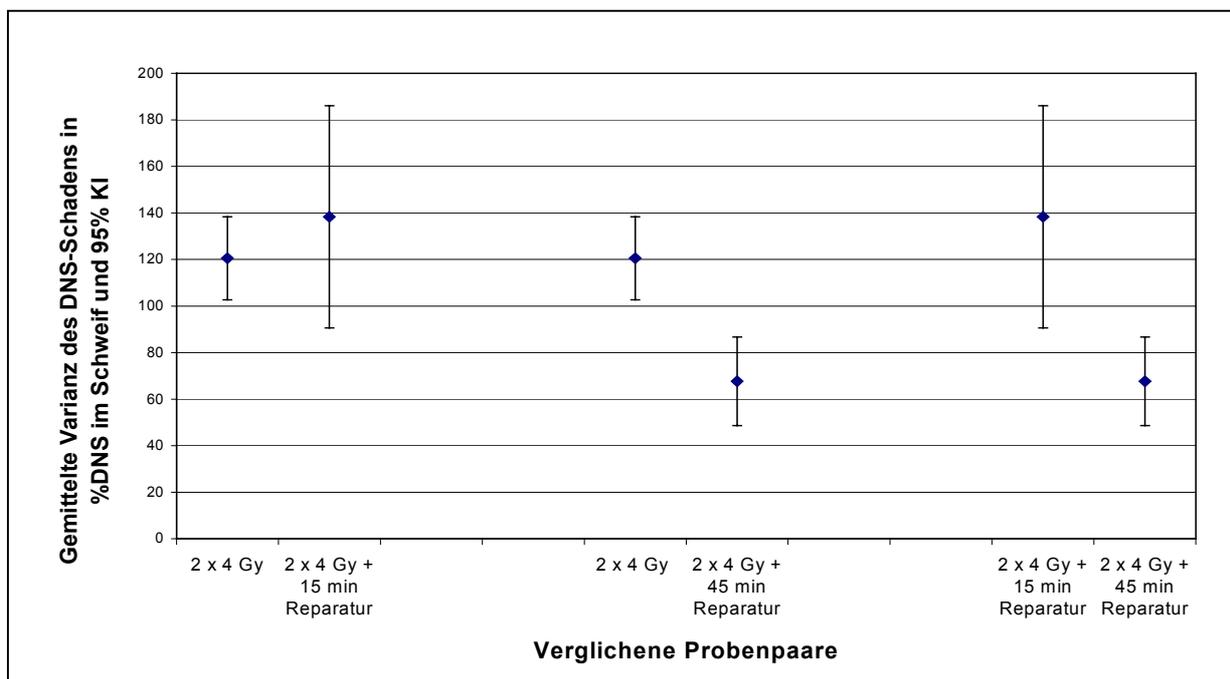


Abb. 3.10) Einfluss einer Reparatur nach Bestrahlung mit 2x4 Gy auf die Schadensvarianz

Dargestellt sind über  $n=5$  Probanden gemittelte Schadensvarianzen (in %DNS im Schweif) im Vergleich zwischen verschiedenen Proben. Verglichen wurden:

1. Proben mit Initialschaden nach 2x4 Gy und Proben mit Residualschaden nach 2x4 Gy + 15 min Reparatur
2. Proben mit Initialschaden nach 2x4 Gy und Proben mit Residualschaden nach 2x4 Gy + 45 min Reparatur
3. Proben mit Residualschaden nach 2x4 Gy + 15 min Reparatur und Proben mit Residualschaden nach 2x4 Gy + 45 min Reparatur

Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall der jeweiligen Varianz.

### Ergebnisse:

1. Zwischen Proben mit Initialschaden (0 min Reparatur) und Proben mit Residualschaden nach 15 min Reparatur war kein signifikanter Unterschied zu messen ( $F=0,947$ ;  $p=0,359$ ).
2. Nach längerer Reparaturzeit (45 min) ergab sich jedoch bezogen auf den Initialschaden eine signifikant kleinere Varianz ( $F=31,585$ ;  $p<0,001$ ).
3. Auch der Vergleich von Proben mit 15- bzw. 45-minütiger Reparatur zeigte bei letztgenannten Proben eine signifikant verringerte Varianz ( $F=14,608$ ;  $p=0,005$ ).

**Zusammenfassung: In Zellen, die nach einer zweiten Bestrahlungsfraction DNS-Schaden reparierten, zeigte sich erst nach mehr als 15 min Reparatur eine signifikant kleinere Schadensvarianz als bei Zellen mit Initialschaden ohne Reparatur.**

### f) Einfluss einer Bestrahlung mit 2x4 Gy

#### Erläuterung:

Verglichen wurden Proben, die nach ein- oder zweimaliger Bestrahlung mit 4 Gy (im Abstand von 45 min) identische Reparaturzeiten aufwiesen.

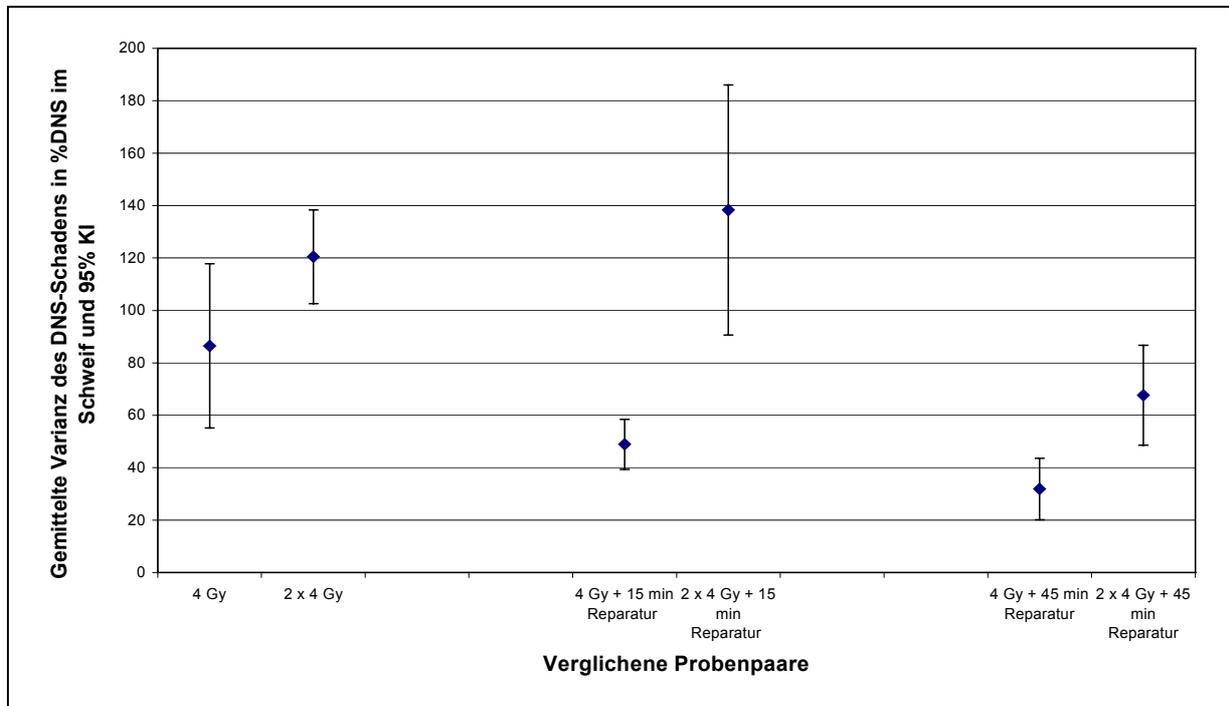


Abb. 3.11) Einfluss einer Bestrahlung mit 2x4 Gy auf die Schadensvarianz

Dargestellt sind über  $n=5$  Probanden gemittelte Schadensvarianzen (in %DNS im Schweif) im Vergleich zwischen verschiedenen Proben. Verglichen wurden:

1. Proben nach einmaliger Bestrahlung (4 Gy) mit Proben nach 2x4 Gy.
2. Proben nach einmaliger Bestrahlung und 15 min Reparatur (4 Gy + 15 min Reparatur) mit Proben nach 2x4 Gy + 15 min Reparatur.
3. Proben nach einmaliger Bestrahlung und 45 min Reparatur (4 Gy + 45 min Reparatur) mit Proben nach 2x4 Gy + 45 min Reparatur.

Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall der jeweiligen Varianz.

#### Ergebnisse:

Nach einer Bestrahlungsdosis von 2x4 Gy ergab sich für alle verglichenen Proben (Initialschaden nach 2x4 Gy, bzw. Residualschaden nach 2x4 Gy + 15 min Reparatur

und Residualschaden nach 2x4 Gy + 45 min Reparatur) im Vergleich zu entsprechenden Werten nach der ersten Bestrahlungsdosis eine signifikant höhere Varianz ( $F=6,839$ ;  $p=0,031$ , bzw.  $F=26,039$ ;  $p=0,001$  und  $F=19,795$ ;  $p=0,002$ )

Zusammenfassung: Nach zweimaliger Bestrahlung war die Schädigungsvarianz signifikant größer als die Varianz des mittleren DNS-Schadens von nur einmal bestrahlten vergleichbaren Proben.

### **3.4.3 Modell zur quantitativen Analyse varianzverändernder Faktoren**

*a) Varianz des Initialschadens von Nukleoiden und Zellen nach Reparatur in Relation zur Schadensvarianz intakter Zellen*

#### Erläuterung:

Zellen nach Bestrahlung mit 4 Gy sind - vom erzeugten DNS-Schaden und einer durch Kühlung unterbundenen DNS-Reparatur abgesehen - intakte Zellen u.a. mit intakter Chromatinkonformation und löslichen Antioxidantien.

Im Gegensatz dazu stellen Zellen nach Lyse in 1,5M NaCl-Lösung/1% Triton-X Nukleoide, d.h. organellfreie Zellresiduen ohne lösliche Antioxidantien mit an nukleärer Matrix verankerter DNS und nur noch Resten von Histonproteinen dar. Demgegenüber repräsentieren Zellen nach Bestrahlung mit 4 Gy und 45 min Reparatur ein Zellmodell, in dem neben den Zellschutzsystemen Histonproteine/Chromatinkonformation und löslichen Antioxidantien auch das System der DNS-Reparatur auf den DNS-Schaden Einfluss nimmt.

Im Rahmen der folgenden hypothetischen Betrachtung wurden die Faktoren intakte Chromatinstruktur, Antioxidantien und Reparatur als additive Komponenten zellulärer Radioprotektion angesehen.

Demnach konnten die gemittelten Schädigungsvarianzen (genaue Zahlenwerte siehe Tabelle **6.2.3**, S. 77) des DNS-Schadens der Proben „Lyse in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 + 4 Gy“ und „4 Gy + 45 min Rep.“ in Relation zur Schadensvarianz der Probe „Bestrahlung mit 4 Gy“ dargestellt werden (*siehe Abb. 3.12*)

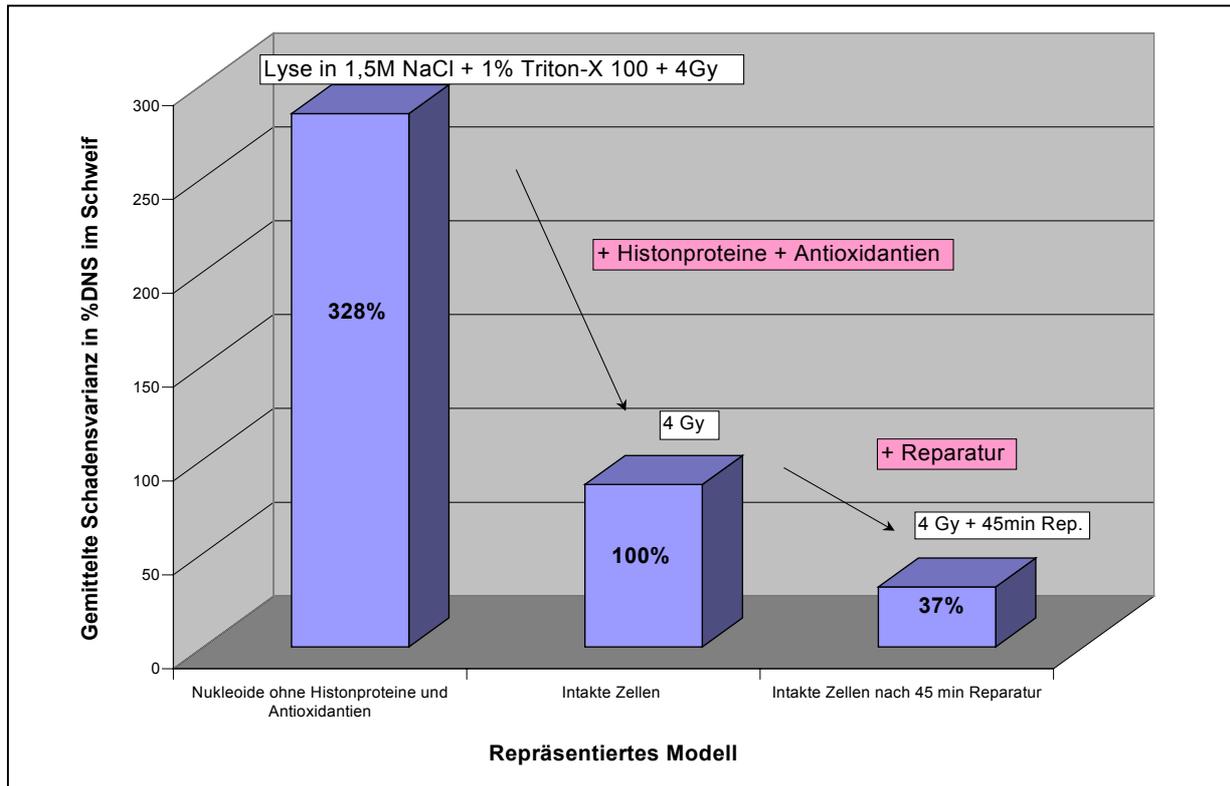


Abb. 3.12) Varianzrelation für Initialschaden nach Bestrahlung mit 4 Gy

Dargestellt werden über  $n=5$  Probanden gemittelte Schädigungsvarianzen verschiedener Proben sowohl als Absolutwert in %DNS im Schweiß als auch in % der Varianz der Probe „4 Gy“. Aufgezeigt werden die Proben:

1. Lyse in 1,5M NaCl/1% Triton-X 100 vor Bestrahlung mit 4 Gy
2. Initialschaden nach 4 Gy
3. Residualschaden nach 4 Gy und 45 min Reparatur

Weiterhin werden die durch die einzelnen Proben repräsentierten Modelle als Beschriftungen auf der Abszisse aufgezeigt.

### Ergebnisse:

Die Schädigungsvarianz der Proben, welche in 1,5M NaCl-Lösung mit 1% Triton-X 100 lysiert worden waren, betrug 328% im Vergleich zu nicht vor Bestrahlung lysierten Proben. Insofern reduzierten das Vorhandensein von Histonen, die intakte räumliche Struktur des Chromatins im Zellkern, sowie lösliche intrazelluläre Antioxidantien die Varianz des DNS-Initialschadens in intakten Zellen um mehr als

Faktor 3. Nach Reparatur zeigte sich verglichen mit der Ausgangsvarianz eine weitere Abnahme der Schadensvarianz um etwa Faktor 3 von 100% auf 37%.

b) *Varianz des Residualschadens nach zweimaliger Bestrahlung und Reparatur in Relation zur Varianz des Initialschadens nach einmaliger Bestrahlung*

Erläuterung:

Zur quantitativen Analyse des Einfluss der Faktoren „zweifache Bestrahlung“ und „Reparatur nach zweifacher Bestrahlung“ wurden alle gemittelten Schädigungsvarianzen der Proben „2x4 Gy“, „2x4 Gy + 15 min Reparatur“ und „2x4 Gy + 45 min Reparatur“ und die Varianz des Initialschadens nach einmaliger Bestrahlung mit 4 Gy in Relation gesetzt.

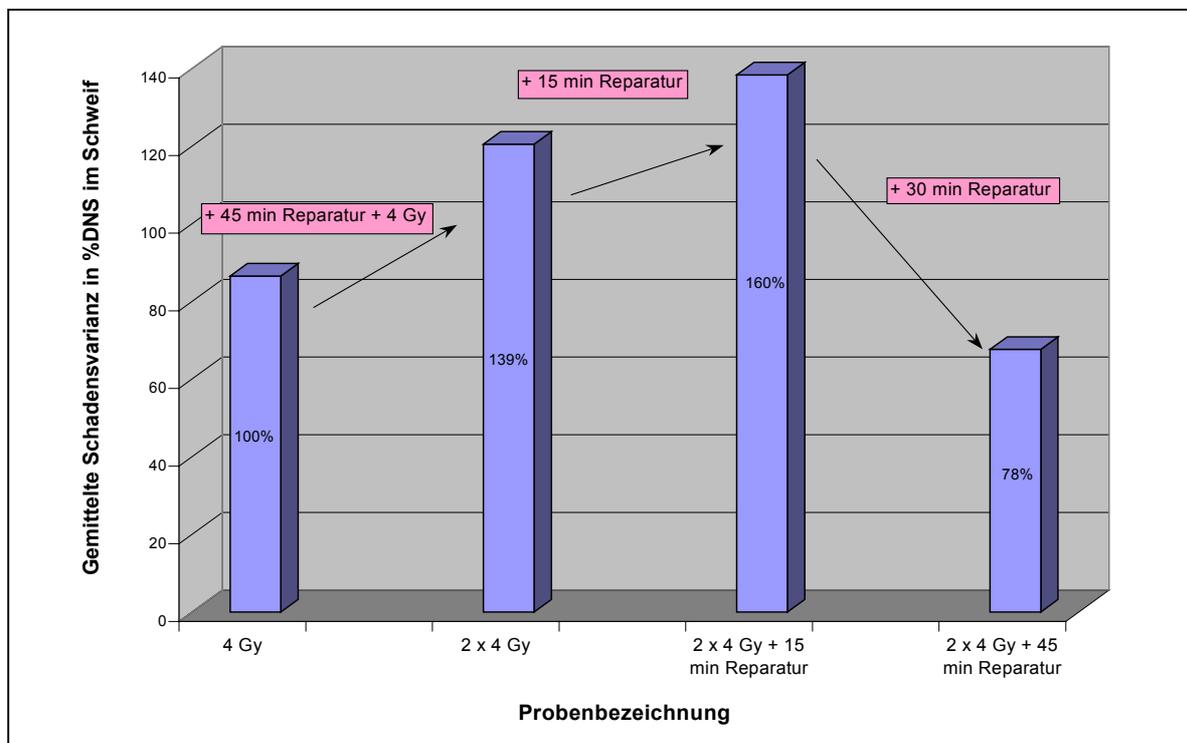


Abb. 3.13) Varianzrelation für Proben nach Bestrahlung und Reparatur

Dargestellt sind über  $n=5$  Probanden gemittelte Schadensvarianzen verschiedener Proben sowohl als Absolutwert in %DNS im Schweiß als auch als prozentualer Anteil an der Schadensvarianz des Initialschadens (4 Gy). In prozentualen Anteilen aufgezeigt werden die Proben:

1. Nach Bestrahlung mit 2x4 Gy
2. Nach Bestrahlung mit 2x4 Gy und 15 min Reparatur
3. Nach Bestrahlung mit 2x4 Gy und 45 min Reparatur

### Ergebnis:

Nach zweifacher Bestrahlung zeigte sich eine Varianz von 139,3% des Ausgangswertes, dieser Wert erhöhte sich nach einer anschließenden 15-minütigen Reparatur noch auf 160%, um dann während der folgenden 30 Minuten Reparatur wieder auf 78,2% des Ausgangswertes abzufallen.

### **3.4.4 Zusammenhang zwischen Schadensmittelwert und Varianz des DNS-Schadens**

#### Erläuterung:

Die in Abschnitt 3.4.2 dargestellten Einflussfaktoren (Lyse vor Bestrahlung zur Entfernung von Histonproteinen, Lyse vor Bestrahlung mit Antioxidantien, Bestrahlung, Reparatur, zweifache Bestrahlung) beeinflussen neben der Heterogenität des DNS-Schadens auch die Höhe des DNS-Schadensgrades.

Dies illustriert *Abbildung 3.14*, in der die über n=5 Probanden gemittelten Schadensvarianzen aller Proben, sowie die ebenfalls über alle Probanden gemittelten Schadensmittelwerte dargestellt sind.

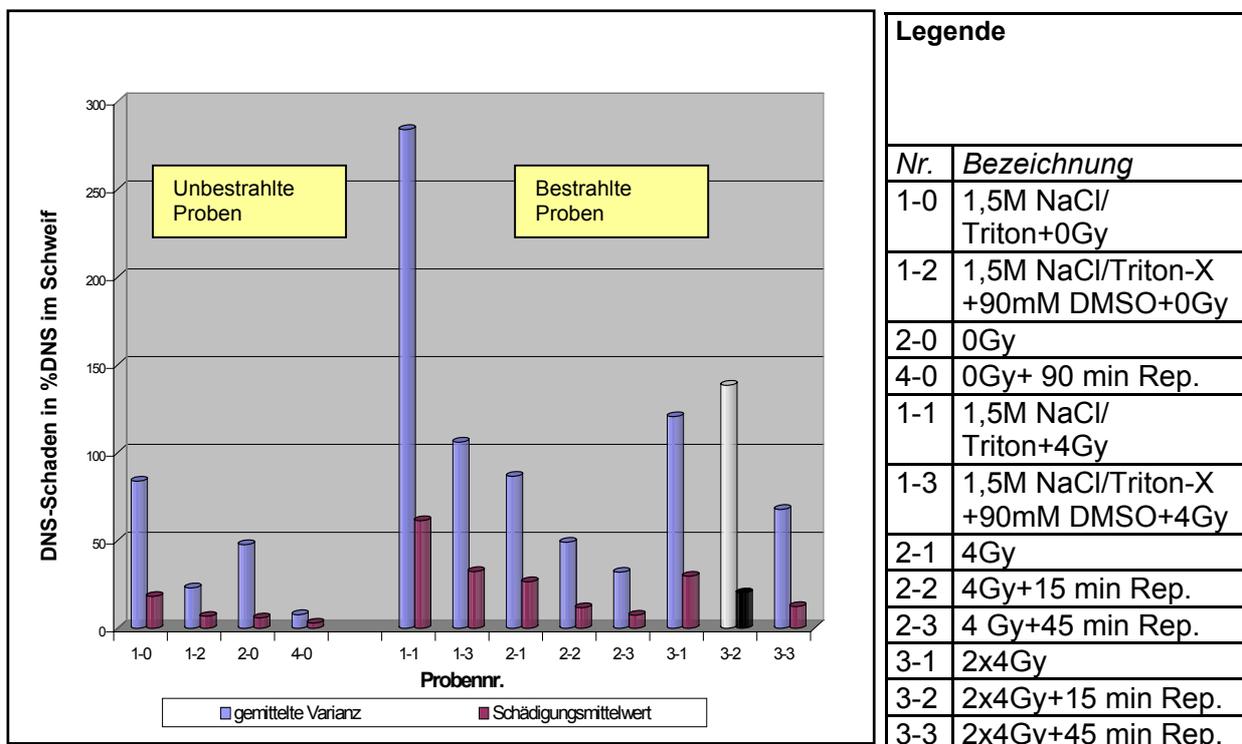


Abb. 3.14) Schädigungsmittelwerte (dunkle Balken) und gemittelte Schädigungsvarianzen (helle Balken) für alle Proben

Dargestellt sind über n=5 Probanden gemittelte Schädigungsvarianzen und Schädigungsmittelwerte aller Proben in Abhängigkeit von der jeweiligen Probenart.

### Ergebnisse:

In allen Proben, abgesehen von der farblich anders markierten Probe 3-2 (=2x4 Gy + 15 min Reparatur), zeigte sich bei erhöhtem Schädigungsmittelwert gleichzeitig auch eine erhöhte Schädigungsvarianz. Zur genaueren Klärung dieses Sachverhaltes wurde eine Regressions-/Korrelationsanalyse für alle n=60 Proben (je Proband 12 Proben) für Schädigungsmittelwert und Varianz des mittleren DNS-Schadens durchgeführt.

#### a) Streudiagramm

Im Streudiagramm stellten sich die verwendeten Daten wie folgt dar:

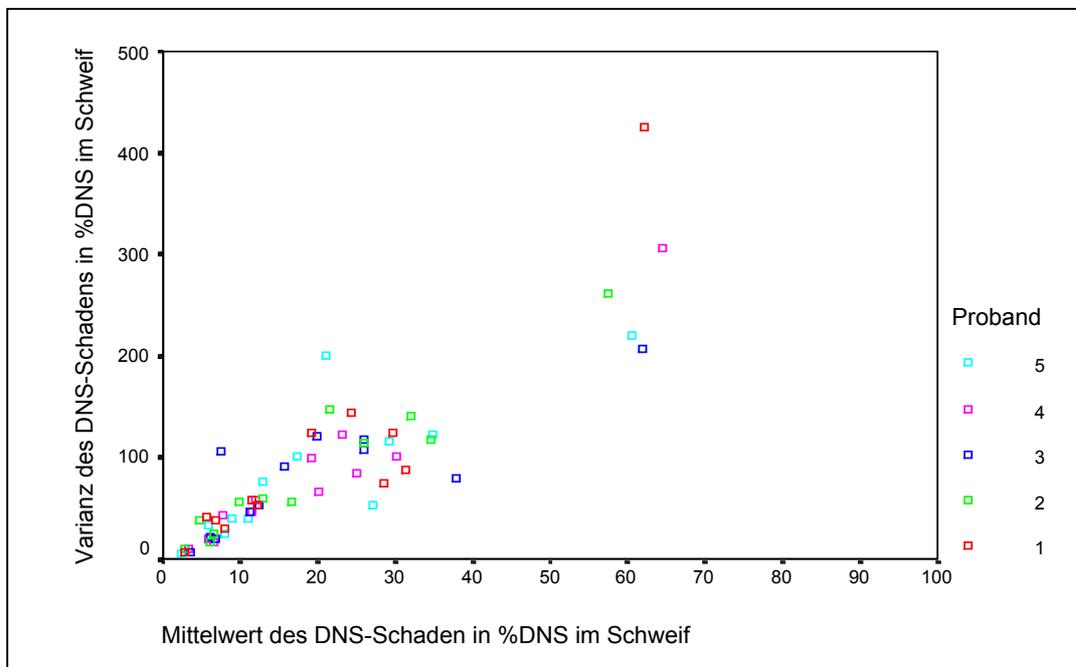


Abb.3.15) Streudiagramm von Schädigungsmittelwerten in %DNS im Schweiß gegen Varianz des mittleren DNS-Schadens in %DNS im Schweiß für n=60 Proben (= je Proband 12 Proben)

#### b) Korrelation

Die lineare Korrelation nach Pearson und Bravais von Schadensmittelwert und Varianz ergab für n=60 Fälle einen Korrelationskoeffizienten von  $r=0,880$ . Die Korrelation war mit einer Signifikanz von  $p<0,001$  (2-seitig) signifikant.

### c) Lineare Regression

Eine lineare Regressionsanalyse für die Varianz in Abhängigkeit vom Schadensgrad ergab als Bestimmtheitsmaß ein korrigiertes  $R^2$  von 0,771, d.h. 77,1% der Varianzvariabilität waren durch Änderungen des Schadensgrades erklärbar.

Als nicht-standardisierte Koeffizienten ergab sich mit einer Signifikanz von  $p=0,643$  eine Konstante von 3,547 und mit einer Signifikanz von  $p<0,001$  für den Schadensmittelwert ein Regressionskoeffizient von 4,273.

Zusammenfassung: Mittlerer DNS-Schaden und die Varianz dieses Schadens korrelieren hochgradig positiv miteinander.

### 3.4.5 Einfluss der einzelnen Faktoren auf mittelwertkorrigierte Varianzen

#### Erläuterung:

Erhöhter mittlerer Schaden scheint (siehe Abschnitt **3.4.4**) mit einer erhöhten Varianz dieses Schadens einherzugehen. Um ein gegen Einflüsse veränderten mittleren Schadens stabiles Heterogenitätsmaß bei Berechnungen zu heterogenität-beeinflussenden Faktoren zu verwenden, wurden probandenübergreifende Vergleiche von mittelwertkorrigierten Varianzen, d.h. von Quotienten aus Varianz des DNS-Schadens und Mittelwert dieses Schadens durchgeführt.

Alle Paarvergleiche wurden, für die einzelnen Einflussfaktoren getrennt, zwischen den Proben durchgeführt, die auch in Abschnitt **3.4.2**, S.30, verglichen wurden. Verglichen wurden mittels einfaktorieller ANOVA diesmal keine Varianzen, sondern die Quotienten aus Varianz/Mittelwert. Veränderungen wurden unterhalb einer Signifikanzschwelle von  $\alpha=0,05$  als signifikant betrachtet.

Alle Ergebnisse der durchgeführten Vergleiche sind **Tabelle 6.2.4**, S. 78, im Anhang zu entnehmen. Im folgenden soll nur auf Faktoren mit signifikantem Effekt eingegangen werden.

*a) Einfluss der Reparatur auf die Heterogenität des Basalschadens*

Nach 90-minütiger Reparatur des Basalschadens unbestrahlter Proben ergab sich für diese Proben im Vergleich zu Proben mit nicht-repariertem Basalschaden eine signifikante kleinere mittelwertkorrigierte Varianz ( $F=7,977$ ;  $p=0,022$ ).

*b) Einfluss der Reparatur nach Bestrahlung mit 2x4 Gy*

Nach zweifacher Bestrahlung und nochmaliger Reparatur ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Proben mit Initialschaden (= 2x4 Gy) und Proben mit Residualschaden nach 15 min Reparatur (2x4 Gy + 15 min Rep.). Die mittelwertkorrigierte Varianz der Probe 2x4 Gy + 15 min Reparatur war signifikant größer als die der Probe 2x4 Gy ( $F=12,716$ ;  $p=0,007$ ). Weiterhin war der Quotient Varianz/Mittelwert bei der Probe 2x4 Gy + 45 min signifikant größer als jener der Probe 2x4 Gy ( $F=18,908$ ;  $p=0,002$ ).

*c) Einfluss einer Bestrahlung mit 2 x 4 Gy*

Die mittelwertkorrigierten Varianzen der beiden Proben mit Residualschaden nach 2x4 Gy und 15min Reparatur bzw. 45min Reparatur waren signifikant größer als ihre Äquivalente nach einmaliger Bestrahlung mit 4 Gy ( $F=12,59$ ;  $p=0,008$  bzw.  $F=7,995$ ;  $p=0,022$ ).

**Zusammenfassung: Nur Reparatur und mehrfache Bestrahlung zeigten signifikante Effekte auf mittelwertkorrigierte Varianzen, andere Faktoren (Lyse vor Bestrahlung zur Entfernung von Histonproteinen +/- Antioxidantien, einfache Bestrahlung) zeigten keine Effekte auf dieses gegen Änderungen des Schädigungsmittelwertes stabile Heterogenitätsmaß.**

## **4 Diskussion**

Aus den im vorigen Kapitel dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, dass verschiedene biologische Faktoren (z.B. Chromatinstruktur/Histongehalt, Reparatur, Reparatur nach zweifmaliger Bestrahlung) eine Veränderung der Varianz des Schadensmittelwertes als Maß für Heterogenität bewirken, was eine Interpretation dieser Heterogenität im Sinne einer bloßen, technisch bedingten „Messwertstreuung“ nicht adäquat erscheinen lässt. Über diese Erkenntnis hinausgehend soll im Rahmen dieser Diskussion, soweit dies anhand der eigenen Ergebnisse, der ihnen zugrundeliegenden Modelle und anhand vorhandener Literatur möglich ist, ein Blick auf die Ursachen der Heterogenität zellulären DNS-Schadens geworfen werden. Sowohl die molekularen Hintergründe der Heterogenität initialen DNS-Schadens, als auch jene von Residual- und Basalschaden sollen in diesem Zusammenhang näher betrachtet werden.

### **4.1 Wie entsteht die Heterogenität des Initialschadens? - Hypothesen**

#### *Hypothese 1*

Die Heterogenität des messbaren DNS-Schadens direkt nach Bestrahlung - also des Initialschadens - ist Ergebnis verschieden starken DNS-Schadens pro Zelle aufgrund unterschiedlichen zellulären Antioxidantiengehalts.

#### *Hypothese 2*

Schadensheterogenität kommt durch den Einfluss von DNS-/Chromatinkonformation zustande.

#### *Hypothese 3*

Heterogenität wird durch das Messverfahren (den Comet-Assay) beeinflusst bzw. teilweise bedingt.

#### *Hypothese 4*

Andere Faktoren bedingen DNS-Schadensheterogenität.

#### **4.1.1 Schadensheterogenität als Ergebnis ungleich vieler DNS-Strangbrüche durch interzellulär differierenden Antioxidantiengehalt**

Ionisierende Strahlung verursacht an zellulärer DNS Schäden durch direkte und indirekte Effekte. Indirekte Effekte werden vornehmlich durch Hydroxalradikale verursacht z.B. (Roots, Okada, 1975) und überwiegen bei der hier verwendeten Röntgenstrahlung gegenüber direkten Effekten.

Insgesamt verursacht eine Energiedosis von 4 Gy in der DNS einer einzelnen Zelle ca. 5.000 Einzelstrangbrüche, 160 Doppelstrangbrüche, 600 DNS-Protein Crosslinks und 5000 Basenschäden (Burkart et al., 1999).

Zwischen Zellen, die sich benachbart in einem homogenen Bestrahlungsfeld befinden, ist kein bedeutsamer quantitativer Unterschied der Strahlenwirkung zu erwarten, vorausgesetzt ihr Antioxidantiengehalt ist gleich (Olive et al., 1994b). Durch Zellyse in antioxidantienreicher Lösung (1,5M NaCl, 1% Triton-X 100, 90mM DMSO) wurde versucht, ein einfaches Modell für Nukleide (=DNS mit Resten von Histonproteinen gebunden an nukleäre Matrix) in antioxidativer Lösung zu schaffen, bzw. eine maximal vereinheitlichte Konzentration von löslichen Antioxidantien bzw. Radikalfängern in direkter Umgebung von DNS.

Wie aus *Abbildung 3.7* (S. 32) ersichtlich, war die Schadensvarianz als Maß für die Heterogenität des Initialschadens nach einer solchen Behandlung nahe der des Initialschadens intakter Zellen. Mit anderen Worten – der DNS-Schaden war nach einer maximal möglichen Homogenisierung des perinukleoidären Gehalts an löslichen Radikalfängern noch immer so heterogen, dass er vom *in-vivo* gegebenen Zustand hinsichtlich seiner Heterogenität nicht signifikant abwich.

**Im Umkehrschluss implizierte dies, dass die Heterogenität des DNS-Schadens unter Blutleukozyten zum großen Teil nicht durch ein interzellulär differierendes Schadensmittel als Folge unterschiedlichen Gehalts an löslichen Radikalfängern bedingt ist.**

#### **4.1.2 Heterogenität in Abhängigkeit von DNS-/Chromatinkonformation**

Die im eukaryotischen Zellkern befindliche DNS ist eng an Histone gebunden und mit ihnen zu Nukleosomen assoziiert. Zusammen mit dem Histon H1 und anderen Nicht-Histonproteinen ist nukleosomales Chromatin in höhergradigen chromosomalen Strukturen organisiert und regelmäßig an der nukleären Matrix verankert. Auf diese Weise wird der Packungsgrad der DNS 10.000-fach erhöht (Xue et al., 1994).

Die radioprotektive Funktion von Chromatin ist seit mehr als 20 Jahren bekannt.

In Experimenten mit histonfreien Nukleoiden ergab sich für verschiedene Schadensarten im Vergleich zu Zellkernen *in-vivo* ein um Faktor 70-80 erhöhtes Schadensmaß (Ljungman, 1991), (Warters, Lyons, 1992).

Sowohl die hochgradige räumliche Kondensation von Chromatin als auch die DNS-Organisation in Nukleosomen tragen zur Radioprotektion durch die Chromatinstruktur bei (Warters, Lyons, 1992), (Chiu et al., 1992), wobei der quantitative Beitrag der Radioprotektion durch Kernhistone des Nukleosoms überwiegt (Ljungman, 1991). Als molekulare Ursache für diese Radioprotektion durch Histone wird ein Nebeneinander von OH-Radikalfang und Wasserausschluss mit Reduktion des Radikalaufkommens in DNS-Nähe diskutiert (Nygren et al., 1995).

Weiterhin gibt es Anzeichen dafür, dass neben dieser allgemeinen Radioprotektion durch Histone und Chromatinkondensation auch eine Modulation der Verteilung von DNS-Schäden anzutreffen ist.

So gelten aktiv transkribierte DNS-Bereiche aufgrund des relaxierten umgebenden Chromatins als radiosensitiver als silente DNS (Oleinick et al., 1984) was auf vermehrte Exposition der DNS relaxierter Chromatinbereiche gegenüber strahlenbedingten Hydroxylradikalen zurückgeführt wird (Xue et al., 1994).

Andere Autoren berichteten in der gesamten nukleären DNS sowohl bei Strahlen hohen LET's als auch bei der von uns verwendeten Röntgenstrahlung mit niedrigem LET von Schäden, deren Verteilung nicht dem Zufallsprinzip folgt (Rydberg, 1996) (Newman et al., 1997), was durch nukleosomale DNS-Organisation mitbedingt sein könnte (Holley, Chatterjee, 1996).

In den hier vorgelegten Untersuchungen ergab sich eine signifikant vergrößerte Varianz des DNS-Initialschadens nach Lyse vor Bestrahlung im Vergleich zu nicht vor Bestrahlung lysierten Zellen (*siehe Abb. 3.6, S. 31 und 3.12, S. 40*). Bei der verwendeten NaCl-Konzentration liegt nukleäres Chromatin kondensiert vor, und an nukleäre DNS sind nur noch wenige Histonproteine der Subtypen H3, H4 sowie Nicht-Histon Proteine der nukleären Matrix gebunden (Olive, Banath, 1995). Zusätzlich werden durch dieses Verfahren intrazelluläre lösliche Radikalfänger entfernt.

Die Verringerung von intrazellulären Radikalfängern und Histonproteinen bedingte also eine vergrößerte Heterogenität des DNS-Schadens im Sinne eines „chaotischeren“ DNS-Schadensbildes, was im Umkehrschluss als *in-vivo* existente Schadensvereinheitlichung durch intrazelluläre Radioprotektion (Nukleosomenstruktur und intrazelluläre Radikalfänger) interpretiert werden könnte. Da in rein quantitativen Untersuchungen (ohne Betrachtung der Schadensheterogenität) übereinstimmend zur intrazellulären Radioprotektion berichtet wurde, dass intrazelluläre Radioprotektion zum allergrössten Anteil der DNS-Histonwechselwirkung zuzuschreiben sei (Ljungman et al., 1991), kann ein überwiegender Effekt der Histonproteine auf diese zelluläre Schadensmodulation vermutet werden. Ein verringerter Gehalt an Histonen könnte größere interzelluläre Unterschiede der DNS-Konformation hervorrufen, welche wiederum die DNS mancher Zellen stärker gegenüber radiogenen Schäden exponieren könnten als andere.

#### **4.1.3 Heterogenität durch Eigenschaften des Comet-Assay**

Eine alternative oder ergänzende Erklärungsmöglichkeit zum Einfluss der Chromatinkonformation auf Schadensheterogenität ist die, dass die Messbarkeit der Heterogenität des DNS-Schadens von der Chromatinstruktur beeinflusst wird.

Auf Nukleoiden basierende Verfahren zur Messung von DNS-Schäden wurden in der Vergangenheit als beeinflussbar durch die Chromatinkonformation beschrieben. So ist u.a. für den „Neutral Filter Elution Assay“, zur Messung von Doppelstrangbrüchen (Woudstra et al., 1996) sowie für die Technik des „Alkaline Unwinding“ und die

Technik des Halo-Assays (Olive et al., 1994b) zur Messung von Einzelstrangbrüchen, bekannt, dass Messergebnisse nicht nur von der Anzahl vorhandener Strangbrüche abhängen sondern gleichzeitig auch von der Chromatinstruktur bzw. dem DNS-Packungsgrad.

Der Comet-Assay unterscheidet sich von den bereits erwähnten Techniken maßgeblich dahingehend, dass mittels Gelelektrophorese eine Ausziehung von geschädigter DNS zur Anode hin erfolgt. Er gleicht ihnen aber in Bezug auf die Messgrundlage – den Nukleoid (*siehe Abb. 4.1*), in dem sog. histonarme „Chromatin-Loops“ an einer noch verbliebenen nukleären Matrix befestigt sind (Johnston et al., 1998)

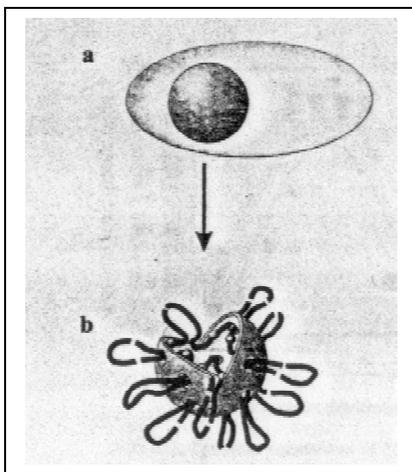


Abb. 4.1 (modifiziert nach (Johnston et al., 1998) ,  
a) intakte Zelle;  
b) Nukleoid mit Doppelstrang-DNS verankert an  
Proteinen nukleärer Matrix

Aus diesem Blickwinkel erscheint es plausibel, dass auch im Comet-Assay interzelluläre Unterschiede der Chromatinkonformation bzw. des DNS-Packungsgrades auf die Darstellung von Messergebnissen Einfluss nehmen, obwohl dies von einigen Autoren nicht berichtet wird (Johnston et al., 1998).

Noch wahrscheinlicher wird eine derartige Eigenschaft des Comet-Assay unter Berücksichtigung von Ergebnissen von Yendle et al., in denen beschrieben wird, dass die Zeit des Entwinden in Alkali sowie Substanzen, welche mit der strukturellen Integrität von Chromosomen wechselwirken, Comet-Parameter verändern können, ohne Strangbrüche im eigentlichen Sinne zu verursachen (Yendle et al., 1997).

Ergänzend zur wahrscheinlichen Beeinflussbarkeit des Comet-Assay durch Chromatinstruktur wurde berichtet, dass schlichte „Verhedderung“ von DNS bzw. DNS-Fragmenten als Folge hochgradiger DNS-Kondensation im histonarmen

Nukleoid die elektrophoretisch bedingte DNS-Migration beeinflusst (Olive et al., 1992).

Die von uns beobachtete hochgradige Korrelation von Schadensmittelwert und Heterogenität (*siehe Abb. 3.15, S.43*) und die Abwesenheit eines Einflusses der Chromatinstruktur auf mittelwertkorrigierte Varianzen (*siehe Abschnitt 3.4.5, S. 45*) kann in diesem Kontext erklärt werden. Zunehmender mittlerer DNS-Schaden (durch Histonentfernung und/oder Bestrahlung) könnte schlicht mit zunehmender Unordnung bzw. „Verhedderung“ von DNS-Fragmenten einhergehen, somit zu unberechenbarer Migration der DNS im elektrischen Feld und abnehmender Helligkeit gefärbter DNS führen und deshalb mittelbar zu größerer Heterogenität des Schadens in seiner Darstellung. Auch in Arbeiten vieler anderer Autoren z.B. (Vijayalaxmi et al., 1992), (Bauer et al., 1998) ging eine Erhöhung des mittleren Schadensgrades mit einer Erhöhung der Schadensheterogenität einher. Diesem Effekt der steigenden Heterogenität durch steigenden Schadensgrad kommt aller Wahrscheinlichkeit nach eine sehr große Bedeutung bei der Darstellung der Heterogenität von DNS-Initialschaden zu.

#### **4.1.4 Heterogenität in Abhängigkeit von anderen Faktoren**

Der Comet-Assay wurde und wird zur Erprobung genotoxischer Effekte unterschiedlichster Agentien eingesetzt. In diesem Zusammenhang fällt bei der Auswertung unterschiedlicher Untersuchungen auf, dass durch verschiedene Noxen erzeugte DNS-Schäden sich nicht nur in Form ihrer Schadensmittelwerte unterscheiden, sondern dass auch die jeweiligen Schädigungsmuster hinsichtlich ihrer Heterogenität stark differieren. Als Extrembeispiel sollen hier Untersuchungen von Duez et al. erwähnt werden, in welchen Zellen Delta-Aminolaevulinsäure und UV-Licht ausgesetzt wurden und dann innerhalb einer untersuchten Probe „Kometen“ beobachtet wurden, deren DNS-Schaden von 0% - 100%DNS im Schweif differierte (Duez et al., 2003). Auch wenn Delta-Aminolaevulinsäure und UV-Licht DNS-Schäden verursachen, die in ihrer chemischen Struktur verschieden von den durch Röntgenstrahlung hervorgerufenen DNS-Schäden sind, kann anhand obigen Beispiels argumentiert werden, dass die Struktur des verursachten Schadens seine Repräsentation im Comet-Assay respektive seine Heterogenität mitbeeinflusst.

Weitere Faktoren, welche die Heterogenität strahleninduzierten Initialschadens beeinflussen könnten, wurden vor allem von Olive et al., einer Arbeitsgruppe, die sich intensiv mit den Grundlagen des alkalischen Comet-Assay auseinandersetzte, untersucht. So wurden sowohl andere biologische Faktoren wie Unterschiede im nukleären DNS-Gehalt, bzw. der Zellzyklusphase (*Ausnahme: Zellen in S-Phase, die unter den verwendeten peripheren Blutleukozyten normaler Probanden nicht bzw. nur sehr selten vorkommen*) als auch technische Faktoren wie unterschiedliche Lysegrade der einzelnen Zellen, die Position der Kometen auf dem Objektträger oder Gelinhomogenitäten in ihrem Effekt auf die Schadensheterogenität als eher gering eingestuft (Olive et al., 1990).

Ein wichtiger technischer Faktor, nämlich der des interkalierenden Farbstoffs, soll allerdings noch näher diskutiert werden.

Von interkalierenden Farbstoffen, z.B. Propidiumiodid, ist bekannt, dass ihre Bindung von der DNS-Konformation beeinflusst wird, (Schwartz, Vaughan, 1989) und dass insbesondere kleinere DNS-Fragmente schlechter gebunden und somit angefärbt werden als größere andere (Olive et al., 1994a). Insofern ist also durch die verwendeten Farbstoffe eine in gewissem Sinne verzerrte Darstellung der in Wirklichkeit vorliegenden Schadensheterogenität nicht ausgeschlossen. Weiterhin kann vermutet werden, dass eine solche Verzerrung bei hohen Schadensgraden ausgeprägter wäre als bei niedrigen, da dann die DNS-Fragmentgröße geringer wäre (Olive et al., 1994a).

Zusammenfassung: Initialschadensheterogenität von Blutleukozyten im Comet-Assay ist zumindest zum großen Teil nicht Ergebnis interzellulär verschiedener Quantität des DNS-Schadens durch Differenzen der Antioxidantienkonzentration, sondern Produkt chromatinmodulierter quantitativer Schadensunterschiede bzw. der durch den DNS-Packungsgrad und vor allem den mittleren Schadensgrad beeinflussten Messbarkeit des Schadens mit dem Comet-Assay. Abschließend geklärt werden konnte nicht, ob Unterschiede des DNS-Packungsgrades bzw. der Chromatinstruktur zu einer veränderten Induktion von DNS-Schäden führten, oder ob diese Unterschiede eine veränderte Detektierbarkeit dieser Läsionen bedingen. Eine Trennung beider Effekte war experimentell nicht möglich.

Weiterhin scheinen die chemische Natur des DNS-Schadens sowie Eigenschaften des interkalierenden Farbstoffs die Schadensdarstellung im Comet-Assay mitzubestimmen.

**Die Heterogenität von DNS-Initialschaden einer Normalzellpopulation in ihrer Darstellung im Comet-Assay entsteht also wahrscheinlich im Wechselspiel von mittlerem Schadensgrad, DNS-/Chromatinkonformation und Eigenschaften des Verfahrens selbst.**

## **4.2 Heterogenität des Residualschadens – welchen Einfluss hat die Schadensreparatur?**

Die Heterogenität des Initialschadens widerspiegelt nur das direkt nach Bestrahlung in Zellen vorhandene Schadensbild. Sofort nach Schadensinduktion setzen *in-vivo* Reparaturprozesse zur Entfernung vorhandenen Schadens ein und beginnen sowohl das Schadensmittel und nach den Ergebnissen aus *Abb. 3.9, S. 35*, auch die Schadensheterogenität zu verändern

Die DNS-Reparatur von Einzelstrangbrüchen erfolgt rasch. So berechneten Ward et al. eine Reparaturhalbwertszeit von 4 min bei proliferierenden Zellen (Ward, 1985). Die DNS-Reparatur in G0-Blutleukozyten, wie den von uns verwendeten, erfolgt mit mindestens 50% reparierten Einzelstrangbrüchen innerhalb von 30 min jedoch deutlich langsamer (Banath et al., 1998).

### **4.2.1 Wie erfolgt die Reparatur von radiogenen DNS-Schäden?**

Die Reparatur des überwiegenden Anteils von im alkalischen Comet-Assay gemessenen DNS-Schäden (Einzelstrangbrüche, Basenschäden), die durch ionisierende Strahlen hervorgerufen werden, erfolgt durch Basen-Exzisions-Reparatur (BER). Nur wenige Einzelstrangbrüche können aufgrund ihrer chemisch modifizierten Enden einfach wieder ligiert werden (diskutiert in (Lindahl et al., 1994)). Die Basen-Exzisions-Reparatur gleicht dabei weniger einem einzelnen Reaktionsweg sondern eher einem Netzwerk, in dem verschiedene einander überlappende und komplementierende Reaktionswege bestehen (Dogliotti et al., 2001)

Stark schematisiert umfasst die BER folgende Schritte (diskutiert in (Lindahl et al., 1994), (Dogliotti et al., 2001):

1. Die Entfernung geschädigter Basen durch spezifische DNS-Glykosylasen.
2. Die Hydrolysierung der Phosphodiesterbindung am 5' Ende von der entfernten Base durch eine apurinische/apyrimidinische Endonuklease (APE).  
(Dieser Reparaturschritt stellt nach (Wallace, 1998) auch den Anfang der Reparatur für Einzelstrangbrüche dar.)

3. Einfügung eines Nukleotids durch DNS-Polymerase  $\beta$  im Falle der „short-patch BER“ bzw. mehrerer Nukleotide durch die DNS-Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$  im Falle der „long-patch“ BER.
4. Ligation durch DNS-Ligase I oder III

Je nach Schadensart z.B. (Fortini et al., 2000), Zellzyklusposition und Konzentration der involvierten Enzyme (Dogliotti et al., 2001) wird angenommen, dass verschiedene Reaktionschritte ablaufen, die auch verschiedene Kinetiken aufweisen. Jedoch kommt der schnellen „short-patch“ BER wohl der bei weitem größte quantitative Beitrag bei der Beseitigung einfacher DNS-Schäden in der Zelle zu (Sokhansanj et al., 2002). Durch welche Form der BER radiogene Schäden bevorzugt repariert werden, ist noch nicht vollständig geklärt, obwohl Anzeichen für die hauptsächliche Involvierung der „long patch“ BER bestehen (Vens et al., 2002)

#### **4.2.2 Warum reparieren manche Zellen schneller als andere?**

Nach Bestrahlung und 15 bzw. 45 min Reparatur zeigt sich verglichen mit der Heterogenität des Initialschadens eine signifikante Abnahme der Heterogenität des Residualschadens (*siehe Abb. 3.9, S. 35*).

Im Gegensatz dazu war nach einer zweiten Bestrahlungsfraction mit anschließender Reparatur die Residualschadensheterogenität (2x4Gy + 15 min Reparatur) verglichen mit dem Initialschaden nach zweimaliger Radiatio nicht verändert, sondern erst nach 45 min Reparatur signifikant verringert (*siehe Abb. 3.10, S.36*). Es zeigte sich also nach zweimaliger Bestrahlung und Reparatur eine deutlich vergrößerte Schadensheterogenität bzw. eine Verschiebung der Häufigkeitsverteilung der DNS-Schäden geschädigter Zellen zugunsten stärker geschädigter *sive* langsamer reparierender Zellen.

Für mehrfache Bestrahlung und Reparatur nach mehrfacher Bestrahlung war im besonderen zu beobachten, dass mittelwertkorrigierte Varianzen im Vergleich zu Referenzwerten (*siehe Abschnitt 3.4.5, S. 45*) signifikant erhöht, also Vergrößerungen der Heterogenität auch stabil gegen Änderungen des Schadensmittels waren.

Die Tatsache von ungleich schnell reparierenden Zellen kann mithilfe verschiedener Hypothesen erklärt werden.

**a)** Erstens könnten interzellulär variierende Expressions-, Aktivitätslevel von BER-Enzymen auch im Zusammenhang mit dem Zellalter ausschlaggebend sein (Buschfort et al., 1997). Insbesondere jene Enzyme, welche die Reparaturkapazität limitieren oder den bevorzugten BER-Pfad definieren, d.h. DNS-Polymerasen (Srivastava et al., 1998), (Dogliotti et al., 2001) könnten determinierende Faktoren darstellen. Allerdings scheinen viele dieser Enzyme auch in nicht-proliferierenden Zellen in großen Konzentrationen vorhanden zu sein, um Schaden durch ionisierende Strahlung zu prozessieren (Mayer et al., 2002).

Im allgemeinen ist das vorhandene Wissen zu übergeordneten BER-Regulationsmechanismen bzw. akzessorische Proteinen in menschlichen Zellen jedoch lückenhaft und auch das Zusammenspiel mit eukaryotischen Chromatinstrukturen weitgehend unbekannt (Lindahl, 2001).

**b)** Zweitens ist denkbar, dass zelluläre Unterschiede bezüglich des Desoxyribonukleotidvorrats bestehen, welche limitierend auf Reparaturprozesse wirken, wie z.B. durch Green et al. anhand der Nukleotid-Exzisions-Reparatur für stimulierte und nicht-stimulierte T-Lymphozyten nach UV-Licht-Exposition demonstriert wurde (Green et al., 1996). Jedoch ist für die BER ein solcher Regulationsmechanismus nicht belegt (Collins et al., 1995).

Im Kontext dieser Erschöpfung zellulärer Reparatursubstrate könnte die bei vielen Zellen beobachtete „Ermüdung“ der Reparatur nach zweimaliger rasch aufeinander folgender Bestrahlung erklärt werden, welche zu erhöhter Varianz (*siehe Abb. 3.11, S. 38 und Abb. 3.13, S.41*) und auch zu erhöhter mittelwertkorrigierter Varianz des Schadens (*siehe Abschnitt 3.4.5, S. 45*) führte.

**c)** Drittens könnten unterschiedliche Reparaturgeschwindigkeiten von Lymphozyten bzw. Granulozyten (Lankinen et al., 1996) u.U. basierend auf den schon genannten Faktoren zur Heterogenität des Schadens beitragen.

**d)** Viertens muss neben den bisher erwähnten Erklärungsmöglichkeiten zur interzellulären Heterogenität von Reparaturvorgängen hervorgehoben werden, dass im Rahmen der BER kurzzeitig zusätzliche Strangbrüche durch Entfernung

beschädigter Basen hervorgerufen werden, welche die Darstellung des DNS-Schadens und seiner Heterogenität im Comet-Assay nachhaltig beeinflussen können (Buschfort et al., 1997), (Olive et al., 2001). Des weiteren steht zu vermuten, dass auch nicht-quantitative Faktoren wie stoffliche Intermediate der Schadensreparatur, zur Heterogenität des Residualschadens im Comet-Assay beitragen.

Zusammenfassung: Die Reparatur von DNS-Schaden beeinflusst entscheidend die Heterogenität von Residualschaden, insbesondere nach mehrfacher Bestrahlung. Welche intrazellulären Faktoren verschiedene Reparaturkinetiken einzelner Zellen bedingen, kann nur spekuliert werden. Zusätzlich zur Reparaturkinetik und zum Reparatursubstratvorrat könnten noch andere Faktoren die Heterogenität des Residualschadens und seine Darstellung im Comet-Assay beeinflussen.

#### **4.3 Heterogenität des Basalschadens – ein Artefakt?**

Die nukleäre DNS peripherer Blutleukozyten erfährt auch in Abwesenheit von experimentell bedingten Noxen einen gewissen Grad oxidativen Schadens, den sogenannten DNS-Basalschaden. Dabei wird von Größenordnungen von mehr als 10.000 DNS-Schäden verschiedener Art pro Zelle und Tag ausgegangen (Burkart et al., 1999), obwohl deren quantitative Darstellung zwischen verschiedenen Messverfahren differiert (diskutiert in (Collins et al., 1995).

Da der Comet-Assay als besonders sensitiv für geringen DNS-Schaden angesehen wird (Singh et al., 1995), wurde innerhalb vieler Studien die Höhe des DNS-Basalschadens in peripheren Blutleukozyten bzw. Lymphozyten als Indikator für die genotoxische/genoprotektive Wirkung verschiedener Faktoren, z.B. Alter (Singh et al., 1991), Ernährung (Green et al., 1994), Rauchen (Piperakis et al., 1998), Umweltverschmutzung (Sram et al., 1998) u.a.m. gewertet.

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.4.2 (siehe Abb. 3.9, S. 35) zeigen, dass DNS-Basalschaden nach 90-minütiger Inkubation in Reparaturmedium (RPMI+FKS) eine geringere Schadensvarianz aufweist als Basalschaden ohne Inkubation in Reparaturmedium. Weiterhin ist bemerkenswert, dass auch die mittelwertkorrigierte Varianz von Basalschaden nach 90-minütiger Reparatur im Vergleich zu der nicht-reparierten Basalschadens signifikant verkleinert war (siehe 3.4.5, S. 44). Dies

impliziert im Umkehrschluss eine überproportional große Heterogenität in frisch präparierten Zellen.

Es ist folglich wahrscheinlich, dass initialer Basalschaden auch experimentell induzierte Artefakte widerspiegelt, die im Rahmen der Zellpräparation erzeugt werden, was in der Vergangenheit schon von Collins et al. berichtet wurde (Collins et al., 1995). Eine alternative Erklärungsmöglichkeit stellt eine Reduktion des im Vollblut real existenten oxidativen DNS-Schadens durch FKS dar, was wiederum implizierte, dass im Vollblut bestehender oxidativ-bedingter DNS-Schaden zum großen Teil sehr kurzlebig und somit u.U. nur von eingeschränkter biologischer Relevanz wäre.

Demzufolge erscheint es sinnvoll, zu untersuchende Zellen für kurze Zeit (z.B. 10 min) in Reparaturmedium zu inkubieren, bevor eine Auswertung des bestehenden Schadens erfolgt. Möglicherweise könnten durch diese Vorgehensweise interexperimentelle Abweichungen verkleinert und interindividuelle Schadensdifferenzen von biologisch bedeutsamem Schaden, falls vorhanden, sensitiver erfasst werden.

Alternativ bzw. ergänzend wäre es möglich, Messergebnisse unter Einbeziehung eines internen Standards (z.B. einer mehrfach vermessenen Leukozytenprobe eines Individuums) zu gewinnen, um den Einfluss interexperimenteller Variabilität auf Messdaten zu minimieren, ähnlich wie es von Elyan et al. für den Klonogenitätstest beschrieben wurde (Elyan et al., 1993).

Zusammenfassung: DNS-Basalschaden in Form von Einzelstrangbrüchen und seine Heterogenität werden durch Inkubation in 85% RPMI und 15% FKS verringert. Ob DNS-Basalschaden deshalb als z.T. experimentell bedingtes Artefakt oder wegen seiner Kurzlebigkeit als nur ungenau messbar aufgefasst werden kann, bleibt offen. Allerdings kann eine kurzzeitige Inkubation zu untersuchender Zellen vor deren Lyse hinsichtlich der biologischen Implikation des gemessenen Schadens aussagekräftiger sein, da längerfristig bestehende Schäden gemessen werden können.

#### 4.4 Praktische Implikationen

Die Detektion besonders heterogener Zellpopulationen ist von entscheidender praktischer Relevanz, da besonders heterogene Zellpopulationen in ihrer breit-gestreuten Schadensverteilung viele für die Radiosensitivität dieser Zellpopulation determinierende Zellen enthalten können, die durch reine Schadensmittelwertbetrachtungen nicht erfasst würden, z.B. kaum geschädigte Zellen in einer sonst stark geschädigten Population oder schnell reparierende Zellen in einer sonst langsam reparierenden Zellpopulation.

Die rein visuelle Analyse von Histogrammdarstellungen hat den Vorteil großer Detailtreue ist jedoch in großem Maße subjektiv.

Demgegenüber ist der statistische Vergleich von Schädigungsvarianzen einfach und objektiv durchzuführen, allerdings, wie in Abschnitt **3.4.4**, S.42, gezeigt, stark vom Schädigungsmittelwert abhängig.

Die bisher diskutierten Erkenntnisse zu den Ursachen von Heterogenität von Initial-, Residual- und Basalschaden implizieren, dass vergleichende, vom Schädigungsmittelwert unabhängige Aussagen zur Heterogenität zweier Zellpopulationen insbesondere dann getroffen werden können, wenn entweder zuerst für jede Zellpopulation eine Strahlendosis bestimmt wird, bei der beide Populationen den gleichen mittleren Schaden aufweisen und die bei diesen Dosen ermittelte Schadensheterogenität verglichen wird, oder wenn mittelwertkorrigierte Varianzen bzw. andere gegen Einflüsse des Schadensmittels stabile objektivierbare Parameter Verwendung finden.

Mittelwertkorrigierte Varianzen können insbesondere als objektive Deskriptoren beim Vergleich der Radiosensitivität von verschiedenen Zellpopulationen, z.B. Tumorzelllinien dienen, während die Interpretation von Histogrammen für die Detektion von wenigen, im Schadensgrad von einer Zellpopulation stark verschiedenen Zellen, wie sie zum Beispiel in Tumorbiopsaten anzutreffen sind, geeignet ist.

## 4.5 Zusammenfassung

Nach Vorversuchen zur Festlegung des experimentellen Aufbaus wurde untersucht, ob die im Comet-Assay (der Einzelzellgelelektrophorese) gemessene Schadensheterogenität von Blutleukozyten, also die interzellulär verschiedene Ausprägung von DNS-Schaden, durch die Faktoren a) Chromatinstruktur, b) Antioxidantien (lösliche Radikalfänger), c) einmalige Bestrahlung, d) Reparatur strahlenbedingter DNS-Schäden und e) zweimalige Bestrahlung verändert bzw. beeinflusst werden kann. Als objektivierbares Maß für Schadensheterogenität wurden Varianzen von Schädigungsmittelwerten verwendet.

### Ergebnisse:

Zu a) Nach der Entfernung von Histonproteinen durch Lyse in 1,5M NaCl und Bestrahlung mit 4 Gy war die Schadensvarianz signifikant größer als in Zellen, die vor Bestrahlung eine intakte Chromatinstruktur aufwiesen.

Zu b) Nach Zusatz des starken Radikalfängers DMSO in einer Konzentration von 90mM zu dieser Lyselösung war das Niveau der Schadensvarianz nicht signifikant verschieden von dem in intaktem Zustand bestrahlter Zellen.

Zu c) Nach Bestrahlung war die Varianz des Schädigungsmittels größer als die Varianz von DNS-Schaden unbestrahlter Proben.

Zu d) Residualschaden zeigte eine signifikant kleinere Varianz als Initialschaden bzw. initialer DNS-Basalschaden. Nach zweifacher Bestrahlung war erst nach mehr als 15 min Reparatur eine signifikant kleinere Schadensvarianz als bei Zellen mit Initialschaden zu beobachten.

Zu e) Nach zweimaliger Bestrahlung war die Schädigungsvarianz signifikant größer als die Varianz des mittleren DNS-Schadens von nur einmal bestrahlten vergleichbaren Proben.

Insgesamt zeigte sich eine hochgradige positive Korrelation von mittlerem DNS-Schaden und der Varianz dieses Schadens, weswegen als Heterogenitätsmaß auch mittelwertkorrigierte Varianzen verwendet wurden.

Hierbei zeigten nur die Faktoren Reparatur und zweifache Bestrahlung signifikante Effekte auf mittelwertkorrigierte Varianzen, andere Faktoren (Lyse vor Bestrahlung zur Entfernung von Histonproteinen +/- Antioxidantien, einfache Bestrahlung) zeigten keine Effekte auf dieses gegen Änderungen des Schädigungsmittelwertes stabile Heterogenitätsmaß.

### Diskussion/Schlussfolgerungen:

Anhand der Ergebnisse und vorhandener Literatur wurden die Ursachen der Heterogenität von 1) Initial-, 2) Residual-, und 3) Basalschaden im Comet-Assay hinterfragt.

Zu 1) Initialschadensheterogenität von Blutleukozyten im Comet-Assay ist zumindest zum großen Teil nicht Ergebnis interzellulär verschiedener Quantität des DNS-Schadens durch Differenzen der Antioxidantienkonzentration, sondern Produkt chromatinmodulierter quantitativer Schadensunterschiede bzw. der durch den DNS-Packungsgrad und vor allem den mittleren Schadensgrad beeinflussten Messbarkeit des Schadens mit dem Comet-Assay. Abschließend geklärt werden konnte nicht, ob Unterschiede des DNS-Packungsgrades bzw. der Chromatinstruktur zu einer veränderten Induktion von DNS-Schäden führten, oder ob diese Unterschiede eine veränderte Detektierbarkeit dieser Läsionen bedingen. Eine Trennung beider Effekte war experimentell nicht möglich. Weiterhin scheinen die chemische Natur des DNS-Schadens sowie Eigenschaften des interkalierenden Farbstoffs die Schadensdarstellung im Comet-Assay mitzubestimmen.

Die Heterogenität von DNS-Initialschaden einer Normalzellpopulation in ihrer Darstellung im Comet-Assay entsteht also wahrscheinlich im Wechselspiel von mittlerem Schadensgrad, DNS-/Chromatinkonformation und Eigenschaften des Verfahrens selbst.

Zu 2) Die Reparatur von DNS-Schaden beeinflusst entscheidend die Heterogenität von Residualschaden, insbesondere nach mehrfacher Bestrahlung. Welche intrazellulären Faktoren verschiedene Reparaturkinetiken einzelner Zellen bedingen, kann nur spekuliert werden. Zusätzlich zur Reparaturkinetik und zum Reparatursubstratvorrat könnten noch andere Faktoren die Heterogenität des Residualschadens und seine Darstellung im Comet-Assay beeinflussen.

Zu 3) DNS-Basalschaden in Form von Einzelstrangbrüchen und seine Heterogenität werden durch Inkubation in 85% RPMI und 15% FKS verringert. Ob DNS-Basalschaden deshalb als z.T. experimentell bedingtes Artefakt oder wegen seiner Kurzlebigkeit als nur ungenau messbar aufgefasst werden kann, bleibt offen. Allerdings kann eine kurzzeitige Inkubation zu untersuchender Zellen vor deren Lyse hinsichtlich der biologischen Implikation des gemessenen Schadens aussagekräftiger sein, da längerfristig bestehende Schäden gemessen werden können.

### Praktische Implikationen:

Vergleichende, vom Schädigungsmittelwert unabhängige Aussagen zur Heterogenität zweier Zellpopulationen insbesondere dann getroffen werden können, wenn entweder zuerst für jede Zellpopulation eine Strahlendosis bestimmt wird, bei der beide Populationen den gleichen mittleren Schaden aufweisen und die bei diesen Dosen ermittelte Schadensheterogenität verglichen wird, oder wenn mittelwertkorrigierte Varianzen bzw. andere gegen Einflüsse des Schadensmittels stabile objektivierbare Parameter Verwendung finden.

Mittelwertkorrigierte Varianzen können insbesondere als objektive Deskriptoren beim Vergleich der Radiosensitivität von verschiedenen Zellpopulationen, z.B. Tumorzelllinien dienen.

Die Interpretation von Histogrammen ist für die Detektion von wenigen, im Schadensgrad von einer Zellpopulation stark verschiedenen Zellen, wie sie zum Beispiel in Tumorbiopsaten anzutreffen sind, geeignet.

## **5 Literaturverzeichnis**

1. Anderson D, Plewa MJ: The International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 13 (1998) 67-73
2. Banath JP, Fushiki M, Olive PL: Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 73 (1998) 649-660
3. Bauer E, Recknagel RD, Fiedler U, Wollweber L, Bock C, Greulich KO: The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square ( $\chi^2$ ) not a gaussian distribution. *Mutat Res* 398 (1998) 101-110
4. Betancourt M, Ortiz R, Gonzalez C, Perez P, Cortes L: Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutat Res* 331 (1995) 65-77
5. Betti C, Davini T, Gianessi L, Loprieno N, Barale R: Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 307 (1994) 323-333
6. Bock C, Dube A, Greulich KO, Gupta PK: Identification by microscopically controlled comet assay of peritoneal macrophages in a mixture of peritoneal exudate for DNA strand break analysis. *Mutat Res* 439 (1999) 171-181
7. Burkart W, Jung T, Frasch G: Damage pattern as a function of radiation quality and other factors. *Life Sci* 322 (1999) 101-106
8. Buschfort C, Muller MR, Seeber S, Rajewsky MF, Thomale J: DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single cell level. *Cancer Res* 57 (1997) 651-658
9. Chiu SM, Xue LY, Friedman LR, Oleinick NL: Chromatin compaction and the efficiency of formation of DNA-protein crosslinks in gamma-irradiated mammalian cells. *Radiat Res* 129 (1992) 184-191
10. Collins AR: Workshop on single cell gel electrophoresis (the 'comet assay') held as part of the UKEMS/DNA Repair Network Joint Meeting, Swansea, March 1992. *Mutagenesis* 7 (1992) 357-358
11. Collins AR, Ma AG, Duthie SJ: The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 336 (1995) 69-77

12. Collins R, Raslova K, Somorovska M, Petrovska H, Ondrusova A: DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radical Biol Med* 25 (1998) 373-377
13. Cook PR, Brazell LA: Conformational constraints in nuclear DNA. *Journal of Cell Science* 22 (1976) 287-302
14. Dogliotti E, Fortini P, Pascucci B, Parlanti E: The mechanism of switching among multiple BER pathways. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68 (2001) 3-27
15. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J: Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 18 (2003) 159-166
16. Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR: Antioxidant supplementation decreases oxidative damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 56 (1996) 1291-1295
17. Elyan SA, West CM, Roberts SA, Hunter RD: Use of an internal standard in comparative measurements of the intrinsic radiosensitivities of human T-lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 64 (1993) 385-391
18. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL: The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339 (1995) 37-59
19. Fortini P, Pascucci B, Belisario F, Dogliotti E: DNA polymerase beta is required for efficient DNA strand break repair induced by methyl methanesulfonate but not by hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 3040-3046
20. Godard T, Gauduchon P, Debout C: A first step in visual identification of different cell populations by a modified alkaline comet assay. *Mutat Res* 520 (2002) 207-211
21. Green MH, Lowe JE, Waugh APW, Aldridge KE, Cole J: Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutat Res* 316 (1994) 91-102
22. Green MH, Waugh AP, Lowe JE, Harcourt SA, Clingen PH, Cole J, Arlett CF: Protective effect of deoxyribonucleosides on UV-irradiated human peripheral blood T-lymphocytes: possibilities for the selective killing of either cycling or non-cycling cells. *Mutat Res* 350 (1996) 239-246
23. Hartmann A, Niess AM, Günther-Fuchs M, Poch B, Speit G: Vitamin E prevents exercise induced DNA damage. *Mutat Res* 346 (1995) 195-202
24. Hartmann A, Pfuhrer S, Dennog C, Germdnik D, Pilger A: Exercise induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free Radical Biol Med* 24 (1998) 245-251
25. Hartmann A, Plappert U, Raddatz K, Grünert-Fuchs M, Speit G: Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9 (1994) 269-272

26. Heppner GH: Tumor heterogeneity. *Cancer Res* 44 (1984) 2259-2265
27. Heppner GH, Miller FR: The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol* 177 (1998) 1-56
28. Holley WR, Chatterjee A: Clusters of DNA induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. I. Theoretical modeling. *Radiat Res* 145 (1996) 188-199
29. Johnston PJ, MacPhail SH, Banath JP, Olive PL: Higher-order chromatin structure-dependent repair of DNA double-strand breaks: factors affecting elution of DNA from nucleoids. *Radiat Res* 149 (1998) 533-542
30. Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S: Single Cell Gel Electrophoresis Assay: A New Technique for Human Biomonitoring Studies. *Mutat Res* 363 (2000) 89-96
31. Lankinen MH, Vilpo MV, Vilpo JA: UV- and  $\gamma$ -irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human granulocytes and lymphocytes. *Mutat Res* 352 (1996) 31-38
32. Lindahl T: Keynote: past, present, and future aspects of base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68 (2001) xvii-xxxx
33. Lindahl T, Masahiko SS, Dianov G: Enzymes acting at strand interruptions in DNA. In: Lindahl, T. and West, S. C. (Hrsg): *DNA Repair and Recombination*. Chapman&Hall, London, 1994, S. 53-58
34. Ljungman M: The influence of chromatin structure on the frequency of radiation-induced DNA strand breaks: A study using nuclear and nucleoid monolayers. *Radiat Res* 126 (1991) 58-64
35. Ljungman M, Nyberg S, Nygren J, Eriksson M, Ahnström G: DNA-bound proteins contribute much more than soluble intracellular compounds to the intrinsic protection against radiation-induced DNA strand breaks in human cells. *Radiat Res* 127 (1991) 171-176
36. Mayer C, Popanda O, Zelezny O, von Brevern MC, Bach A, Bartsch H, Schmezer P: DNA repair capacity after gamma-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes. *DNA Repair (Amst)* 1 (2002) 237-250
37. McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* 288 (1993) 47-63
38. Milligan JR, Ng JY, Wu CC, Aguilera JA, Ward JF, Kow YW, Wallace SS, Cunningham RP: ethylperoxyl radicals as intermediates in the damage to DNA irradiated in aqueous dimethyl sulfoxide with gamma rays. *Radiat Res* 146 (1996) 436-443
39. Milligan JR, Ward JF: Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals. *Radiat Res* 137 (1994) 295-299

40. Müller, AC: Die Wertigkeit des Comet-Assays zur Detektion von Radioprotektion. MLU-Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 2003
41. Newman HC, Prise KM, Folkard M, Michael BD: DNA double-strand break distributions in X-ray and alpha-particle irradiated V79 cells: evidence for non-random breakage. *Int J Radiat Biol* 71 (1997) 347-363
42. Nygren J, Ljungman M, Ahnstrom G: Chromatin structure and radiation-induced DNA strand breaks in human cells: soluble scavengers and DNA-bound proteins offer a better protection against single- than double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 68 (1995) 11-18
43. Oleinick NL, Chiu SM, Friedman LR: Gamma radiation as a probe of chromatin structure: damage to and repair of active chromatin in the metaphase chromosome. *Radiat Res* 98 (1984) 629-641
44. Olive PL, Banath JP: Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. *Radiat Res* 142 (1995) 144-152
45. Olive PL, Banath JP, Durand RE: Heterogeneity in radiation -induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat Res* 122 (1990) 69-72
46. Olive PL, Banath JP, Durand RE: Detection of subpopulations resistant to DNA-damaging agents in spheroids and murine tumours. *Mutat Res* 375 (1997) 157-165
47. Olive PL, Banath JP, Fjell CD: DNA strand breakage and DNA structure influence staining with propidium iodide using the alkaline comet assay. *Cytometry* 16 (1994a) 305-312
48. Olive PL, Banath JP, MacPhail HS: Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Res* 54 (1994b) 3939-3946
49. Olive PL, Durand RE: Detection of hypoxic cells in a murine tumor with the use of the comet assay. *J Natl Cancer Inst* 84 (1992) 707-711
50. Olive PL, Durand RE, Banath JP, Johnston PJ: Analysis of DNA damage in individual cells. *Methods Cell Biol* 64 (2001) 235-249
51. Olive PL, Wlodek D, Banath JP: DNA Double-Strand Breaks Measured in Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Cancer Res* 51 (1991) 4671-4676
52. Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banath JP: Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res* 198 (1992) 259-267

53. Östling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damage in Individual Mammalian Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123 (1984) 291-298
54. Östling O, Johanson KJ, Blomquist E, Hagelqvist E: DNA damage in Clinical Radiation Therapy Studied by Microelectrophoresis in Single Tumour Cells. A Preliminary Report. *Acta Oncol* 26 (1987) 45-48
55. Piperakis SM, Visvardis EE, Sagnou M, Tassiou AM: Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis* 19 (1998) 695-698
56. Roots R, Okada S: Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiat Res* 64 (1975) 306-320
57. Rydberg B: Clusters of DNA damage induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. II. Experimental detection. *Radiat Res* 145 (1996) 200-209
58. Rydberg B, Johanssen KJ: Estimation of DNA strand breaks in single-mammalian cells. in P C Hannawald, E C Friedberg, and C F Fox (Eds ), *DNA Repair Mechanisms*, Academic Press, New York (1978) 465-468
59. Schwartz JL, Vaughan AT: Association among DNA/chromosome break rejoining rates, chromatin structure alterations, and radiation sensitivity in human tumor cell lines. *Cancer Res* 49 (1989) 5054-5057
60. Singh NP: Microgels for Estimation of DNA Strand Breaks, DNA Protein Crosslinks and Apoptosis. *Mutat Res* 455 (2000) 111-127
61. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JD, Brant LJ, Morrell CH, Schneider EL: Basal damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res* 256 (1991) 1-6
62. Singh NP, Graham MM, Singh V, Khan A: Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of gamma-rays. *Int J Radiat Biol* 68 (1995) 563-569
63. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for Quantitation of Low Levels of DNA damage in Individual Cells. *Exp Cell Res* 175 (1988) 184-191
64. Sokhansanj BA, Rodrigue GR, Fitch JP, Wilson DM: A quantitative model of human DNA base excision repair. I. Mechanistic insights. *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 1817-1825
65. Sram J, Podrazilova K, Dejmek J, Mrackova G, Pilcik T: Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. *Mutagenesis* 13 (1998) 99-103

66. Srivastava DK, Berg BJ, Prasad R, Molina JT, Beard WA, Tomkinson AE, Wilson SH: Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J Biol Chem* 273 (1998) 21203-21209
67. Tice RR, Strauss GH: The Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay: a potential Tool for Detecting Radiation induced DNA Damage in Humans. *Stem Cells* 13 Suppl 1 (1995) 207-214
68. Vens C, Dahmen-Mooren E, Verwijs-Janssen M, Blyweert W, Graversen L, Bartelink H, Begg AC: The role of DNA polymerase beta in determining sensitivity to ionizing radiation in human tumor cells. *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 2995-3004
69. Vijayalaxmi, Tice RR, Strauss GH: Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 271 (1992) 243-252
70. Wallace SS: Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res* 150 (1998) S60-S79
71. Ward JF: Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl* 8 (1985) S103-S111
72. Warters RL, Lyons BW: Variation in radiation-induced formation of DNA double-strand breaks as a function of chromatin structure. *Radiat Res* 130 (1992) 309-318
73. Woudstra EC, Roesink JM, Rosemann M, Brunsting JF, Driessen C, Orta T, Konings AW, Peacock JH, Kampinga HH: Chromatin structure and cellular radiosensitivity: a comparison of two human tumour cell lines. *Int J Radiat Biol* 70 (1996) 693-703
74. Xue LY, Friedman LR, Oleinick NL, Chiu SM: Induction of DNA damage in gamma-irradiated nuclei stripped of nuclear protein classes: differential modulation of double-strand break and DNA-protein crosslink formation. *Int J Radiat Biol* 66 (1994) 11-21
75. Yendle JE, Tinwell H, Elliott BM, Ashby J: The genetic toxicity of time: Importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 375 (1997) 125-136

## 6 Anhang

### 6.1 Materialien

**Tabelle 6.1.1 Lösungen/Reagenzien**

Lösung	Menge/Konzentration	Reagenzien	Firma	Chargen- Nummer	
<b>EDTA-Lösung</b> (in 200 ml A.dest)	<b>0,2M</b> (14.89g/200ml A.dest)	EDTA	Sigma	29H001715	
<b>NaOH-Lösung</b> (in 1000 ml A. dest)	<b>10M</b> (400g/1000ml A.dest)	NaOH-Plätzchen	Merck	B966798149	
<b>Elektrophorese- Puffer</b> pH>13,4 pH	<b>2mM</b> EDTA (=10 ml 0,2M EDTA-Lösung/1l A.dest) .	s.o.			
	<b>0,6M</b> NaOH (≈ 60 ml 10M NaOH-Lösung/1l A.dest)	s.o.			
<b>Neutralisations- lösung</b> pH=7.5	<b>0,4M</b> (=48.5g/1l A.dest)	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	Merck	K26836782	
	ca. 49 ml 1M HCl zur pH-Wert Einstellung	Tritisol	Merck	0C290068	
<b>Lyse-Stammlösung</b> pH=10	<b>2,5M</b> (=146.1g/1l A. dest)	NaCl	Roth	45256301	
	<b>100mM</b> (=37,2g/1l A. dest)	EDTA	Sigma	29H001715	
	<b>10mM</b> (=1.2g/1l A.dest)	Tris(hydroxymethyl) aminomethan	Merck	K26836782	
	<b>188mM</b> (=7.5g/1l A. dest)	NaOH-Plätzchen	Merck	B966798149	
	ca. 1 ml 10 M NaOH-Lösung zur pH-Wert Einstellung				
<b>Lyse- Gebrauchslösung</b>	2.5ml ad 250 ml <i>Lyse-Stammlösung</i> = <b>1%</b>	Triton X-100	Sigma	T-8787	
	25ml ad 250 ml <i>Lyse-Stammlösung</i> ≈ <b>90mM</b>	Dimethylsulfoxid	Merck	1.02952.1000	
<b>Fluoreszenz- farbstoff-Lösung</b>	10 mg (ad 10 ml A.dest)	Propidium Iodid	Sigma	042K3655	
<b>Reparaturmedium</b>	15 ml	FKS (Fötales Kälberserum)	Biochrom AG	277EE	
	85 ml	RPMI 1640 Mit 25mM Hapes mit L-Glutamin	Bio Whittaker Europe	2MB0221	
<b>Agarose- Gele</b>	1 %	1 g	Agarose	Gibco BRL	66G1371
		(ad 100 ml PBS)	PBS DULBECCO'S	Gibco	3073094
	0.6 %	0.6 g	Agarose	Gibco BRL	66G1371
		(ad 100 ml PBS)	PBS DULBECCO'S	Gibco	3073094
	0.5 % LMP	0.5 g	LMP-Agarose	Gibco BRL	97D1664
(ad 100 ml PBS)		PBS DULBECCO'S	Gibco	3073094	

**Tabelle 6.1.2 Geräte/Hilfsmittel**

Versuchsteil	Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
<b>Bestrahlung</b>	Röntgentiefentherapieanlage	Phillips	RT 250
	2 Piacrylplatten (je 1 cm dick)	Strahlenphysik MLU-Halle	
<b>Reparatur</b>	Brutschrank	Memmert	BE 200
<b>Elektrophorese</b>	Elektrophoresegerät	Biotec-Fisher	Phero-Stab 550
	Elektrophoresekammer	Biotec Fisher	
<b>Auswertung</b>	Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera	Zeiss	Axiolab
<b>Vorbereitung von Lösungen</b>	pH-Meter	WTW	pH 562
	Rührer/Heizplatte	Heidolph	MR-3001
	Feinwaage	OWA Labor	
	Automatische Pipette	Hirschmann	pipetus-akku

**Tabelle 6.1.3 Verbrauchsmaterialien**

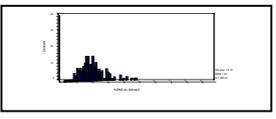
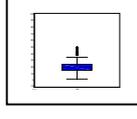
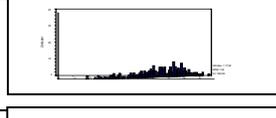
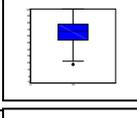
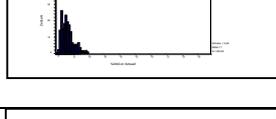
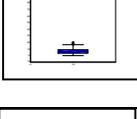
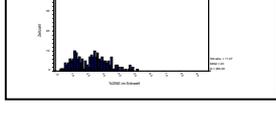
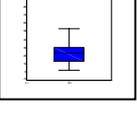
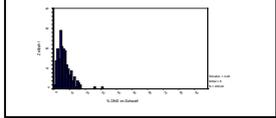
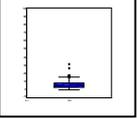
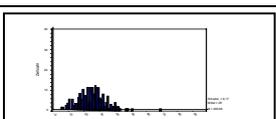
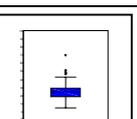
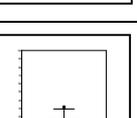
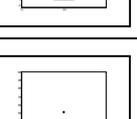
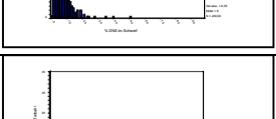
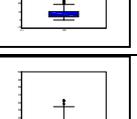
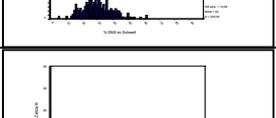
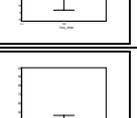
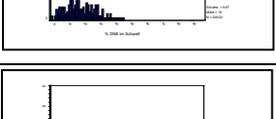
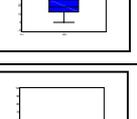
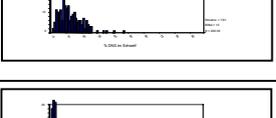
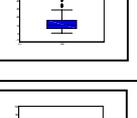
Bezeichnung	Hersteller	Chargennummer
Objektträger, „fully frosted slides“, 3“ x 1“, ca. 1,2 mm dick	Labcraft	1219 95
Deckgläschen, 24 x 60 mm	Menzel	212.3882
Röhrchen (1 ml und 2 ml)	Eppendorf	-
Röhrchen (15 ml)	Sarstedt	22249410
Einweg-Pipetten Sterilin 10 ml	Bibby Sterilin	245418
Pipettenspitzen		
- EpT.I.P.S 2-200 µl	Eppendorf	02108851
- EpT.I.P.S 100 – 1000 µl	Eppendorf	-

## 6.2 Ergebnisse

**Tabelle 6.2.1 Ergebnisse von Vorversuchen**

Untersuchte Größe	Vergleich des Schädigungsmittelwertes aus je * Zellen folgender Proben:				Ergebnis	
					F-Wert	p-Wert
Lyse mit - Johne Na- Lauryl - Sarkosinat  *je 100 Zellen	0 Gy + Lyse o. Sarkosinat		0 Gy + Lyse m. Sarkosinat			
	Mw=11,63	s=6,31	Mw=12,93	s=7,84	1,67	0,198
	2 Gy + Lyse o. Sarkosinat		2 Gy + Lyse m. Sarkosinat			
	Mw=20,63	s=8,12	Mw=19,38	s=7,18	1,34	0,249
	4 Gy + Lyse o. Sarkosinat		4 Gy + Lyse m. Sarkosinat			
	Mw=26,96	s=9,07	Mw=30,42	s=10,29	6,386	0,012
	6 Gy + Lyse o. Sarkosinat		6 Gy + Lyse m. Sarkosinat			
	Mw=35,34	s=9,65	Mw=36,48	s=11,52	0,572	0,450
8 Gy + Lyse o. Sarkosinat		8 Gy + Lyse m. Sarkosinat				
	Mw=46,76	s=12,19	Mw=48,78	s=13,97	1,185	0,278
Diskrimi- nations- fähigkeit des Comet- Assay  *je 200 Zellen	0 Gy		0 Gy + 2 Gy			
	Mw=6,24	s=7,57	Mw=9,7	s=6,52	24,03	<0,001
	0 Gy + 2 Gy		2 Gy			
	Mw=9,7	s=6,52	Mw=15,47	s=6,87	74,31	<0,001
	2 Gy		2 Gy + 4 Gy			
	Mw=15,47	s=6,87	Mw=16,9	s=8,85	3,220	0,073
	2 Gy + 4 Gy		4 Gy			
	Mw=16,9	s=8,85	Mw=20,73	s=8,1	20,36	<0,001
	4 Gy		4 Gy + 8 Gy			
	Mw=20,73	s=8,1	Mw=30,1	s=12,32	80,78	<0,001
4 Gy + 8 Gy		8 Gy				
	Mw=30,1	s=12,32	Mw=43,14	s=14,38	94,78	<0,001
Reparatur- zeit  *je 50 Zellen	0 Gy + 0 min		0 Gy + 10 min			
	Mw=4,22	s=3,15	Mw=2,47	s=2,2	11,68	0,001
	0 Gy + 0 min		0 Gy + 60 min			
	Mw=4,22	s=3,15	Mw=1,66	s=1,91	24,125	<0,001
	0 Gy + 0 min		0 Gy + 24 h			
	Mw=4,22	s=3,15	Mw=30,18	s=13,25	181,73	<0,001
	2 Gy + 0 min		2 Gy + 10 min			
	Mw=14,93	s=5,52	Mw=4,73	s=5,32	57,490	<0,001
	2 Gy + 0 min		2 Gy + 60 min			
	Mw=14,93	s=5,52	Mw=3,71	s=3,1	156,776	<0,001
2 Gy + 0 min		2 Gy + 24 h				
	Mw=14,93	s=5,52	Mw=31,18	s=16,51	43,54	<0,001
Lysedauer nach Bestrahlung  *je 50 Zellen	0 Gy + 3 h Lyse		0 Gy + 3 h 45 min Lyse			
	Mw=3,1	s=5,81	Mw=8,06	s=14,26	2,86	0,094
	0 Gy + 3 h Lyse		0 Gy + 4 h 30 min Lyse			
	Mw=3,1	s=5,81	Mw=7,33	s=8,74	3,42	0,067
	4 Gy + 3 h Lyse		4 Gy + 3 h 45 min Lyse			
	Mw=25,91	s=9,71	Mw=24,31	s=7,51	0,852	0,358
4 Gy + 3 h Lyse		4 Gy + 4 h 30 min Lyse				
	Mw=25,91	s=9,71	Mw=26,31	s=11,89	0,034	0,85
Lysedauer vor Bestrahlung *je 50 Zellen	15 min Lyse in 1,5M NaCl/1% Triton-X + 0 Gy		60 min Lyse in 1,5M NaCl/1% Triton-X + 0 Gy			
	Mw=17,69	s=7,71	Mw=16,68	s=7,82	0,428	0,514
	15 min Lyse in 1,5M NaCl/1% Triton-X+ 4 Gy		60 min Lyse in 1,5M NaCl/1% Triton-X+ 4 Gy			
	Mw=50,97	s=11,97	Mw=62,93	s=13,40	22,162	<0,001

## 6.2.2 Datenmatrices aller Probanden

Kennummer des Probanden: 1					Pro Probe 200 Zellen		
OT	Bezeichnung	Var	Mw	Histogramm	Var/Mw	Med	Boxplot
1-0	60 min Lyse in NaCl/Triton-X + 0 Gy	<b>65,62</b>	20,19		<b>3,25</b>	19,14	
1-1	60 min Lyse in NaCl/Triton-X + 4 Gy	<b>306,96</b>	64,44		<b>4,76</b>	66,63	
1-2	60 min Lyse in NaCl/Triton-X/DMSO + 0 Gy	<b>16,45</b>	6,56		<b>2,57</b>	5,84	
1-3	60 min Lyse in NaCl/Triton-X/DMSO + 4 Gy	<b>122,60</b>	23,02		<b>5,33</b>	23,37	
2-0	0 Gy	<b>20,16</b>	5,91		<b>3,41</b>	4,98	
2-1	4 Gy	<b>84,09</b>	24,90		<b>3,38</b>	24,68	
2-2	4 Gy + 15 min Rep	<b>46,65</b>	11,45		<b>4,07</b>	10,73	
2-3	4 Gy + 45 min Rep	<b>42,90</b>	7,75		<b>5,54</b>	6,33	
3-1	4 Gy + 4 Gy	<b>101,61</b>	30,05		<b>3,38</b>	28,95	
3-2	4 Gy + 4 Gy + 15 min Rep.	<b>99,40</b>	19,11		<b>5,20</b>	17,63	
3-3	4 Gy + 4 Gy + 45 min Rep	<b>57,91</b>	12,02		<b>4,82</b>	10,50	
4-0	0 Gy + 90 min Rep.	<b>9,80</b>	3,16		<b>3,10</b>	2,45	

Kennnummer des Probanden: 2					Pro Probe 200 Zellen		
OT	Bezeichnung	Var	Mw	Histogramm	Var/Mw	Med	Boxplot
1-0	60 min Lyse in NaCl/Triton-X + 0 Gy	144,55	24,39		5,93	22,15	
1-1	60 min Lyse in NaCl/Triton-X + 4 Gy	424,71	62,09		6,84	63,19	
1-2	60 min Lyse in NaCl/Triton-X/DMSO + 0 Gy	37,52	6,68		5,62	5,56	
1-3	60 min Lyse in NaCl/Triton-X/DMSO + 4 Gy	88,39	31,20		2,83	31,22	
2-0	0 Gy	41,09	5,56		7,39	3,80	
2-1	4 Gy	73,96	28,56		2,59	28,11	
2-2	4 Gy + 15 min Rep	52,56	12,22		4,30	11,70	
2-3	4 Gy + 45 min Rep	29,92	7,89		3,79	7,10	
3-1	4 Gy + 4 Gy	124,55	29,58		4,21	29,65	
3-2	4 Gy + 4 Gy + 15 min Rep.	124,10	19,16		6,48	17,05	
3-3	4 Gy + 4 Gy + 45 min Rep	57,30	11,45		5,00	10,79	
4-0	0 Gy + 90 min Rep.	6,81	2,80		2,43	2,15	

Kennnummer des Probanden: 3					Pro Probe 200 Zellen		
OT	Bezeichnung	Var	Mw	Histogramm	Var/Mw	Med	Boxplot
1-0	60 min Lyse in NaCl/Triton-X + 0 Gy	55,72	16,66		3,34	15,57	
1-1	60 min Lyse in NaCl/Triton-X + 4 Gy	261,28	57,45		4,55	58,70	
1-2	60 min Lyse in NaCl/Triton-X/DMSO + 0 Gy	17,30	6,19		2,79	5,58	
1-3	60 min Lyse in NaCl/Triton-X/DMSO + 4 Gy	117,49	34,51		3,40	34,35	
2-0	0 Gy	38,81	4,60		8,44	3,04	
2-1	4 Gy	114,92	25,95		4,43	24,30	
2-2	4 Gy + 15 min Rep	59,91	12,83		4,67	11,32	
2-3	4 Gy + 45 min Rep	25,40	6,61		3,84	5,84	
3-1	4 Gy + 4 Gy	141,37	31,94		4,43	30,44	
3-2	4 Gy + 4 Gy + 15 min Rep.	146,65	21,39		6,85	19,91	
3-3	4 Gy + 4 Gy + 45 min Rep	56,10	9,79		5,73	8,40	
4-0	0 Gy + 90 min Rep.	2,88	9,86		1,79	3,42	

Kennnummer des Probanden: 4					Pro Probe 200 Zellen		
OT	Bezeichnung	Var	Mw	Histogramm	Var/Mw	Med	Boxplot
1-0	60 min Lyse in NaCl/Triton-X + 0 Gy	<b>52,65</b>	12,38		<b>4,25</b>	12,01	
1-1	60 min Lyse in NaCl/Triton-X + 4 Gy	<b>207,37</b>	61,83		<b>3,35</b>	62,41	
1-2	60 min Lyse in NaCl/Triton-X/DMSO + 0 Gy	<b>19,86</b>	6,82		<b>2,91</b>	6,38	
1-3	60 min Lyse in NaCl/Triton-X/DMSO + 4 Gy	<b>79,81</b>	37,96		<b>2,10</b>	37,41	
2-0	0 Gy	<b>105,47</b>	7,45		<b>14,16</b>	4,88	
2-1	4 Gy	<b>107,12</b>	25,91		<b>4,13</b>	25,45	
2-2	4 Gy + 15 min Rep	<b>46,24</b>	11,11		<b>4,16</b>	10,07	
2-3	4 Gy + 45 min Rep	<b>21,16</b>	6,13		<b>3,45</b>	5,97	
3-1	4 Gy + 4 Gy	<b>118,37</b>	25,88		<b>4,57</b>	25,54	
3-2	4 Gy + 4 Gy + 15 min Rep.	<b>121,44</b>	19,92		<b>6,09</b>	18,26	
3-3	4 Gy + 4 Gy + 45 min Rep	<b>90,63</b>	15,54		<b>5,83</b>	14,24	
4-0	0 Gy + 90 min Rep.	<b>3,62</b>	7,34		<b>3,31</b>	2,03	

Kennnummer des Probanden: 5					Pro Probe 200 Zellen		
OT	Bezeichnung	Var	Mw	Histogramm	Var/Mw	Med	Boxplot
1-0	60 min Lyse in NaCl/Triton-X + 0 Gy	<b>100,51</b>	17,31		<b>5,81</b>	16,75	
1-1	60 min Lyse in NaCl/Triton-X + 4 Gy	<b>219,79</b>	60,54		<b>3,63</b>	60,86	
1-2	60 min Lyse in NaCl/Triton-X/DMSO + 0 Gy	<b>24,02</b>	7,83		<b>3,07</b>	6,92	
1-3	60 min Lyse in NaCl/Triton-X/DMSO + 4 Gy	<b>121,77</b>	34,83		<b>3,50</b>	34,40	
2-0	0 Gy	<b>32,60</b>	5,89		<b>5,53</b>	4,12	
2-1	4 Gy	<b>52,56</b>	27,17		<b>1,93</b>	27,04	
2-2	4 Gy + 15 min Rep	<b>39,44</b>	10,99		<b>3,59</b>	10,56	
2-3	4 Gy + 45 min Rep	<b>40,20</b>	8,89		<b>4,52</b>	8,14	
3-1	4 Gy + 4 Gy	<b>116,64</b>	29,27		<b>3,98</b>	29,18	
3-2	4 Gy + 4 Gy + 15 min Rep.	<b>200,22</b>	20,95		<b>9,56</b>	16,97	
3-3	4 Gy + 4 Gy + 45 min Rep	<b>76,39</b>	12,90		<b>5,92</b>	11,02	
4-0	0 Gy + 90 min Rep.	<b>2,38</b>	5,02		<b>1,67</b>	2,11	

**Tabelle 6.2.3 Ergebnisse zur Heterogenität/Varianzvergleich**

Einflussfaktor	Vergleich der aus n=5 Probanden gewonnenen Varianzmittelwerte folgender Proben				Ergebnis	
					F-Wert	p-Wert
<b>Histonprot.</b> = Lyse in 1,5M NaCl / 1% Triton-X vor Bestrahlung	0 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X vor 0 Gy			
	Mw=47,63	KI=82,80	Mw=83,81	KI=96,65	2,493	0,153
	4 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X vor 4 Gy			
	Mw=86,53	KI=62,67	Mw=284,02	KI=218,05	23,365	0,001
<b>Antiox. Substanzen</b> = Lyse in 1,5M NaCl/1% Triton-X + 90 mM DMSO vor Bestrahlung	Lyse in NaCl/Triton-X vor 0 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 0 Gy			
	Mw=83,81	KI=96,65	Mw=23,03	KI=21,40	11,624	0,009
	Lyse in NaCl/Triton-X vor 4 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 4 Gy			
	Mw=284,02	KI=218,05	Mw=106,01	KI=50,47	9,506	0,002
	0 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 0 Gy			
	Mw=47,63	KI=82,80	Mw=23,03	KI=21,40	2,551	0,149
	4 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 4 Gy			
Mw=86,53	KI=62,67	Mw=106,01	KI=50,47	1,807	0,216	
<b>Bestrahlung mit 4 Gy</b>	0 Gy		4 Gy			
	Mw=47,626	KI=82,8	Mw=86,53	KI=62,68	4,328	0,071
	0 Gy + 90 min Reparatur		4 Gy			
	Mw=7,766	KI=5,14	Mw=86,53	KI=62,68	48,372	<0,001
	Lyse in NaCl/Triton-X vor 0 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X vor 4 Gy			
	Mw=83,81	KI=96,65	Mw=284,02	KI=218,05	21,728	0,002
	Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 0 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 4 Gy			
Mw=23,03	KI=21,40	Mw=106,01	KI=50,47	70,647	<0,001	
<b>Rep. nach Bestrahlung mit 4 Gy und Rep. des Basalschadens</b>	4 Gy		4 Gy + 15 min Reparatur			
	Mw=86,53	KI=62,68	Mw=48,96	KI=19,08	10,140	0,013
	4 Gy		4 Gy + 45 min Reparatur			
	Mw=86,53	KI=62,68	Mw=31,92	KI=23,38	20,575	0,002
	4 Gy + 15 min Reparatur		4 Gy + 45 min Reparatur			
	Mw=48,96	KI=19,08	Mw=31,92	KI=23,38	9,887	0,014
	0 Gy		0 Gy + 90 min Reparatur			
Mw=47,626	KI=82,8	Mw=7,766	KI=5,14	7,119	0,028	
<b>Reparatur nach 2x4 Gy</b>	2x4 Gy		2x4 Gy + 15 min Reparatur			
	Mw=120,51	KI=35,74	Mw=138,36	KI=95,40	0,947	0,359
	2x4 Gy		2x4 Gy + 45 min Reparatur			
	Mw=120,51	KI=35,74	Mw=67,67	KI=38,07	31,585	<0,001
	2x4 Gy + 15 min Reparatur		2x4 Gy + 45 min Reparatur			
Mw=138,36	KI=95,40	Mw=67,67	KI=38,07	14,608	0,005	
<b>Bestrahlung mit 2x4 Gy</b>	4 Gy		2x4 Gy			
	Mw=86,53	KI=62,68	Mw=120,51	KI=35,74	6,839	0,031
	4 Gy + 15 min Reparatur		2x4 Gy + 15 min Reparatur			
	Mw=48,96	KI=19,08	Mw=138,36	KI=95,40	26,039	0,001
	4 Gy + 45 min Reparatur		2x4 Gy + 45 min Reparatur			
Mw=31,92	KI=23,38	Mw=67,67	KI=38,07	19,795	0,002	

**Tabelle 6.2.4 Vergleich mittelwertkorrigierter Varianzen**

Einflussfaktor	Vergleich der aus n=5 Probanden gewonnenen mittelwertkorrigierten Varianzen (Var. des Schadensmittelwertes/Schadensmittelwert)				Ergebnis	
					F-Wert	p-Wert
<b>Histonprot.</b> = Lyse in 1,5M NaCl / 1% Triton X vor Bestrahlung	0 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X vor 0 Gy			
	Var/Mw=7,79	KI=10,05	Var/Mw=4,52	KI=3,22	2,963	0,124
	4 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X vor 4 Gy			
	Var/Mw=3,29	KI=2,59	Var/Mw=4,63	KI=3,41	2,991	0,122
<b>Antiox. Substanzen</b> = Lyse in 1,5M NaCl/1% Triton-X + 90 mM DMSO vor Bestrahlung	Lyse in NaCl/Triton-X vor 0 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 0 Gy			
	Var/Mw=4,52	KI=3,22	Var/Mw=3,38	KI=3,15	1,96	0,199
	Lyse in NaCl/Triton-X vor 4 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 4 Gy			
	Var/Mw=4,63	KI=3,41	Var/Mw=3,43	KI=2,98	2,145	0,181
	0 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 0 Gy			
	Var/Mw=7,79	KI=10,05	Var/Mw=3,38	KI=3,15	5,401	0,049
	4 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 4 Gy			
	Var/Mw=3,29	KI=2,59	Var/Mw=3,43	KI=2,98	0,39	0,849
<b>Bestrahlung mit 4 Gy</b>	0 Gy		4 Gy			
	Var/Mw=7,79	KI=10,05	Var/Mw=3,29	KI=2,59	5,786	0,043
	0 Gy + 90 min		4 Gy			
	Var/Mw=2,62	KI=1,53	Var/Mw=3,29	KI=2,59	1,548	0,249
	Lyse in NaCl/Triton-X vor 0 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X vor 4 Gy			
	Var/Mw=4,52	KI=3,22	Var/Mw=4,63	KI=3,41	0,17	0,9
	Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 0 Gy		Lyse in NaCl/Triton-X + DMSO vor 4 Gy			
	Var/Mw=3,38	KI=3,15	Var/Mw=3,43	KI=2,98	0,004	0,949
<b>Rep. nach Bestrahlung mit 4 Gy/ Rep. des Basal- schadens</b>	4 Gy		4 Gy + 15 min Reparatur			
	Var/Mw=3,29	KI=2,59	Var/Mw=4,16	KI=0,97	3,024	0,12
	4 Gy		4 Gy + 45 min Reparatur			
	Var/Mw=3,29	KI=2,59	Var/Mw=4,23	KI=2,06	2,465	0,155
	4 Gy + 15 min Reparatur		4 Gy + 45 min Reparatur			
	Var/Mw=4,16	KI=0,97	Var/Mw=4,23	KI=2,06	0,29	0,869
0 Gy		0 Gy + 90 min Reparatur				
Var/Mw=7,79	KI=10,05	Var/Mw=2,62	KI=1,53	7,977	0,022	
<b>Reparatur nach 2x4 Gy</b>	2x4 Gy		2x4 Gy + 15 min Reparatur			
	Var/Mw=4,11	KI=1,16	Var/Mw=6,84	KI=4,08	12,716	0,007
	2x4 Gy		2x4 Gy + 45 min Reparatur			
	Var/Mw=4,11	KI=1,16	Var/Mw=5,46	KI=1,27	18,908	0,002
2x4 Gy + 15 min Reparatur		2x4 Gy + 45 min Reparatur				
Var/Mw=6,84	KI=4,08	Var/Mw=5,46	KI=1,27	3,203	0,111	
<b>Bestrahlung mit 2x4 Gy</b>	4 Gy		2x4 Gy			
	Var/Mw=3,29	KI=2,59	Var/Mw=4,11	KI=1,16	2,586	0,147
	4 Gy + 15 min Reparatur		2x4 Gy + 15 min Reparatur			
	Var/Mw=4,16	KI=0,97	Var/Mw=6,84	KI=4,08	12,59	0,008
	4 Gy + 45 min Reparatur		2x4 Gy + 45 min Reparatur			
Var/Mw=4,23	KI=2,06	Var/Mw=5,46	KI=1,27	7,995	0,022	

## 7 Thesen

1. Schadensheterogenität ist mit dem Comet-Assay diskriminierbar.
2. Zum objektivierbaren Vergleich von Schadensheterogenität sind Parameter wie die Varianz des Schädigungsmittelwertes und die mittelwertkorrigierte Schadensvarianz geeignet.
3. Die Varianz des Schadensmittelwertes kann als Heterogenitätsmaß durch die Faktoren Chromatinstruktur/Histongehalt, Lyse vor Bestrahlung mit Antioxidantien, ein- und mehrmalige Röntgenbestrahlung und Reparatur strahlenbedingter DNS-Schäden verändert werden.
4. Die Varianz des Schädigungsmittelwertes ist mit dem Schädigungsmittelwert positiv korreliert.
5. Die mittelwertkorrigierte Varianz (Varianz des Schadensmittelwertes/ Mittelwert dieses Schadens) ist ein besseres Maß für Änderungen der Heterogenität, da sie unabhängig von Änderungen des Schadensmittels ist.
6. Die mittelwertkorrigierte Varianz kann durch Reparatur strahlenbedingter DNS-Schäden und mehrmalige Bestrahlung verändert werden.
7. Histongehalt, Lyse vor Bestrahlung mit Antioxidantien und einmalige Bestrahlung haben keinen signifikanten Effekt auf mittelwertkorrigierte Varianzen.
8. Die Heterogenität von DNS-Initialschaden einer Normalzellpopulation im Comet-Assay ist zum großen Teil nicht Ergebnis interzellulär verschiedener Quantität des DNS-Schadens durch Differenzen der Antioxidantienkonzentration.
9. Initialschadensheterogenität einer Normalzellpopulation ist Produkt chromatinmodulierter quantitativer Schadensunterschiede, bzw. der durch den DNS-Packungsgrad und vor allem den mittleren Schadensgrad beeinflussten Messbarkeit des Schadens mit dem Comet-Assay.

10. Initialschadensheterogenität reflektiert neben quantitativen interzellulären Unterschieden auch qualitative interzelluläre Unterschiede des vorhandenen Schadens.
11. Die Reparatur von DNS-Schaden beeinflusst entscheidend die Heterogenität von Residualschaden, insbesondere nach mehrfacher Bestrahlung.
12. Eine kurzzeitige Inkubation zu untersuchender Zellen vor deren Lyse kann eine aussagekräftigere Interpretation von Basalschaden ermöglichen als die Interpretation von nicht-inkubiertem Basalschaden, da länger bestehende Schäden von größerer biologischer Bedeutung gemessen würden.
13. Vergleichende Aussagen zur Heterogenität zweier Zellpopulationen können insbesondere dann getroffen werden, wenn zuerst für jede Zellpopulation eine Strahlendosis bestimmt wird, bei der beide Populationen den gleichen mittleren Schaden aufweisen und die bei diesen Dosen ermittelte Schadensheterogenität verglichen wird.
14. Alternativ können gegen Einflüsse des Schadensmittels stabile objektivierbare Parameter Verwendung finden, z.B. die mittelwertkorrigierte Varianz.
15. Mittelwertkorrigierte Varianzen können insbesondere als objektive Deskriptoren beim Vergleich der Radiosensitivität von verschiedenen Zellpopulationen, z.B. Tumorzelllinien, dienen.
16. Die Interpretation von Histogrammen ist für die Detektion von wenigen, im Schadensgrad von einer Zellpopulation stark verschiedenen Zellen, wie sie zum Beispiel in Tumorbiopsaten anzutreffen sind, geeignet.

## Clemens Seidel



<b>Adresse:</b>	Talstraße 25, 06120 Halle	
<b>Geburtsdatum:</b>	05. Februar 1979	
<b>Geburtsort:</b>	Halle	
<b>Familienstand:</b>	ledig	
<b>Ausbildung:</b>	1991 – 1997 Georg-Cantor-Gymnasium Halle, Abitur: Gesamtnote: „Sehr Gut“	
Seit 1998	Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,	
2000	Physikum: Gesamtnote: „Sehr Gut“	
2002	1. Staatsexamen: Gesamtnote: „Gut“	
2004	2. Staatsexamen: Gesamtnote: „Sehr gut“	
2000 – 2001	Gaststudent am University of Manchester Institute of Science and Technology (UMIST), 2. Studienjahr Biochemie Abschluss: Gesamtnote: „Pass with Distinction“	
<b>Praxiserfahrung:</b>		
1997 – 1998	Zivildienst als Krankenpfleger - Universitätsklinik	Halle
1999 – 2003	Studentische Hilfskraft - Diakoniekrankenhaus	Halle
<b>Famulaturen:</b>		
4 Wochen	Innere Medizin - Christies Hospital	Manchester
4 Wochen	Innere Medizin - Praxis Dr. med. H. Jahny	Querfurt
3 Wochen	Chirurgie - Klinik f. Allgemeinchirurgie	Quedlinburg
3 Wochen	Anästhesie - Universitätsklinik f. Anästhesie	Halle
2 Wochen	Neurologie - Universitätsklinik f. Neurologie	Halle
2 Wochen	Psychiatrie - Universitätsklinik f. Psychiatrie	Halle
<b>Praktisches Jahr:</b>		
10/2004 – 01/2005	Innere Medizin - Martha-Maria-Krankenhaus	Halle
02/2005 – 05/2005	Neurologie - Universitätsklinik f. Neurologie	Halle
<i>Geplant für</i>		
05/2005 – 09/2005	Chirurgie - Martha-Maria-Krankenhaus	Halle
09/2005 – 11/2005	Neurologie - Western General Hospital	Edinburgh
<b>Promotion:</b>		
Beginn 01/03	„Interzelluläre Heterogenität strahleninduzierten DNS-Schadens“,	
Endkorrektur 05/05	Klinik f. Strahlentherapie, MLU-Halle Wittenberg	
<b>Nebentätigkeiten:</b>		
1999-2001	Ehrenamtliche Tätigkeit im deutschen Famulantenaustausch (dfa)	
2001-2004	Fachübersetzer Medizin	PrimeAd Group Buch b. Ulm
2002-2004	Lokalredakteur Via medici online	Thieme-Verlag Stuttgart
<b>Hobbys:</b>	Radsport, Chorgesang	

## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit ausschließlich von mir und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Bei dieser Dissertation fanden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung. Stellen, die anderen Arbeiten wortlich oder inhaltlich entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Clemens Seidel

Halle (Saale), den 22.06.05

## Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, dass ich außer dieser Arbeit keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Clemens Seidel

Halle (Saale), den 22.06.05

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dunst, der sich Zeit für fachlichen Rat nahm, wann immer ich Rat benötigte.

Ebenso Herrn Dr. Müller, dem wohl besten Berater und Diskussionspartner, den man sich für diese Arbeit wünschen konnte.

Ich danke Frau Dr. Fricke und Herrn PD Dr. Willhardt sehr für Unterstützung in biochemischen Fragen, sowie Frau Perl und Frau Rühlmann für hilfreiche und angenehme Gesellschaft im Labor, wie auch meinen Probanden für ihre Einsatzbereitschaft.

Tiefer Dank gilt meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester für allzeitige, allumfassende Unterstützung beim Beschreiten meines Weges und meiner Ulli für Aufmunterung beim Durchqueren einzelner Schlaglöcher.

## Publikationsliste

Seidel C, Müller A-C:

Interzelluläre Heterogenität strahleninduzierten DNS-Schadens. In Baumann M, Raabe A, Petersen C (Hrsg): Experimentelle Strahlenbiologie und Klinische Strahlenbiologie, Band 13, Proc. d. 13. Symposiums Exp. Strahlenth. u. Klin. Strahlenbiol., Dresden, 2004, S. 99-104

Eine weitere Publikation ist in der Zeitschrift „Strahlentherapie und Onkologie“ geplant.