

KfK 3432
Januar 1983

Alphastrahlen-induzierte Veränderungen der Proliferationskinetik, Chromatinstruktur und Genexpression in Säugetierzellen

L. Hieber
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE
Institut für Genetik und für Toxikologie von
Spaltstoffen

KfK 3432

Alphastrahlen-induzierte Veränderungen der
Proliferationskinetik, Chromatinstruktur und Genexpression
in Säugetierzellen

Ludwig Hieber

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe (T.H.)
genehmigte Dissertation

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript vervielfältigt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
ISSN 0303-4003

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurden kausale Zusammenhänge zwischen Chromosomenschäden, Blockierung der Zellen in der G2-Phase und Zellinaktivierung nach Alphabestrahlung aufgezeigt.

Exponentiell wachsende Säugetierzellen wurden mit 3,4 MeV Alphateilchen bestrahlt. Obwohl das Chromatin der G2-blokierten Zellen durch die Alphabestrahlung stark geschädigt ist, können die Zellen ihr Chromatin nach Fusion mit mitotischen Zellen kondensieren. Das ermöglichte die Erkennung von Chromosomenschäden an Interphase-G2 Zellen mittels der PCC-Technik. Zusätzlich zu den üblichen Chromosomenschäden (Brüche, Gaps, dizentrische Chromosomen und Austauschfiguren) zeigten einzelne Chromosomen charakteristische dekondensierte Bereiche. Alle Chromosomenschäden wurden während der G2-Blockierung repariert. Dies konnte durch ^3H -Thymidin Einbau an den Schadstellen (Reparatursynthese) und durch zunehmende Kondensation ursprünglich dekondensierter Bereiche nachgewiesen werden.

Außerdem wurde mithilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese gezeigt, daß während der G2-Blockierung die Syntheserate von zwei ^{35}S -Methionin markierten Zellproteinen stimuliert wurde.

Alle Befunde dieser Arbeit unterstützen die Vorstellung, daß die strahleninduzierte Blockierung von Säugetierzellen in der G2-Phase durch Chromosomenschäden verursacht wird. Solche Schäden verhindern die normale Kondensation für die Einleitung der Zellteilung.

Alpha radiation-induced alterations of the proliferation kinetics, chromatin structure and gene expression in mammalian cells

Abstract:

In the present work a causal relationship between chromosomal damage, arrest in G2 and cell inactivation has been described for irradiated mammalian cells.

Exponentially growing mammalian cells were exposed to 3.4 MeV alpha particles. The chromatin of cells arrested in G2 by alpha irradiation was severely damaged, though all cells were still capable to condensate their chromatin after fusion with mitotic cells. In addition to the common types of aberrations (breaks, gaps, dicentrics and exchanges) cells were found possessing one or more chromosomes with long stretches of undercondensed chromatin. Repair of these lesions was indicated by site specific unscheduled DNA synthesis and by the observation that condensation of these regions improved during G2 arrest.

Furthermore, during G2 arrest the synthesis of two cellular proteins was stimulated. This was studied by two-dimensional gel electrophoresis of ³⁵S-methionine labeled cellular proteins.

All these findings provided evidence that radiation-induced G2 arrest is caused by chromatin damage, which prevents regular chromosome condensation for mitosis.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	4
1. Zelllinien	4
1.1 V 79 Zellen	4
1.2 V 79 pur1 Zellen	4
1.3 L 929 Zellen	4
2. Zellzüchtung	4
2.1 Kulturmedien	4
2.2 Kultivierung	5
2.3 Zellsynchronisierung	5
2.3.1 Mitotische Selektion durch Abschütteln	5
2.3.2 Synchronisierung durch Serumentzug	6
3. Methodik und Durchführung der Experimente	6
3.1 Bestrahlung von Zellkulturen	6
3.1.1 Alphabestrahlung	6
3.1.2 Gammabestrahlung	8
3.2 Überlebenstest nach Bestrahlung	8
3.3 Proliferationskinetische und zytogenetische Untersuchungen	9
3.3.1 Flußzytometrie	9
3.3.2 Autoradiographie	10
3.3.3 Mitoseindex	10
3.3.4 Fusionsinduzierte vorzeitige Chromosomenkondensation	10
3.4 Proteinanalyse	13
3.4.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese	13
3.4.2 Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen	15
3.4.3 Begrenzter proteolytischer Verdau	15

C. ERGEBNISSE	17
1. Einfluß ionisierender Strahlung auf das Überleben von Zellen	17
1.1 $^{241}\text{Americium}$ -Alphabestrahlung	17
1.2 $^{60}\text{Cobalt}$ -Gammabestrahlung	17
1.3 Relative biologische Effektivität	18
2. Proliferationskinetische Veränderungen nach $^{241}\text{Americium}$ -Alphabestrahlung	18
2.1 Exponentiell wachsende Kulturen	18
2.2 Synchronisierte Zellkulturen	22
3. Zytogenetische Analyse G2-blockierter Zellen	22
3.1 Bestimmung von Chromosomenaberrationen in G2-blockierten Zellen	23
3.2 ^3H -Thymidin-Einbau in G2-blockierte Zellen	24
3.3 Beeinflussung des Alphastrahlen-induzierten G2-Blocks durch Coffein	25
4. Genexpression alphabestrahelter V 79 Zellen	27
4.1 Induktion und Repression von Proteinen nach Alphabestrahlung	27
4.2 Charakterisierung der Proteine	28
4.3 Zellzyklusabhängigkeit der Synthese von P1, P2 und P3	29
4.4 Synthese von P1, P2 und P3 nach Proliferationsblockierung durch verschiedene Noxen	29
D. DISKUSSION	33
E. ZUSAMMENFASSUNG	42
F. LITERATURVERZEICHNIS	44
G. TABELLEN UND ABBILDUNGEN	51

A. EINLEITUNG

Seit Entdeckung der Röntgenstrahlen (1895) haben Wissenschaftler versucht, die Mechanismen der nützlichen (z.B. Tumorkämpfung, Diagnostik) und schädlichen (z.B. Strahlentod, Mutation) Wirkungen ionisierender Strahlung auf biologische Systeme aufzuklären. Trotz mannigfaltiger Ansätze herrscht bis heute noch keine Klarheit darüber, wie es zur Zellinaktivierung durch ionisierende Strahlung kommt. Wir können allerdings von wahrscheinlichen Mechanismen sprechen, wobei möglicherweise strahleninduzierte Zellzyklusveränderungen und Chromosomenaberrationen, die dem Zelltod vorausgehen, im Zusammenhang mit der Zellinaktivierung stehen.

Selektive Bestrahlung einzelner Zellbestandteile, wie sie Burki und Okada (1968) durch Inkorporation von radioaktiven DNA-, RNA- und Proteinbausteinen, von Munro (1970) durch Bestrahlung mit Alphateilchen definierter Reichweite und Warters und Hofer (1977) durch Inkorporation von radioaktivem ^{125}Jod in das Zytoplasma oder den Zellkern durchgeführt haben, hat Hinweise geliefert, daß die strahlenempfindliche Struktur (Target) für die Zellinaktivierung im Zellkern lokalisiert ist. Das Chromatin, mit der DNA als größtem Molekül des Zellkerns und als Träger der genetischen Information, gilt daher als empfindlichstes Target für die Strahlenschädigung. Für die Targetfunktion des Chromatins sprechen auch strahleninduzierte Chromosomenaberrationen, die durch primäre Schädigung der DNA zustande kommen. Da Zellzyklusveränderungen schon nach sehr niedrigen Strahlendosen, wie 0,03 Gy Alphateilchen, auftreten (Lücke-Huhle, 1982), ist zu vermuten, daß auch dieser Strahlenwirkung die Schädigung einer großen zellulären Struktur, wie es das Chromatin darstellt, zugrunde liegt.

Die Vorstellung, daß alle drei Strahlenwirkungen auf der Schädigung der gleichen zellulären Struktur beruhen, findet Unterstützung durch die Befunde von Skarsgard (1967), der Übereinstimmung der relativen biologischen Effektivität (RBE) von Strahlung unterschiedlicher Ionisierungsdichte für die

Zellinaktivierung, Chromosomenaberrationen und Zellzyklusveränderungen (Teilungsverzögerung) fand.

Bei der Induktion der Zellzyklusveränderungen gibt es qualitative Unterschiede in Abhängigkeit von der Ionisierungsdichte der verwendeten Strahlung. Die Dauer des Zellzyklus, erstmals von Howard und Pelc (1953) in verschiedene Phasen (G1, S, G2 und M) eingeteilt, wird von locker-ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlen, ^{60}Co -Gammastrahlen) durch Verzögerung sowohl in der S- als auch in der G2-Phase verändert (Terasima und Tolmach, 1963b; Puck und Steffen, 1963; Walters und Enger, 1976). Dicht-ionisierende Strahlung (Alphateilchen, Neutronen, beschleunigte Ionen) dagegen induziert nahezu ausschließlich Verzögerungen in der G2-Phase (Lücke-Huhle et al., 1979; Schlag und Lücke-Huhle, 1981). Diese Unterschiede sind vermutlich dadurch bedingt, daß dicht-ionisierende Strahlung aufgrund höherer Energieabgabe pro Absorptionsereignis vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche induziert, während locker-ionisierende Strahlung ein breiteres Schadensspektrum mit Einzelstrangbrüchen, Doppelstrangbrüchen und Basenschäden aufweist.

Dicht-ionisierende Strahlung eignet sich aufgrund des einheitlicheren Schadenstyps und der hohen Effektivität besonders gut, um die Zusammenhänge der Strahlenwirkungen zu untersuchen. Genaue Kenntnis dieser Ursache-Wirkungskette erfordert die Erforschung weiterer molekularer Vorgänge in den Zellen. In der vorliegenden Arbeit werden unter Verwendung von Alphastrahlung zwei testbare Hypothesen geprüft:

- 1) Strahleninduzierte Strukturveränderungen des Chromatins sind die Ursache für Verzögerungen des Zellzyklus (G2-Blockierung), die mit Reparaturvorgängen gekoppelt sind.
- 2) Die Strukturveränderungen des Chromatins führen zu Veränderungen der Genexpression.

Um die beiden Hypothesen zu testen, werden Zellzyklusveränderungen von Zellpopulationen in verschiedenen Wachstumsstadien nach Bestrahlung mit ^{241}Am -Alphateilchen untersucht.

Die G2-Blockierung wird mit Hilfe der Zytofluorometrie (mit großer statistischer Genauigkeit) und einer zytogenetischen Methode, der fusionsinduzierten vorzeitigen Chromosomenkondensation (PCC-Technik) nachgewiesen. Letztere ermöglicht das Sichtbarmachen von G2-Chromatin und damit Untersuchungen von Aberrationen und deren Veränderungen während der G2-Blockierung. Ferner wird die Beeinflussung des geschädigten Chromatins durch Coffein getestet, dessen Wirkung in der künstlichen Verkürzung der G2-Blockierung liegt.

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Veränderungen der Syntheserate zellulärer Proteine während des strahleninduzierten G2-Blocks untersucht. Die Relevanz der Veränderungen für die Blockierung des Zellzyklus wird durch Vergleich mit Einflüssen anderer proliferationsblockierender Agenzien geprüft.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Zelllinien

1.1 V 79 Zellen

Für die meisten Experimente wurden V 79 Zellen, eine etablierte Zelllinie des Chinesischen Hamsters (*Cricetus griseus*) verwendet. Sie entstammt dem Lungengewebe eines weiblichen Hamsters und wurde erstmals von Denys Ford als V Zellen in Kultur genommen. Seit 1958 wurden diese Zellen von Elkind und Sutton als V 79 weiterkultiviert, seit 1973 auch in unserem Labor. Die Zellen weisen einen quasidiploiden Chromosomensatz von 22 Chromosomen auf.

1.2 V 79 pur1 Zellen

V 79 pur1 ist eine Mutante der V 79 Zellen, mit einem Defekt in der 'de novo' Purinbiosynthese, und zwar im Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase Schritt. Diese Zelllinie kann daher nur wachsen, wenn externes Purin (z.B. Adenin, Thymidin oder Hypoxanthin) mit dem Medium zugeführt wird. Die Mutante wurde von Dr. E.H.Y. Chu (Chu et al., 1972) isoliert und unserem Labor von Dr. M.W. Taylor, Indiana University, Bloomington überlassen.

1.3 L 929 Zellen

Die verwendeten L 929 Zellen stammen von Dr. H-P. Beck, Hamburg. Es handelt sich um einen Klon der NCTC Zellen (American Type Culture Collection, Kat.Nr. CCL1), die aus einer männlichen C3H/An-Maus stammen. Sie wachsen fibroblastenähnlich und haben durchschnittlich 65 Chromosomen.

2. Zellzüchtung

2.1 Kulturmedien

V 79 Zellen wurden in Eagle's Minimum Essential Medium (Gibco: mit Earle's Salzen) mit 15 % fötalem Kälberserum (Gibco) und 0,1 mg/ml Bykomycin (Byk Gulden) gezüchtet.

Zur Züchtung von V 79 pur1 Zellen wurde HAM's F 12 Nutrient Mixture (Gibco) mit 5 % fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Für Experimente, bei denen die Proliferation gestoppt werden sollte, wurde HAM's F12 Medium durch Minimum Essential Alpha und 5 % dialysiertem fötalem Kälberserum ersetzt.

L 929 Zellen wuchsen in Eagle's MEM mit Earle's Salzen unter Zusatz von 5 % fötalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

2.2__Kultivierung

Für die Stammkulturen wurden Plastik-Einweggefäße der Firma Falcon verwendet. Die Zellen wuchsen als Einschichtkulturen (Monolayer) am Boden der Kulturgefäße in Brutschränken bei einer Temperatur von 37°C. Zur Konstanthaltung des optimalen pH-Werts von 7,2 - 7,4 wurden die Brutschränke mit einem Gemisch aus 95 % Luft und 5 % CO₂ begast.

Die Subkultivierung erfolgte 2-3 mal pro Woche je nach Zelllinie. Hierzu wurden die Zellen nach Entfernen des Kulturmediums mittels 0,05 %iger Trypsinlösung (5-10 min bei 37°C) vom Gefäßboden abgelöst, durch Pipettieren vereinzelt, mittels eines Coulter Counters (Coulter) gezählt und in neue Kulturflaschen mit einer Dichte von 5-10 x 10³ Zellen/cm² überimpft.

2.3__Zellsynchronisierung

2.3.1 Mitotische Selektion durch Abschütteln

Während der Mitose ist der Zellkontakt von Monolayerkulturen zu den Nachbarzellen und zum Boden der Kulturgefäße weitgehend gelockert, so daß mitotische Zellen durch leichtes Schütteln abgelöst werden können (Terasima und Tolmach, 1961, 1963a). V 79 Zellen wurden mit einer Dichte von 2 x 10⁴ Zellen/cm² in 75 cm² Einweggefäße (Falcon) überimpft und 24 Stunden wachsen gelassen. Von diesen Kulturen wurden die mitotischen Zellen abgeschüttelt, das Medium mit den Mitosen abgossen, durch neues, konditioniertes Medium ersetzt und der Abschüttelvorgang mehrmals alle 20 min wiederholt. Das abgossene Medium mit den mitotischen Zellen wurde 10 min bei 1500 Upm zentrifugiert und das

Zellpellet bei 0°C in Eiswasser aufbewahrt bis genügend Zellen gesammelt waren. Nach Transferieren der abgeschüttelten Zellen in neue Kulturgefäße mit vorgewärmtem Medium wuchsen die Zellen synchron weiter.

2.3.2 Synchronisierung durch Serumentzug

Läßt man proliferierende Zellkulturen durch Serumentzug hungern, stellen sie ihr Wachstum ein und sammeln sich in der G₁- bzw. G₀-Phase des Zellzyklus an (Todaro et al., 1965). V 79 bzw. L 929 Zellen wurden bis zum Dichteplateau in normalem Kulturmedium wachsen gelassen. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellmonolayer 2-3 mal mit serumfreiem Medium gewaschen und dann in Medium ohne Serum bei den üblichen Kulturbedingungen inkubiert. Während der 3-5 tägigen (V 79) bzw. 8-10 tägigen (L 929) Inkubation wurde täglich das Medium gewechselt. Die so synchronisierten Zellen wurden abtrypsiniert und in neue Kulturgefäße überimpft.

Diese Methode hatte gegenüber der Abschüttelmethode den Vorteil, hohe Zellzahlen zu ergeben. Bezüglich des synchronen Weiterwachsens der Zellen war sie jedoch unterlegen.

3. Methodik und Durchführung der Experimente

3.1 Bestrahlung von Zellkulturen

3.1.1 Alphabestrahlung

Bestrahlungsquelle:

Die kreisförmige Alphaquelle besitzt einen Durchmesser von 85 mm und wurde von der Firma Amersham/Buchler hergestellt. Das radioaktive ²⁴¹Americium ist in eine Silbermatrix eingebettet und zur Verhinderung des Austretens von radioaktivem Material mit einer 2 µm dicken Gold-Palladium Folie abgedeckt. Die spezifische Aktivität beträgt nach Herstellerangabe 4,6 µCi/cm². Die Gold-Palladium Folie reduziert die ursprüngliche Energie der Alphapartikel von 5,4 MeV auf 4,05 MeV.

Bestrahlungsgefäße:

Alphabestrahlung von Monolayerkulturen wurde in speziellen Petrischalen durchgeführt, da die emittierten Alphapartikel nur eine begrenzte Reichweite hatten.

Diese Schalen bestanden aus einem Glasring von 50 mm Durchmesser und einer 6 μm dicken Melinex Folie (Polyäthylenterephthalat) als Boden, die mit Hilfe von Araldit (Ciba), einem Polymerisationskleber, mit dem Glasring verbunden wurde. Durch 4-stündiges Erhitzen im Heißluftsterilisator auf 150°C erhielt man absolut plane Folienböden und zudem sterile Gefäße.

Bestrahlungsanordnung und Dosimetrie:

Die Bestrahlungsapparatur (Abbildung 1) garantierte einen konstanten Abstand von 1 mm zwischen Quelle und Probengefäß. Die emittierten Alphapartikel hatten nach Durchdringen der Gold-Palladium Folie (2 μm), der Luft (1 mm) und der Melinex Folie (6 μm) an der Zellunterseite eine verbleibende Energie von durchschnittlich 3,3 MeV (Energieverteilung: 77 % zwischen 3,05 und 3,4 MeV). Diese Energie entspricht einem mittleren LET (Linearer Energie Transfer) von 120 keV/ μm , woraus eine Reichweite der Alphapartikel von ca. 18 μm in Gewebe errechnet werden kann. Die auf der Melinex Folie wachsenden Zellmonolayer wiesen nach mikroskopischen Messungen eine Schichtdicke von 4-6 μm auf. Damit war eine vollständige Bestrahlung der Zellen mittels Alphateilchen gewährleistet. Die Dosisleistung in der Zellmitte (ca. 2,5 μm hinter der Melinex Folie) betrug 0,35 Gy/min. Durch Rotieren der Strahlenquelle wurde eine gleichmäßige Dosisverteilung gewährleistet.

Bestrahlungsbedingungen:

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei einer Zelldichte von 4-5 $\times 10^4/\text{cm}^2$. Für Überlebensexperimente erfolgte die Bestrahlung bei Raumtemperatur, für proliferationskinetische Untersuchungen im Wärmerraum bei 37°C.

3.1.2 Gammabestrahlung

Bestrahlungsquelle:

Gammabestrahlung der Zellen wurde mit einer ^{60}Co -Gammaquelle (Atomic Energy of Canada Ltd., Gammacell 200) durchgeführt, deren Dosisleistung, gemessen mit einer Eisen(II)sulfat-Lösung nach der Methode von Fricke, 1,5 Gy/min betrug.

Bestrahlungsbedingungen:

Die Zellen wurden als Monolayer bei einer Zelldichte von $4-5 \times 10^4/\text{cm}^2$ in 20 cm^2 Plastikpetrischalen (Falcon) bei Raumtemperatur bestrahlt.

3.2 Überlebenstest nach Bestrahlung

Die Überlebensfähigkeit von bestrahlten Zellen wurde mittels des Koloniebildungstests nach Puck et al. (1956) bestimmt. Als Überleben wurde die Fähigkeit einer Einzelzelle gewertet, innerhalb 1-2 Wochen (abhängig von der Generationszeit) eine Kolonie von mindestens 50 Zellen zu bilden.

Für den Test wurden die bestrahlten Zellen mittels Trypsin von der Grundfläche abgelöst und in entsprechenden Verdünnungen in Petrischalen überimpft, so daß ca. 100 Kolonien pro Petrischale zu erwarten waren. Nach 1-2 wöchiger Inkubation bei 37°C wurden die Kolonien mit Hank's BSS (Gibco) gewaschen, mit Methanol und Äthanol fixiert, mit 0,5 %iger Kristallviolettlösung gefärbt und gezählt.

Unbehandelte V 79 Zellen hatten unter diesen Bedingungen eine "Plating Efficiency" (PE) von über 90 %.

L 929 Zellen mußten zur Erreichung vergleichbarer PE-Werte (85 %) mit 4×10^4 Feederzellen pro Petrischale kokultiviert werden. Feederzellen wurden durch ^{60}Co -Gammabestrahlung (36 Gy) von trypsinierten L-Zellen in Suspension präpariert (Puck et al., 1956).

Die Überlebensrate (N/N_0) wurde folgendermaßen berechnet:

$$(N/N_0) = \frac{\text{Anzahl der Kolonien (G)}}{\text{überimpfte Zellen (U)} \times (\text{PE}/100)}$$

Um statistisch gesicherte Dosis-Effekt-Kurven zu erhalten, wurden die Überlebensraten für 7-10 Dosen in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt und die Standardfehler der Mittelwerte nach $SE = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$ berechnet.

3.3 Proliferationskinetische und zytogenetische Untersuchungen

Bestrahlung von Säugetierzellen mit ionisierender Strahlung führt zu Änderungen in der Proliferationskinetik, die mit verschiedenen Methoden meßbar sind.

3.3.1 Flußzytometrie

Die Flußzytometrie erlaubt durch Messung des zellulären DNA-Gehalts den Anteil der Zellen in G1, S und G2+M zu bestimmen. Als Meßinstrument diente der "Cytofluorograph" (Modell 4801, Bio Physics).

Zur flußzytometrischen Analyse wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 % Trypsin, 0,05 % EDTA) abgelöst, mit Saline-GM gewaschen und über Nacht in 70 %igem Äthanol bei 4°C fixiert. Nach wiederholtem Waschen wurde 1 Stunde bei 37°C mit 0,1 %iger RNase-Lösung (Roth) inkubiert, die Zellen erneut gewaschen und 45 min bei 30°C mit Ethidiumbromid (0,01 mg/ml) gefärbt. Unter diesen Bedingungen ist die Menge des gebundenen Farbstoffs dem DNA-Gehalt der Zelle proportional (Le Pecq und Paoletti, 1967).

Die spezifisch angefärbte DNA der Zellen in Suspension wurde zur Fluoreszenz angeregt und deren Emission bei 510 nm nach Verstärkung durch einen Photomultiplier gemessen. Von einem Vielkanalanalysator wurden die unterschiedlichen Fluoreszenzimpulse entsprechend ihrer Amplitude auf 100 Kanäle verteilt. Nach Abschluß der Messung von jeweils 30 000 Zellen wurden die Speicherinhalte als Histogramme (Zellzahl gegen Fluoreszenzintensität) über einen Schreiber aufgezeichnet.

Der Prozentsatz der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen (G1, S und G2+M) wurde mit einem Computerprogramm nach dem Modell von Baisch et al. (1975) berechnet.

3.3.2 Autoradiographie

Durch Autoradiographie mit Hilfe von radioaktiv markiertem Thymidin kann der Anteil replizierender Zellen, also S-Phase Zellen, einer Population bestimmt werden.

Hierzu wurden die Zellen mit 0,5-1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -methyl-Thymidin (spez. Aktivität 41 Ci/mmol, Amersham/Buchler) 15-30 min bei 37°C inkubiert, die Zellmonolayer mit Phosphatpuffer gewaschen und trypsiniert. Nach Fixieren mit Methanol/Eisessig (3:1) wurden einige Tropfen der Zellsuspension auf Objektträger getropft und zweimal 15 min in 5 %iger Trichloressigsäure bei 4°C inkubiert, um niedermolekulares radioaktives Material zu entfernen. Nach dem Wässern und Trocknen der Objektträger wurde eine dünne Schicht Filmemulsion (NTB 2, Kodak) aufgebracht und 2-5 Tage im Dunkeln exponiert. Anschließend wurde 2 min mit D 19 Developer (Kodak) entwickelt, 5 min fixiert, 10 min gewässert und getrocknet. Nach Färbung mit 2 %iger Giemsalösung wurden jeweils von 1000 Zellen der Anteil markierter Zellen bestimmt.

3.3.3 Mitoseindex

Die Mitoseindices wurden zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung bestimmt.

Die Zellen wurden mit 0,25 %iger Trypsinlösung abgelöst, durch Pipettieren vereinzelt, in Hank's BSS aufgenommen und unter Zusatz von 7,5 % DMSO mit Hilfe einer "Cytozentrifuge" auf Objektträger aufgebracht. Nach Fixierung und Färbung mit 2 %iger Giemsalösung wurde der Anteil der mitotischen Zellen in jeweils 1000 Zellen bestimmt.

3.3.4 Fusionsinduzierte vorzeitige Chromosomenkondensation

Werden Interphasezellen mit mitotischen Zellen fusioniert, so wird das Interphasechromatin durch "Induktormoleküle" im Zytoplasma der mitotischen Zellen vorzeitig kondensiert (premature chromosome condensation = PCC). Dieses Phänomen erlaubt es, Interphasezellen im Lichtmikroskop in G1, S und G2 Zellen zu differenzieren (Johnson und Rao, 1970).

Züchtung von Sendai Virus:

Sendai Virus (Parainfluenza Virus Typ 1 oder hemagglutinating virus of Japan (HVJ), ein RNA-Virus der Paramyxogruppe, wurde erstmals aus Mäusen isoliert, die mit Lungenmaterial Pneumonitis-erkrankter Neugeborener infiziert waren (Giles und Ruddle, 1973). Das Virus kann in verschiedenen Zellkulturen (z.B. HeLa) vermehrt werden, zur Zellfusion wurde es in bebrüteten Hühnereiern gezüchtet (Sperling und Rao, 1974a). Befruchtete Hühnereier (50 - 60 Stück) wurden 10 Tage im Brutschrank bei 36°C unter 3-4 maligem Wenden pro Tag bebrütet. Am 5. Bruttag wurden unter der Schierlampe unbefruchtete oder abgestorbene Eier aussortiert. Am 10. Tag wurde erneut geschickt und danach die Eier mit lebenden Embryonen mit 0,1 ml Virussuspension (1 HAU/ml (hemagglutinating unit)) infiziert. Hierzu wurde über dem Luftsack mit einer sterilen Injektionsnadel ein kleines Loch zur Belüftung und zum Druckausgleich gebohrt. Durch ein zweites Loch in der Eischale etwa 2-3 mm unterhalb der Luftsackbegrenzung in der Nähe des Embryoauges wurde dann die Virussuspension in die Chorioallantoishöhle injiziert. Die infizierten Eier wurden für weitere 3 Tage unter täglichem Entfernen der abgestorbenen Eier bebrütet. Anschließend wurden die Eier über Nacht bei 4°C gelagert, um die Embryonen abzutöten und Blutungen bei der Virusernte zu vermeiden. Zur Virusernte wurden die Eier über dem Luftsack mit einer sterilen Pinzette aufgebrochen, die freigewordene Chorioallantoismembran über den Rand der Öffnung gelegt und die Allantoisflüssigkeit mit einer 10 ml Einwegspritze abgesaugt und gesammelt. Nur klare bis leicht getrübbte, schwach gelblich erscheinende Flüssigkeit wurde verwendet und 10 min bei 2000 Upm zentrifugiert (Entfernung von Zelltrümmern). Das Virus wurde dann durch Zentrifugation des Überstandes (30 min, 30 000 g) sedimentiert und das Pellet in serumfreiem MEM mit Earle's Salzen aufgenommen (1/10 der ursprünglichen Menge der Allantoisflüssigkeit).

Die Virustiterbestimmung erfolgte mit dieser Suspension. Frische, mit Phosphatpuffer gewaschene Hühnererythrozyten wurden auf einer Titrierplatte mit einer Verdünnungsreihe der Virussuspension für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend

wurde die Verdünnung bestimmt, bei der die Erythrozytensuspension eben noch vollständig agglutiniert wurde.

Dem Ergebnis entsprechend wurde die Virussuspension mit serumfreiem Medium zu einer Endkonzentration von 2000 HAU/ml verdünnt und in Portionen zu 1 ml bei -196°C (flüssiger N_2) eingefroren.

Fusionstechnik:

Mitotische Zellen für die Fusion wurden über die Abschüttel-methode (§ 2.3.1) unter Einsatz von Colcemid erhalten. Hierzu wurden 10-20 T 260 Flaschen (75 cm^2 , Falcon) mit je $1,5 \times 10^6$ V 79 Zellen beimpft, 24 Std. wachsen gelassen, dann für 3 Stunden mit $0,06\text{ }\mu\text{g/ml}$ Colcemid inkubiert und die Mitosen abgeschüttelt.

Die zu fusionierenden Interphasezellen wurden 10 min bei 37°C trypsinisiert ($0,25\%$ ige Trypsinlösung) und die vereinzelteten Zellen gezählt.

Zur Fusion wurden 10^6 Mitosen und 5×10^5 Interphasezellen in einem Zentrifugenglas (Falcon) gemischt, 10 min bei 1200 Upm zentrifugiert, das Zellpellet mit serumfreiem Medium gewaschen, der Überstand abgossen und die Zellen im überstehenden Mediumrest resuspendiert. Nach Zugabe von 500 - 1000 HAU UV-inaktiviertem Sendai Virus ($3000\text{ erg/cm}^2/\text{sec}$) wurde leicht geschüttelt bis beginnende Agglutination sichtbar wurde und 15 min in Eiswasser bei 4°C inkubiert. Danach wurde unter Zusatz von 1 - 2 Tropfen Colcemidlösung ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) bei 37°C im Wasserbad für 45 min weiterinkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 800 Upm) wurde das Zellpellet zum Quellen in 3 ml $0,075\text{ M}$ Kaliumchlorid-lösung aufgenommen und 20 min bei 37°C gehalten. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit 3 ml Fixativ (Methanol/Eisessig, 3:1) überschichtet und 60 min im Kühlschrank fixiert, anschließend das Fixativ noch zweimal gewechselt und zum Schluß in 1 ml Fixativ aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde auf eiskalte, nasse Objektträger getropft und diese entweder luftgetrocknet oder zur besseren Spreitung durch die Bunsenflamme gezogen.

Die Präparate wurden mit 2 %iger Giemsalösung gefärbt (10 min) oder bei radioaktiv markierten Zellen vorher autoradiographiert wie in § 3.3.2 beschrieben.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Zeiss Mikroskop bei 500, 788 oder 1250facher Vergrößerung.

Die photographischen Aufnahmen wurden unter Verwendung eines Zeiss Kameraaufsatz C 35 und Ilford PAN F 50 ASA bzw. Agfa Ortho 25 ASA als Filmmaterial angefertigt.

3.4. Proteinalyse

3.4.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Mit Hilfe der zweidimensionalen (2D) Gelelektrophorese kann die Syntheserate vieler zellulärer Proteine untersucht werden. Dabei werden die Proteine in der ersten Dimension nach ihrer Ladung (Isoelektrische Fokussierung = IEF) und in der zweiten Dimension entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (O'Farrel, 1975).

Markierung und Präparation der Zellen:

Zur Bestimmung der Syntheserate zellulärer Proteine wurden die zu untersuchenden Zellen zu verschiedenen Zeiten jeweils 2 Stunden lang mit 50 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin in 2 ml Markierungsmedium, das 3 % fötales Kälberserum und 10^{-5} M Methionin enthielt, markiert. Nach Entfernen des Markierungsmediums wurden die Zellmonolayer mit 1,5 ml Ablösepuffer (10 mM Natriumphosphat, 150 mM Natriumchlorid, 3 mM Kaliumchlorid und 0,5 mM EDTA) überschichtet und nach einer Minute mit einem Gummispatel von der Petrischale abgelöst. Die Zellen wurden sedimentiert (1500 Upm, 5 min), das Pellet in 50 μl Phosphatpuffer, der 5 % Mercaptoethanol, 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) und 2 mM PMSF enthielt, aufgenommen und 20 sec beschallt. Nach einminütigem Kochen wurde 50 μl Lysispuffer (9,5 M Harnstoff, 2 % NP-40, 2 % Ampholine und 5 % Mercaptoethanol) zugefügt und darin Harnstoff zu einer Endkonzentration von 9 Mol gelöst. Die Radioaktivität der Proben wurde durch Zählen von 1 μl in Insta-gel in einem Szintillationszähler bestimmt und jeweils 10^6 cpm pro Gel aufgetragen.

Erste Dimension: Herstellung der Gele und Elektrophorese

Zur Herstellung von 10 Gelen wurde 4,4 g Harnstoff, 1,08 ml Acrylamid/Bisacrylamid (28,38 % / 1,62 %), 1,6 ml NP-40 (10 %), 1,6 ml destilliertes Wasser, 0,45 ml Ampholine pH 5-8, 0,15 ml Ampholine pH 3,5-10 in einer Saugflasche gemischt und entgast. Nach Zufügen von 11 μ l Ammoniumpersulfat (10 %) und 20 μ l TEMED wurde die Lösung in unten mit Parafilm verschlossene Glasröhrchen (130 mm lang, Innendurchmesser 2,5 mm) blasenfrei gefüllt und mit 8 M Harnstofflösung (20 μ l) überschichtet. Nach 2 Stunden waren die Gele polymerisiert. Der Parafilmverschluß wurde entfernt, die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingebaut und die Harnstoffüberschichtung abgesaugt. Die Gele wurden dann mit den Proben beladen und diese mit 25 μ l Überschichtungslösung (9 M Harnstoff, 0,8 % Ampholine pH 5-7, 0,2 % Ampholine pH 3,5-10) überschichtet.

Die untere Elektrophoresekammer (Anode) wurde mit 0,01 M Phosphorsäure, die obere Kammer (Kathode) mit 0,02 molarer, entgaster Natronlauge gefüllt. Die Proben wurden dann 17 Stunden bei 1 Watt elektrophoretisiert.

Die Gele wurden dann in Röhrchen mit Probenpuffer nach Laemmli (10 % (G/V) Glycerol, 5 % (V/V) Mercaptoethanol, 2,3 % (G/V) Natriumdodecylsulfat, 0,001 % (G/V) Bromphenolblau und 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8) ausgepreßt und bei -80°C eingefroren.

Zweite Dimension: Gele und Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht wurde in einem SDS-Gradientengel durchgeführt. Zur Herstellung eines Gels wurde in einer Saugflasche 3,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 %), 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,1 ml SDS (10 %), 4,1 ml destilliertes Wasser, 2,5 μ l TEMED und 20 μ l Ammoniumpersulfat gemischt, in einer anderen Saugflasche 6,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 %), 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,1 ml SDS (10 %), 0,7 ml Glycerol, 2,5 μ l TEMED und 20 μ l Ammoniumpersulfat. Über einen Gradientenmischer wurden die Lösungen dann in aus zwei Glasplatten gefertigte Kammern mit einem Innenvolumen von 0,8 mm gepumpt, so daß nach Polymeri-

sation ein lineares Gradientengel zwischen 10 und 20 % Polyacrylamid erhalten wurde. Auf dieses Trenngel wurde dann ein 1-1,5 cm hohes Konzentriergel, präpariert aus 0,85 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 %), 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 50 µl SDS (10 %), 5 µl TEMED, 2,83 ml destilliertes Wasser und 25 µl Ammoniumpersulfat (10 %), aufgebracht.

Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoreseapparaturen eingebaut, die aufgetauten Gele aus der ersten Dimension auf das Konzentriergel gelegt und mit 2 % igem Bacto-Agar fixiert. Die beiden Elektrophoresekammern wurden mit Protein-Puffer nach Laemmli (0,025 M Tris-Base, 0,192 M Glycin und 0,1 % SDS; pH 8,3) gefüllt. Die Proteine wurden im Kühlraum (4°C) mit 50 mA bis die Bromphenolblaufront das untere Gelende erreicht hat, elektrophoretisiert.

Die Gele wurden dann in DMSO entwässert (3 mal 30 min), 3 Stunden in PPO (22,2 % in DMSO) aktiviert, 1 Std. gewässert und unter Vakuum getrocknet.

Zur Fluorographie wurde Kodak X-ray-Film OR aufgelegt und 1 - 5 Tage bei -80°C exponiert. Die Filme wurden 5 min in Kodak D 19 entwickelt und getrocknet.

3.4.2 Molekulargewichtsbestimmung der Proteine

Zur Molekulargewichtsbestimmung einzelner Proteine wurden die Proteinflecken aus den Gelen der zweiten Dimension ausgeschnitten und in einem 15 % igem SDS-Polyacrylamid-Gel zusammen mit ¹⁴C-markierten Standardproteinen gemäß der zweiten Dimension der 2D-Gelelektrophorese reelektrophoretisiert. Die Gele wurden fluorographiert und das Molekulargewicht durch halb-logarithmisches Auftragen des Molekulargewichts (der Markerproteine) gegenüber der Laufstrecke bestimmt (Weber und Osborn, 1969).

3.4.3 Begrenzter proteolytischer Verdau von Proteinen

Durch proteolytischen Verdau werden Proteine in Fragmente zerlegt, deren Muster Aufschluß über Identität oder Ähnlichkeit im Aufbau geben können (Cleaveland et al., 1977). Hierzu wurden

die zu vergleichenden Proteine aus den Gelen der zweiten Dimension ausgeschnitten.

Als Gele wurden wie bei der Bestimmung der Molekulargewichte 15 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet, allerdings mit einem Zusatz von 1 mM EDTA, das im Trenngel die Protease inhibiert. Auf das Trenngel wurde ein 5 %iger SDS-Polyacrylamid-Kamm ohne EDTA aufgebracht, so daß einzelne "Geltaschen" resultierten. Nach Einbau der Gele wurden in diese Taschen die ausgeschnittenen Gelstückchen gelegt und 30 min bei Raumtemperatur mit 0,1 µg V8 Protease in 100 µl Probenpuffer inkubiert. Danach wurde mit 40 mA bis zur Grenzlinie Kammgel/Trenngel elektrophoretisiert, für 30 min die Elektrophorese unterbrochen und dann weiter mit 40 mA elektrophoretisiert. Die Gele wurden wie bei der 2D-Gelelektrophorese weiterbehandelt und fluorographiert.

C. ERGEBNISSE

1. Einfluß ionisierender Strahlung auf das Überleben von Zellen

1.1 ²⁴¹Americium-Alphabestrahlung

Die Überlebenskurven nach Alphabestrahlung verlaufen für alle 3 Zelllinien exponentiell wie für Strahlung hoher Ionisierungsdichte (LET ca. 120 keV/μm) zu erwarten war (Abbildung 2).

Während V 79 und V 79 pur1 gleiche Empfindlichkeit mit einer D_{37} von 0,85 Gy aufweisen, sind L 929 Zellen ($D_{37} = 0,57$ Gy) um den Faktor 1,5 empfindlicher als die Chinesischen Hamsterzellen (Tabelle 1).

1.2 ⁶⁰Cobalt-Gammabestrahlung

Die Überlebenskurven nach Gammabestrahlung zeigen für alle drei Zelllinien eine deutliche Schulter mit anschließender exponentieller Inaktivierung im Dosisbereich über 5 Gy. Der Kurvenverlauf kann mit dem linear-quadratischen Modell von Chadwick und Leenhouts (1973) beschrieben werden. V 79 Zellen und die Mutante V 79 pur1 zeigen gleiche Empfindlichkeit, L 929 Zellen dagegen sind im niederen Dosisbereich weniger empfindlich (ausgeprägte Schulter) und bei höheren Dosen ab 4,5 Gy empfindlicher als Hamsterzellen (Abbildung 2).

Die "Mittlere Inaktivierungsdosis" (\bar{D}_{ML}), ein Parameter, der von Hug und Kellerer (1966) für Schulterkurven definiert wurde, ermöglicht einen Vergleich von Schulterkurven und exponentiell verlaufenden Dosis-Effekt-Kurven. In diesen Parameter geht, im Gegensatz zur D_{10} beispielsweise, der gesamte Kurvenverlauf ein. Beim Vergleich der \bar{D}_{ML} von V 79 und L 929 Zellen, berechnet nach Dertinger und Hülser (1981), findet man nur geringe Empfindlichkeitsunterschiede der Zelllinien (Tabelle 1).

1.3 Relative biologische Effektivität (RBE)

Das Verhältnis der absorbierten Dosen unterschiedlicher Strahlung, die den gleichen biologischen Effekt erzeugen, wird als relative biologische Effektivität bezeichnet (Definition der ICRU). Sie ist ein Maß für die Wirksamkeit verschiedenartiger Strahlung, wobei 220 kV Röntgenstrahlung oder ^{60}Co Cobalt-Gammastrahlung im allgemeinen als Bezugstrahlung gilt.

Im Hinblick auf die Zellabtötung ist die RBE_{10} (10 % überlebende Zellen) ein gängiges Maß in der Strahlentherapie. Für V 79 und V 79 pur1 Zellen ist die RBE_{10} nach Alphabestrahlung 4,2, für L 929 Zellen 5,5 (Tabelle 1).

Die Berechnung der $\text{RBE}_{\bar{D}_{\text{ML}}}$ ergab für V 79 und V 79 pur1 Zellen ebenfalls 4,2, für L 929 Zellen 6,6 (Tabelle 1). Der höhere Wert der $\text{RBE}_{\bar{D}_{\text{ML}}}$ gegenüber der RBE_{10} bei L 929 Zellen ist durch den geringen Effekt von Gammastrahlung im niederen Dosisbereich bedingt.

2. Proliferationskinetische Veränderungen nach

^{241}Am Americium-Alphabestrahlung

Der strahleninduzierten Zellabtötung gehen deutliche Veränderungen im Ablauf des Zellzyklus voraus, die sowohl an asynchron wachsenden als auch an synchronisierten Zellpopulationen untersucht wurden.

2.1 Proliferationskinetische Veränderungen in exponentiell wachsenden Kulturen

2.1.1 Mitoseindex von Zellen nach Alphabestrahlung

Durch Bestimmung der Mitoseindices von V 79 und L 929 Zellen nach Bestrahlung mit Alphateilchen wurde die Verzögerung einer prämitotischen Phase im Zellzyklus angezeigt. Der zeitliche Verlauf dieser Veränderung nach verschiedenen Strahlendosen wird für beide Zelllinien in der Abbildung 3 gezeigt. Der Anteil der mitotischen Zellen nimmt während der ersten zwei

Stunden nach der Bestrahlung schnell ab und steigt dann dosisabhängig mit unterschiedlicher Kinetik wieder bis zu Kontrollwerten an.

Aus diesen Kurven konnte die mitotische Verzögerung pro Dosis-einheit berechnet werden, indem die Zeitdifferenz zwischen Abfall und Wiedererreichen der 50 %-Werte durch die applizierte Strahlendosis dividiert wurde (Dewey und Highfield, 1976). Für V 79 ergab sich eine Verzögerung von $5,2 \pm 0,23$ Std/Gy und für L 929 Zellen $14,4 \pm 0,61$ Std/Gy; L 929 Zellen werden deutlich länger verzögert (Faktor 2,8). Mit diesen Werten kann keine absolute Teilungsverzögerung bestimmt werden, sie ermöglichen jedoch einen Vergleich zwischen verschiedenen Zelllinien.

2.1.2 Flußzytometrische Analyse alphabestrahelter Zellen

Die zeitliche Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen (G1, S, G2 und M) ist ein charakteristischer Parameter jeder Zelllinie und bestimmt die Verteilung einer exponentiell wachsenden Zellpopulation auf die einzelnen Phasen zu einem bestimmten Meßpunkt. Eine Veränderung dieser Zellzyklusphasenverteilung deutet eine Verschiebung des Gleichgewichts an. Eine Phasenverzögerung wird durch Akkumulation von Zellen in dieser Phase angezeigt.

Mit Hilfe der Zytometrie konnte gezeigt werden, daß die alphabestrahnten Zellen in der prämitotischen G2-Phase verzögert werden. In Abbildung 4 sind DNA-Histogramme von unbestrahlten V 79 Zellen und von alphabestrahnten Zellen zu verschiedenen Zeiten (2-12 Std.) nach Bestrahlung mit 0,88 Gy und 1,75 Gy gezeigt. Eine Blockierung bzw. Verzögerung der Zellen in der G2-Phase bewirkt ein Absinken der G1-Anteile (linker Peak im Histogramm) mit anschließendem Auslaufen der S-Kompartimente. Das Ansammeln eines Großteils der Zellen im G2+M-Kompartiment bestätigt eine drastische Verlängerung dieser Phase. Erst 8 - 10 Stunden nach Bestrahlung kommt es zu einem Wiederanstieg in G1, der zeigt, daß bei diesen Dosen die Blockierung teilweise reversibel ist.

Obwohl die Zytofluorometrie zwischen G2-Zellen und Mitosen nicht differenzieren kann (gleicher DNA-Gehalt), konnte aufgrund der niederen Mitoseindices nach Bestrahlung (Abbildung 3) die im G2+M-Kompartiment angesammelten Zellen als G2-Zellen identifiziert werden.

Aus den DNA-Histogrammen wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (Material u. Methoden, 3.3.1) die prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen errechnet. Der zeitliche Verlauf der strahleninduzierten Veränderungen in den einzelnen Phasen ist für V 79 und L 929 Zellen in Abbildung 5 gezeigt. Die Zellzyklusveränderungen sind dosisabhängig. Bei V 79 wurden nach 0,88 Gy maximal 58 % und nach 1,75 Gy 78 % in G2+M akkumuliert. Bestrahlung von L 929 Zellen führt ebenfalls zur Ansammlung von Zellen in G2+M, 34 % nach 0,15 Gy und 61 % nach 0,88 Gy.

Die Blockierung der Zellen in G2 ist nach Dosen < 0,5 Gy vollständig und bis etwa 1 Gy teilweise reversibel für beide Zelllinien (Abbildung 6). Nach einer Dosis von 4,38 Gy steigt jedoch der Anteil von G2+M-Zellen bei V 79 bis 16 Stunden nach Bestrahlung weiter leicht an. Bei dieser hohen Dosis wurde keine Reversibilität sichtbar. Mit steigender Dosis kommt es außerdem bei beiden Zelllinien zu einer leichten zeitlichen Verschiebung der G2-Maxima um maximal 2 Stunden.

Die Akkumulation von Zellen in G2+M verläuft im Dosisbereich bis zu 1 Gy linear (Abbildung 7). Am Ende des linearen Anstiegs waren 70 % V 79 und 50 % L 929 Zellen im G2+M-Kompartiment aufgelaufen. Diese prozentualen Anteile entsprechen der Häufigkeit von S- und G2+M-Zellen in Kontrollpopulationen (Tabelle 2), woraus geschlossen werden kann, daß im linearen Bereich hauptsächlich Zellen erfaßt werden, die in S oder G2+M bestrahlt wurden.

Ein Vergleich der linearen Steigungen der Dosis-Effekt-Kurven zwischen V 79 und L 929 Zellen ergibt einen Unterschied ($FG2 \frac{L929}{V79}$) von 1,5. Dieser Faktor kann als Maß für den Empfindlichkeitsunterschied zwischen beiden Zelllinien betrachtet

werden. Er stimmt mit dem Empfindlichkeitsunterschied für das Zellüberleben (1,5) überein. Die leicht meßbare G2-Blockierung liefert somit bereits eine Aussage über die Strahlenempfindlichkeit einer Zelllinie in Bezug auf den Zelltod.

2.1.3 Analyse der Zyklusveränderungen durch fusionsinduzierte vorzeitige Chromosomenkondensation

Die durch Sendai Virus induzierte Fusion von V 79 Interphasezellen mit V 79 Mitosen führt zur Kondensation des Interphasechromatins. Anhand ihrer unterschiedlichen Morphologie (Material u. Methoden, 3.3.4) können danach die Interphasezellen in G1, S und G2 differenziert werden. Abbildung 8 zeigt typische Bilder unbestrahlter V 79 Zellen.

In G1-Zellen haben die vorzeitig kondensierten Chromosomen nur ein langes, meist spiralisches Chromatid. In G2-Zellen sind die Chromosomen deutlich länger als Mitosechromosomen und haben zwei Chromatiden. In S-Zellen ist das vorzeitig kondensierte Chromatin "pulverisiert", was dem weitgehend dekondensierten Zustand des Chromatins während der DNA-Synthese entspricht.

Aus der Häufigkeit der verschiedenen PCC-Formen ergeben sich Zellzyklusverteilungen von exponentiell wachsenden V 79 Zellen (Tabelle 2). Der S-Anteil von 58 % stimmt gut mit dem Markierungsindex von 59 % überein, liegt aber etwas höher als der zytofluorometrisch ermittelte Wert von 50 %. Der Unterschied kann dadurch erklärt werden, daß sehr frühe S-Zellen bei der Zytofluorometrie noch zur G1-Phase gerechnet werden.

Die Auswertung der G2-Anteile in alphabestrahlten V 79 Zellen mittels der PCC-Technik in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung (Abbildung 9) zeigt einen Anstieg der G2-Zellen mit Maxima von 70 % (1,75 Gy) und 86 % nach 4,38 Gy. Diese Werte sind etwas niedriger als die mit der Flußzytofluorometrie ermittelten. Vor allem zu frühen Zeiten nach Bestrahlung (bis ca. 8 Std.) liegen die mit der PCC-Technik ermittelten G2-Anteile niedriger, zu späteren Zeiten erfolgt eine Annäherung beider Methoden (Tabelle 3).

Der dosisabhängige Anstieg der G2-PCC unterscheidet sich im niederen Dosisbereich bis etwa 0,6 Gy nicht von den zytofluorometrischen Werten (Abbildung 10). Im höheren Dosisbereich ergeben sich jedoch Diskrepanzen um 5 - 9 %, die dadurch erklärt werden können, daß stark geschädigte G2-PCC aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit späten S-PCC dem S-Anteil zugeordnet werden.

2.2 Proliferationskinetische Veränderungen in synchronisierten Kulturen

Mit Hilfe von synchronisierten Zellen wurden altersbedingte Empfindlichkeitsunterschiede nach Alphabestrahlung untersucht. L 929 Zellen wurden durch Serumentzug in der G₀-Phase akkumuliert (83 %). Nach Überimpfen in neue Kulturgefäße mit serumhaltigem Medium wuchsen die Zellen synchron weiter.

Zellen, die in der G1-Phase (6 Stunden nach Plattieren) mit Alphateilchen bestrahlt werden, zeigen nach 0,15 Gy und 0,30 Gy nur eine geringe Verzögerung in der S- und G2-Phase (Abbildung 11, I). Die Verzögerung ist dosisabhängig und beträgt 4 Std/Gy, wenn sie aus den Zeitdifferenzen zwischen den Mittelpunkten der aufsteigenden und abfallenden Flanken der G2+M-Kurven (Ic) für jede Dosis berechnet wird.

Zellen, die in S bestrahlt werden (20 Stunden nach Plattieren), werden in der S-Phase nicht, in der G2-Phase jedoch besonders drastisch (18 Std/Gy) verzögert (Abbildung 11, II).

S-Phase Zellen sind somit bezüglich der G2-Verzögerung nach Alphabestrahlung 4,5 mal empfindlicher als Zellen, die in G1 bestrahlt werden.

3. Zytogenetische Analyse G2-blockierter Zellen

Alle drei Methoden, Durchflußzytofluorometrie, Bestimmung des Mitoseindex und PCC-Technik zeigen einen drastischen Anstieg von G2 Zellen. Dabei wurde mit der PCC-Technik deutlich, daß das Chromatin bestrahlter Zellen stark geschädigt ist. Diese Schäden wurden näher untersucht.

3.1 Bestimmung von Chromosomenaberrationen in G2-blockierten Zellen

Während früher Chromosomenaberrationen nur an mitotischen Zellen bestimmbar waren, ist es seit Einführung der PCC-Technik möglich, auch Schäden der Chromosomenstruktur am Interphasechromatin von G1 und G2 Zellen mit dem Lichtmikroskop zu untersuchen. Die PCC-Technik hat nicht nur den Vorteil, daß schon nach kurzen Zeitintervallen Chromosomenschäden erkannt werden können, sondern sie ist auch in der Lage, Schäden in Zellen nachzuweisen, die vielleicht nie mehr die Metaphase erreichen.

Nach Alphabestrahlung ist das Chromatin G2-blockierter Zellen stark geschädigt. Der Anteil aberranter G2-PCC steigt mit zunehmender Strahlendosis an (Abbildung 12). Im niederen Dosisbereich ($< 0,5$ Gy) nimmt der Prozentsatz aberranter G2-Zellen schnell bis etwa 78 % zu, um dann unter geringem Anstieg bei 4,38 Gy 93 % zu erreichen.

Die Aberrationen sind vergleichbar mit solchen, die üblicherweise nach ionisierender Strahlung in Metaphasechromosomen gefunden werden: Brüche, dizentrische und azentrische Chromosomen, sowie verschiedene Austauschfiguren. Diese aberranten G2-Zellen werden mit G2* bezeichnet. Bei genauer Betrachtung des aberranten Chromatins zeigt es sich jedoch, daß neben den bekannten Aberrationen auch Zellen auftreten, die kaum dizentrische Chromosomen oder Austausche aufweisen, dafür umso mehr Brüche und dekondensierte Bereiche (Abbildung 13). Diese im folgenden als G2** bezeichneten Zellen sind damit sehr späten S-Phasezellen ähnlich. Sie unterscheiden sich jedoch von diesen durch das Vorhandensein von Chromosomen, die bezüglich Kondensationsgrad und Doppelsträngigkeit (2 Chromatiden) eindeutig als vorzeitig kondensierte G2-Chromosomen identifiziert werden können.

Bei Strahlendosen zwischen 0,1 und 1,75 Gy überwiegen G2* Aberrationen deutlich; das Verhältnis (G2*/G2**) beträgt 2,6

(Tabelle 3). Nach höheren Dosen (2,5 - 4,38 Gy) kommt es dagegen zu einer Zunahme der G2** ($G2^*/G2^{**} = 1,1$).

Für zwei Dosen (1,75 und 4,38 Gy) wurde das zeitabhängige Auftreten aberranter G2-PCC bestimmt. Tabelle 4 zeigt, daß das Maximum aberranter G2-Zellen bereits 8 Stunden nach der Bestrahlung erreicht ist und über den Untersuchungszeitraum von 16 Stunden relativ konstant bleibt. Die prozentuale Aufteilung der Aberrationen auf die beiden PCC-Formen G2* und G2** ändert sich jedoch: G2*/G2** steigt mit der Zeit der Inkubation nach Bestrahlung.

3.2 ³H-Thymidin-Einbau in G2-blockierte Zellen

Einbau von Thymidin erfolgt normalerweise nur während der DNA-Synthesephase des Zellzyklus. Strahlengeschädigte Zellen können jedoch ³H-Thymidin für die Reparatursynthese während der gesamten Interphase einbauen. Sollte in G2-blockierten Zellen, in denen Schäden mit der PCC-Technik sichtbar wurden, Reparatursynthese stattfinden, müßte man an entsprechenden Bereichen der vorzeitig kondensierten Chromosomen Markierung durch ³H-Thymidin finden.

Erwartungsgemäß sind alle S-PCC stark markiert. G2-PCC sind nur nach Alphabestrahlung markiert, jedoch nur dann, wenn sie Aberrationen aufweisen. Die Markierung wird an den geschädigten Bereichen des Chromatins gefunden. Für quantitative Vergleiche wurde bei der autoradiographischen Auswertung die Anzahl der Silberkörner über den Aberrationen gezählt. Dabei zeigen sich auffällige Unterschiede zwischen G2* und G2** Zellen, die 9 ± 3 bzw. 27 ± 6 Silberkörner aufweisen (Tabelle 5). Die Ergebnisse sprechen eindeutig für Reparatur am G2-Chromatin während der G2-Blockierung.

Zur eindeutigen Festlegung, ob es sich beim Einbau des radioaktiven ³H-Thymidin tatsächlich um Reparatursynthese gehandelt hat, wurde in Zusatzexperimenten den Zellkulturen Hydroxymethylharnstoff (5×10^{-3} M) zugesetzt. Hydroxymethylharnstoff ist bekannt

dafür, bei Verabreichung eine Stunde vor und während der ^3H -Thymidin-Markierung durch Hemmung der Reduktion vom Ribonukleotid zum Desoxyribonukleotid die semikonservative DNA-Replikation zu verhindern. Aus Tabelle 5 wird deutlich, daß die verwendete Konzentration an Hydroxyharnstoff erwartungsgemäß die DNA-Synthese in S-Zellen stark hemmt (Markierungsindex: 59 % \rightarrow 9 %; Körner in S-PCC: 70 \rightarrow 10). Hydroxyharnstoff hat auch noch deutliche Wirkung auf die Anzahl der Silberkörner in G2**⁻Zellen (27 \rightarrow 15), bei G2*⁻-PCC wird die Markierung jedoch nicht reduziert.

3.3 Beeinflussung des Alphastrahlen-induzierten G2-Blocks durch Coffein

Durch Gabe von Coffein (2 mmol) nach Alphabestrahlung kann die Verzögerung der V 79 Zellen in der G2-Phase teilweise verhindert werden (Lücke-Huhle, Radiat. Res., 1982), so daß keine bzw. nur geringe Ansammlung der Zellen im G2-Kompartiment nachweisbar ist. Wird Coffein erst zu späteren Zeiten (8 - 10 Std. nach Bestrahlung) gegeben, wenn sich bereits ein Großteil der bestrahlten Zellen in G2 befinden, wird die G2-Blockierung aufgehoben und die Zellen gehen in die Mitose.

Die Aufhebung der G2-Blockierung kann auch mit Hilfe des kumulativen Mitoseindex gezeigt werden, indem alphabestrahlte Zellen (4,38 Gy) 8 Stunden nach Bestrahlung mit 2 mmol Coffein und 0,17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Colcemid für 3,5 Std inkubiert wurden. Anschließend wurde an Cytozentrifugenpräparaten der Anteil der akkumulierten Mitosen pro 1000 Zellen bestimmt. Während ohne Coffein nur 2,1 % gezählt wurden, hatten sich bei Coffein-behandelten Zellen 24 % in der Mitose angesammelt (Abbildung 14).

Mit Hilfe der fusionsinduzierten vorzeitigen Chromosomenkondensation sollte die Wirkung von Coffein auf die aberranten G2-PCC untersucht werden. Werden bestrahlte Zellen (4,38 Gy) 10 Stunden später mit Coffein behandelt und 2 Stunden später fusioniert, ist der Anteil der G2-PCC mit 59 % deutlich niedriger als bei bestrahlten Zellen ohne Coffeinbehandlung (94 %) (Tabelle 6). Gleichzeitig nimmt der Prozentsatz der G1-Zellen

zu. Dies zeigt, daß Zellen, die durch Coffein die G₂-Blockierung überwinden können, die mitotische Teilung durchlaufen und zwei Tochterzellen entstehen. Der prozentuale Anteil aberranter G₂-Zellen wird durch Coffein nicht signifikant verändert; dies trifft auch auf die einzelnen Klassen (G₂* und G₂***) zu (Tabelle 6). Dies bedeutet, daß zum einen durch Coffein nicht die Morphologie der zurückgebliebenen Zellen verändert wird, zum anderen, daß G₂* und G₂** gleich effektiv durch Coffein aus dem G₂-Kompartiment ausgeschleust werden.

Mitotische Zellen, die durch Coffeinbehandlung G₂-blockierter Zellen erhalten wurden, konnten mit exponentiell wachsenden V 79 Zellen sowie mit Zellen, die durch Alphabestrahlung in G₂ arretiert waren, fusioniert werden. Dabei zeigte es sich, daß solche meist stark geschädigte Mitosen in bestrahlten und unbestrahlten Interphasezellen vorzeitige Chromosomenkondensation induzieren können. Die benötigten Induktormoleküle zur vorzeitigen Kondensation sind somit in diesen Mitosen in ausreichendem Maß vorhanden.

Pulsmarkierung G₂-blockierter Zellen mit ³H-Thymidin während der Coffeinbehandlung und nachfolgende Fusion sollte Aufschluß geben, ob durch Coffein die Reparatursynthese in G₂-blockierten Zellen verhindert wird. Zellen, die nach einstündiger Coffeinbehandlung noch in G₂ waren, zeigen jedoch keine signifikante Reduzierung der ³H-Thymidinmarkierung. Die Wirkung von Coffein scheint daher nicht auf einer Inhibierung der Inkorporation von DNA-Bausteinen - als Maß für Reparatursynthese - in G₂-blockierten Zellen zu beruhen.

Untersuchungen mit radioaktivem Coffein, die Aufschluß über die Lokalisierung bzw. Bindung von Coffein in der Zelle geben sollten, zeigen, daß der überwiegende Teil (70 %) der Markierung durch 8-³H-Coffein (100 µCi/ml, spez. Aktivität 21 Ci/mmol; Amersham) bei der autoradiographischen Auswertung über dem Zellkern von G₂-blockierten Zellen lokalisiert ist. Dichtere Chromatinbereiche zeigen intensivere Markierung, ein Hinweis für eine Bindung an Chromatin oder DNA. In fusio-

nierten G2-Zellen mit vorzeitiger Chromosomenkondensation ist die Markierung jedoch nicht bevorzugt über den Chromosomen zu finden.

Dieser Befund ist möglicherweise durch die präparative Behandlung bei der Zellfusion (viele Waschvorgänge) bedingt, was auf eine schwache, instabile Bindung von Coffein im Zellkern schließen läßt.

4. Genexpression in alphabestrahlten V 79 Zellen

Veränderungen in der Genexpression, die als Folge oder möglicherweise als Ursache für die strahleninduzierte G2-Blockierung in Frage kommen, wurden mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht. Die Methode ermöglicht, Veränderungen in der Syntheserate von ca. 1000 zellulären Proteinen sichtbar zu machen.

4.1 Induktion und Repression von Proteinen nach Alpha- bestrahlung

V 79 Zellen, die mit 4,38 Gy Alphateilchen bestrahlt wurden, zeigen signifikante Veränderungen der Syntheserate von 3 Proteinen (P1, P2 und P3), während alle anderen sichtbaren Proteine mit vergleichbarer Rate wie bei unbestrahlten Kontrollzellen synthetisiert werden (Abbildung 15). Das Protein P3 wird nach Bestrahlung mit Alphateilchen mit hoher Rate synthetisiert, während es in Kontrollzellen kaum nachweisbar ist. Das Protein P1 wird nach Bestrahlung vermindert synthetisiert, die Synthese von Protein P2 dagegen wird deutlich stimuliert.

4.1.1 Zeitlicher Verlauf der Syntheseveränderungen

Die Repression der Syntheserate von P1 und die Induktion von P2 und P3 wurde über einen Zeitraum von 46 Stunden nach Bestrahlung untersucht (Abbildung 16). Für die Quantifizierung der Syntheseraten wurde die Filmschwärzung der einzelnen Proteinflecken durch densitometrische Messungen bestimmt, wobei die Absorption des Lichtstrahls durch die Filmschwärzung proportional der im Markierungszeitraum synthetisierten Pro-

teinmenge ist. Die Syntheseraten sind als relative Einheiten, bezogen auf ein Protein mit gleichbleibender Syntheserate (Referenzprotein), angegeben.

Die Syntheserate von P1 geht bis 24 Stunden nach Bestrahlung von 0,7 auf 0,1 zurück, danach erfolgt wieder ein leichter Anstieg (0,3). Die Syntheseraten von P2 und P3 beginnen acht Stunden nach der Bestrahlung anzusteigen. Die relative Proteinsynthese von Protein P2 steigt dabei von 0,45 auf 1,5 nach 32 Stunden an (Faktor $\sim 3,3$). Das Protein P3, das in den Kontrollfluorogrammen kaum nachweisbar ist (0,1), wird derart stimuliert, daß die Syntheserate von anfänglich 0,1 auf 1,4 (40 Stunden nach Bestrahlung) erhöht wird (Faktor ~ 14).

4.1.2 Dosisabhängige Syntheserate von P1, P2 und P3

Exponentiell wachsende V 79 Zellen wurden mit verschiedenen Dosen im Bereich von 0,88 Gy bis 4,38 Gy bestrahlt und die Veränderungen der Syntheseraten 24 Stunden nach Alphastrahlung untersucht.

Abbildung 17 zeigt, daß die Syntheserate von P1 mit steigender Strahlendosis bis auf 1/7 (4,38 Gy) der anfänglichen Rate zurückgeht. Das Protein P2 wird durch Strahlendosen $> 0,88$ Gy stark stimuliert (0,5 \rightarrow 1,18). Die Syntheserate von P3 steigt bis 2,5 Gy nahezu linear mit der Dosis von 0,1 auf 0,7 an; eine höhere Dosis (4,38 Gy) führt zu keiner weiteren Erhöhung der Syntheserate.

4.2 Experimente zur Charakterisierung der Proteine

4.2.1 Bestimmung der Molekulargewichte

Hierzu wurden die Proteine zusammen mit ^{14}C -Markerproteinen (Amersham) in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel reelektrophoretisiert (Abbildung 18). Für P1 wurde ein Molekulargewicht von ca. 39000 D, für P2 von ca. 42000 D und für P3 von ca. 60000 D ermittelt.

4.2.2 Verwandtschaft der Proteine P1 und P2

Aufgrund der ähnlichen elektrophoretischen Eigenschaften der Proteine P1 und P2 bezüglich ihres Molekulargewichts und des isoelektrischen Punkts wurde mit Hilfe eines limitierten Verdau durch V 8 Protease eine mögliche Verwandtschaft der Proteine untersucht.

Die beiden Proteine zeigen unterschiedliche Fragmentmuster (Abbildung 19), so daß eine Verwandtschaft bezüglich des Aufbaus (Primärstruktur) nicht vorliegt.

4.3 Zellzyklusabhängigkeit der Synthese von P1, P2 und P3

Ob die strahleninduzierten Veränderungen der Syntheserate von P1, P2 und P3 charakteristisch für G2-blockierte Zellen nach Alphabestrahlung sind oder auch unbestrahlte Zellen Variationen in der Syntheserate während des Zellzyklus zeigen, wurde mit Hilfe synchronisierter V 79 Zellen untersucht (Tabelle 7).

Während Protein P1 mit steigendem Alter der Zelle bis zur G2-Phase vermehrt synthetisiert wird, fällt seine Syntheserate mit der Mitose wieder ab. Die Syntheseraten von P2 und P3 sind in G1 und S konstant, gegen Ende des Zellzyklus (G2+M) sind sie jedoch etwas erhöht.

Alle beschriebenen Unterschiede der Syntheseraten während des Zellzyklus sind jedoch wesentlich geringer als die, die durch Alphabestrahlung in exponentiell wachsenden V 79 Zellen induziert werden können.

4.4 Synthese der Proteine nach Proliferationsblockierung durch verschiedene Noxen

Es ist denkbar, daß die Veränderungen der Syntheserate der drei Proteine nach Alphabestrahlung nicht durch den eigentlichen Schaden, sondern durch die gleichzeitig auftretende Proliferationsblockierung verursacht werden. Daher wurde untersucht, ob durch andere Noxen, die ebenfalls eine Blockierung der Proliferation bewirken, vergleichbare Veränderungen induziert werden.

4.4.1 Akkumulation der Zellen in der G_0 -Phase durch Serum-entzug

Zellen, die durch Serumentzug (Material u. Methoden, 2.3.2) am Weiterwachsen gehindert werden, sammeln sich in der G_0 -Phase an und werden dort arretiert bis sie wieder bessere Wachstumsbedingungen vorfinden. Solche proliferationsblockierten V 79 Zellen ($\sim 85\%$) synthetisieren Protein P3 mit 6-facher Rate im Vergleich zu exponentiell wachsenden Kulturen. Die Syntheserate von P1 wird um ca. 30 % reduziert, die von P2 um den Faktor 1,4 erhöht (Tabelle 8).

4.4.2 Proliferationsblockierung in S nach UV-Bestrahlung

Nach UV-Bestrahlung (15 J/m^2) werden Zellen vor allem in der S-Phase arretiert, da die DNA-Replikation stark gehemmt wird.

Das Protein P3 zeigt sowohl 15 Stunden als auch 32 Stunden nach UV-Bestrahlung eine um das 7-fache erhöhte Syntheserate, ein Wert, der demjenigen 24 Stunden nach Alphabestrahlung (4,38 Gy) entspricht. Die Syntheserate von P1 dagegen wird durch UV-Bestrahlung nicht wesentlich beeinflusst. Protein P2 wird 15 Stunden nach UV-Bestrahlung mit etwa 30 % reduzierter Rate synthetisiert (vergleichbar mit synchronisierten S-Zellen), zum späteren Zeitpunkt erfolgt wieder eine Erhöhung auf das 1,4-fache des Kontrollwertes.

4.4.3 Proliferationsblockierung durch Purinentzug in V 79 pur1 Mutanten

V 79 pur1, eine Mutante von V 79 Zellen, weist einen Defekt im Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase-Gen auf. Dieses Enzym wird für die Purinbiosynthese benötigt, so daß solche Zellen externes Purin für das Wachstum benötigen.

In Nährmedium, in dem Purin (Thymidin oder Hypoxanthin) enthalten ist, proliferieren die Mutanten ähnlich den Elternzellen und zeigen vergleichbare Syntheseraten der Proteine P1, P2 und P3 (Tabelle 9). Transferiert man die Mutanten jedoch in purinfreies Medium, stellen sie ihr Wachstum ein und

werden größtenteils an der G1/S-Grenze arretiert. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine Stimulation der Synthese von P3 (Faktor 2,8). Die Syntheserate von Protein P1 wird um ca. 50 % verringert.

4.4.4 Proliferationsblockierung durch Alphabestrahlung und Purinentzug

Werden V 79 pur1 Zellen in purinhaltigem Medium mit 4,38 Gy Alphateilchen bestrahlt, erfolgt wie beim Wildtyp eine drastische Blockierung in G2 (82 %). Auch die Veränderungen in der Syntheserate der drei Proteine werden induziert. Wie Tabelle 9 zeigt, wird Protein P3 um das 4-fache stimuliert, die Syntheserate von P1 auf etwa 25 % reduziert. Protein P2 wird allerdings nur leicht (Faktor 1,2) stimuliert.

In purinfreiem Medium, in dem die Mutanten nach Alphabestrahlung nicht bis zur G2-Phase proliferieren können, sondern bereits an der G1/S-Grenze arretiert werden, findet man für P1 und P3 vergleichbare Syntheseraten wie in purinhaltigem Medium. Die Syntheserate von P2 dagegen wird nicht stimuliert, sondern auf ca. 25 % reduziert, vergleichbar mit Zellen, die UV-bestrahlt wurden, oder mit synchronisierten Zellen in G1 oder S.

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

Jede getestete Proliferationsblockierung führt zur Induktion bzw. Stimulation der Synthese von Protein P3, sowohl im V 79 Wildtyp als auch in der Mutante V 79 pur1. Von allen Agenzien zeigt Alphabestrahlung die höchste Effektivität.

Jede Proliferationsblockierung verursacht eine Repression der Synthese von Protein P1, wiederum am effektivsten durch Alphateilchen.

Beide Effekte, Induktion von P3 und Repression von P1 sind unabhängig von der Zellzyklusphase, in der die Blockierung stattfindet.

Die Stimulation von Protein P2 tritt nach Serumentzug und besonders deutlich nach Alphabestrahlung auf. Alphabestrahlung der Mutante unter purinfreien Bedingungen und UV-Bestrahlung verursacht dagegen einen Syntheserückgang von Protein P2.

D. DISKUSSION

Bestrahlung von Säugetierzellen mit ionisierenden Strahlen verursacht drastische Schädigungen der Zellen, die in Veränderungen des Zellzyklus, Chromosomenaberrationen und Absterben der Zellen zum Ausdruck kommen. Das Ausmaß dieser Strahlenwirkungen ist nicht nur abhängig von der Strahlendosis, sondern auch von der Ionisierungsdichte der verwendeten Strahlung. Die Abtötungseffizienz nimmt mit steigendem LET zu und erreicht bei etwa $100 \text{ keV}/\mu$ ein Maximum (Barendsen et al., 1963). Ebenso werden Chromosomenaberrationen und Teilungsverzögerungen am effektivsten durch dicht-ionisierende Strahlung mit einem LET von $100 - 200 \text{ keV}/\mu$ induziert (Skarsgard, 1967). Auch für die hier untersuchte Blockierung in G2 wird mit $100 \text{ keV}/\mu$ ein Optimum erreicht. Nach Bestrahlung von V 79 Zellen mit beschleunigten Ionen unterschiedlicher Ionisierungsdichte zeigt sich die höchste Effizienz für die Teilungsverzögerung (G2-Blockierung) nach 425 MeV-Neutronen mit einem LET von $100 \text{ keV}/\mu$ (Lücke-Huhle et al., 1979). Diese Befunde sprechen für die Verwendung von Alphateilchen ($\text{LET} \sim 120 \text{ keV}/\mu$) zur Untersuchung der Mechanismen der G2-Blockierung.

Die höhere biologische Effektivität von Hoch-LET-Strahlung hinsichtlich der Zellinaktivierung, wie sie von Barendsen et al., 1960, Hall et al., 1972, Raju et al., 1974 und Lücke-Huhle et al., 1979 beschrieben ist, wird in dieser Arbeit ebenfalls für $^{241}\text{Americium}$ -Alphateilchen bestätigt. Auch im Hinblick auf die Teilungsverzögerung (G2-Blockierung) sind Alphateilchen besonders wirksam. Die höhere Effektivität wird nicht nur bei V 79 und L 929 Zellen gefunden, sondern ist auch in anderen Zelllinien tierischer und menschlicher Herkunft feststellbar, wobei die RBE-Werte für Zellinaktivierung und G2-Blockierung korrelieren (Lücke-Huhle et al., 1982a).

Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit in Abhängigkeit von der Zellart und dem Zellzyklusstadium zum Zeitpunkt der Bestrahlung

Säugetierzellen unterscheiden sich nur wenig in ihrem DNA-Gehalt. Dennoch sind Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit zwischen Zelllinien aus verschiedener oder gleicher Species in der Literatur dokumentiert (Elkind und Whitmore, 1967). Die unterschiedliche Sensitivität ist ein Hinweis auf das Reparaturvermögen von Zellen, da vorausgesetzt werden kann, daß pro Ionisationsereignis der gleiche Schaden induziert wird.

Bei der Bestrahlung mit Alphateilchen werden ebenfalls Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit zwischen V 79 Hamsterzellen und L 929 Mäusefibroblasten sowohl im Hinblick auf die Zellinaktivierung (Abb. 2) als auch bezüglich der G2-Blockierung (Abb. 7) gefunden. L 929 Zellen sind für beide Effekte um den Faktor 1,5 empfindlicher als V 79 Zellen. Diese Korrelation ist neben der LET-Abhängigkeit der Strahlenwirkung ein weiterer Hinweis dafür, daß sowohl für Zellinaktivierung als auch G2-Blockierung die Schädigung der gleichen zellulären Struktur (Target) verantwortlich gemacht werden kann.

Für die Zellinaktivierung werden nach locker-ionisierender Strahlung bereits Empfindlichkeitsunterschiede verschiedener Zelllinien und Unterschiede in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase, in der bestrahlt wird, beschrieben (Terasima und Tolmach, 1963b; Sinclair und Morton, 1965; Whitmore et al., 1965). Dabei nimmt die Strahlenempfindlichkeit mit der Progression durch den Zellzyklus (von G1 nach M) zu. Bei Zelllinien mit langer G1-Phase (z.B. HeLa oder L Zellen) tritt neben dem Resistenzmaximum in der G1-Phase eine besonders hohe Sensitivität am G1/S-Übergang bzw. in der frühen S-Phase auf. Zunehmende Empfindlichkeit mit dem Zellalter (von G1 nach G2) wurde nach locker-ionisierender Strahlung auch für die Teilungsverzögerung beschrieben (Leeper et al., 1972).

In der vorliegenden Arbeit werden solche altersbedingte Empfindlichkeitsunterschiede für die Teilungsverzögerung nach dicht-

ionisierender Strahlung nachgewiesen. Synchronisierte L 929 Zellen, mit Alphateilchen in der S-Phase bestrahlt, werden 4,5fach effektiver in G2 blockiert als in G1 bestrahlte Zellen (Abb. 11). Die Sensitivität von G2-Zellen konnte an synchronisierten Zellen nicht bestimmt werden, da durch Synchronisation keine reinen G2-Populationen erhalten wurden. Mit der BUdR-33258 Hoechst Technik (Beck, 1981) wird jedoch nach Alphabestrahlung die effektivste G2-Verzögerung für Zellen nachgewiesen, die in der G2-Phase bestrahlt wurden (Hieber et al., 1981). Zugleich wird hohe Sensitivität für Zellen an der G1/S-Grenze, beziehungsweise in der frühen S-Phase beobachtet, ein Befund, der in Übereinstimmung mit der Zellinaktivierung nach Röntgenstrahlen steht (Whitmore et al., 1965; Fidorra, 1977).

Die Korrelation zwischen G2-Blockierung und Zellinaktivierung in Abhängigkeit von der Zellart und dem Zellalter, die nach locker- und dicht-ionisierender Strahlung nachweisbar ist, unterstützt die Vorstellung, daß ein kausaler Zusammenhang dieser biologischen Strahlenwirkungen besteht. Die Verzögerung in G2 könnte als zellulärer Mechanismus gesehen werden, während der über Tod oder Überleben der bestrahlten Zelle entschieden wird. Da die G2-Verzögerung im Gegensatz zur Zellinaktivierung direkt nach Bestrahlung gemessen werden kann und bereits Aussagen über das Ausmaß der Zellabtötung liefert, kann die Messung dieses Phänomens als frühe Kontrolle von Strahleneffekten dienen.

G2-Blockierung als Folge von Chromatinschäden und deren Reparatur unter Kontrolle spezifischer Proteine

Auf Grund der Korrelation zwischen Zellinaktivierung, Teilungsverzögerung und Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit von der Ionisierungsdichte (Skarsgard, 1967), wird die Hypothese diskutiert, daß Chromosomenaberrationen die Ursache von Teilungsverzögerung (G2-Blockierung) und Zelltod darstellen. Allerdings wird dieser kausale Zusammenhang dadurch gestört, daß die RBE-Werte für Chromosomenaberrationen nach Hoch-LET-Strahlung nie-

driger sind als für die Zellinaktivierung (Zoetelief und Barendsen, 1980; Edwards et al., 1979). Wie kann diese Diskrepanz erklärt werden?

In der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe der PCC-Technik gezeigt, daß nach Alphabestrahlung solche Zellen in G2 blockiert werden (80 - 93 %), die massive Aberrationen aufweisen. Da diese Zellen teilweise irreversibel blockiert bleiben, möglicherweise aufgrund der Kondensationsunfähigkeit des geschädigten Chromatins, entziehen sie sich der Aberrationsanalyse in Metaphaseplatten.

Die in Abbildung 9 aufgezeigten Unterschiede der G2-Fraktionen zwischen zytofluorometrischer Messung und PCC-Analyse, kann durch Unterbewertung von G2-Zellen bei der PCC-Technik bedingt sein. Sehr stark geschädigte G2-PCC werden mit zunehmender Häufigkeit von Brüchen und dekondensierten Bereichen späten S-PCC ähnlich und wurden im Zweifelsfall immer dem S-Anteil der Population zugeordnet. Falls diese Zellen jedoch stark geschädigte G2-Zellen sind, wäre der Anteil aberranter, G2-blockierter Zellen in der Gesamtpopulation um durchschnittlich 3 % höher.

Um entscheiden zu können, ob die G2-Blockierung und die Chromatinschädigung in kausalem Zusammenhang stehen, oder nur unabhängige Ausprägungen der Strahlenwirkung sind, wurde untersucht, welche Prozesse während der Zeit der G2-Verzögerung stattfinden.

Die Inkorporation von ^3H -Thymidin in G2-blockierte Zellen ist ein Hinweis auf Reparaturprozesse während der G2-Blockierung. Die Markierung durch ^3H -Thymidin ist über den Schadenstellen der G2-PCC lokalisiert. Da der Einbau von Thymidin durch Hydroxyharnstoff in G2*-PCC nicht, in G2** nur zum geringen Prozentsatz hemmbar ist, ist die Inkorporation des DNA-Bausteins als Reparatursynthese zu werten. Ein weiterer Hinweis auf Reparatur ist darin zu sehen, daß mit zunehmender Zeit während der Blockierung der Anteil der G2**-Zellen (viele Brüche und dekondensierte Zonen) zugunsten G2* mit weniger

Aberrationen abnimmt (Tabelle 4). Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden von Hittelman und Rao (1974), die eine Abnahme von Aberrationen (Lücken und Brüche) von der G₂-Phase zur Mitose in CHO-Zellen nach Röntgenstrahlen finden und dies als Reparaturreffekt interpretieren.

Verkürzt oder inhibiert man die G₂-Blockierung von alphastrahlten Zellen künstlich durch Gabe von 2 mM Coffein und ermöglicht dadurch den Zellen vorzeitig die mitotische Teilung (Abb. 14), wird das Zellüberleben drastisch gesenkt (Lücke-Huhle, 1982). In Mitosen, die durch Wirkung von Coffein die G₂-Blockierung überwinden, ist der Anteil aberranter Metaphasen stark erhöht (65 % → 99,9 % nach 4,38 Gy). Gleichzeitig steigt der Prozentsatz der Zellen mit mehr als 5 Brüchen von 14 % auf 79 % an (Lücke-Huhle et al., 1982b). Coffein allein zeigt in der verwendeten Konzentration keinen Einfluß auf Chromosomenaberrationen und "plating efficiency" von Kontrollzellen. Auf welche Weise wirkt Coffein in G₂-blockierten Zellen?

Die PCC-Analyse zeigt, daß zwei Stunden nach Coffeingabe der Anteil G₂-blockierter Zellen zwar deutlich niedriger ist (94 % → 59 %), der Prozentsatz aberranter G₂-PCC in den verbleibenden G₂-Zellen sich jedoch nicht ändert (Tabelle 6). Ebenso unbeeinflusst durch Coffein ist die ³H-Thymidininkorporation in verbleibenden G₂-Zellen. Die Wirkung von Coffein in G₂-blockierten Zellen kann somit nicht in direkter Hemmung der Reparatursynthese gesehen werden. Es ist jedoch denkbar, daß auf Grund der Bindungsfähigkeit von Coffein an denaturierte Zonen der DNA (Ts'o und Lu, 1964; Domon et al., 1970 und Bases et al., 1980) eine Stabilisierung (Lang, 1971) oder Konformationsänderung des Chromatins eintritt. Dies könnte ein Signal darstellen, das weitere Kondensation des Chromatins für die Mitose ermöglicht und zum Überwinden der Blockierung in G₂ führt.

Kann eine Bindung von Coffein an Chromatin in alphabestrahlten Zellen nachgewiesen werden?

Die [8-³H]-Coffein-Experimente zeigen, daß der überwiegende Teil (70 %) in den Zellkern aufgenommen wird und Markierung besonders über dichten Chromatinbereichen gefunden wird.

Die Bindung an Chromatin oder DNA scheint jedoch nicht sehr stabil zu sein, da nur ein geringer Teil der Markierung an vorzeitig kondensierten G2-Chromosomen lokalisiert ist. Für eine schwache Bindung spricht auch die Möglichkeit, die Coffeinwirkung auf die G2-Blockierung durch Mediumwechsel zu beenden.

Wenn man annimmt, daß die Verzögerung in G2 eine Möglichkeit darstellt, die Überlebenschance der Zelle zu erhöhen, muß die Zelle hierfür Regulationsmechanismen besitzen. Die Regulation zur Verhinderung der Kondensation des Chromatins könnte auf der Ebene der Synthese solcher "Kondensationsproteine" oder deren Aktivierung stattfinden, falls sie bereits synthetisiert sind. Ein möglicher Kandidat ist der zytoplasmatische Kondensationsinduktor, welcher in mitotischen Zellen vorhanden ist und nach Fusion von Mitosen und Interphasezellen vorzeitige Chromosomenkondensation des Interphasechromatins bewirkt (Sperling und Rao, 1974). Dieser ist in G2-blockierten Zellen nicht nachweisbar, da G2-blockierte Zellen auch nach langer Blockierung keine Kondensation nach Fusion mit unbestrahlten Interphasezellen induzieren können. Mitosen, die durch die Coffeinwirkung die G2-Blockierung überwunden haben, induzieren jedoch in Interphasezellen Kondensation wie unbestrahlte Mitosen. Sie besitzen also diesen Kondensationsinduktor.

Aufgrund der äußerst schnellen Coffeinwirkung bezüglich der Aufhebung der G2-Blockierung und der Befunde, daß 35 % der G2-blockierten Zellen trotz gleichzeitiger Inhibition der Proteinsynthese durch Cycloheximid (20 µg/ml) mit Coffein in die Mitose entlassen werden (Lücke-Huhle, unveröffentlicht), ist zu vermuten, daß die Coffeinwirkung nicht auf einer Induktion der Synthese dieses Kondensationsinduktors beruht, sondern eher dessen Aktivierung veranlaßt.

Um feststellen zu können, ob Veränderungen der Proteinsynthese für die G2-Blockierung verantwortlich sind, wurde die Syntheserate zellulärer Proteine nach Bestrahlung untersucht.

Die zweidimensionalen Proteinmuster zeigen, daß der größte Teil der Proteine nach Alphabestrahlung mit normaler Rate synthetisiert wird, die Syntheserate von 3 Proteinen jedoch drastisch verändert wird. Ein völliges Fehlen von mehreren Proteinen in G2-blockierten Zellen, wie es Al-Bader et al. (1978) in G2-blockierten HeLa-Zellen nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien findet, kann nicht bestätigt werden. Eine direkte Inhibition des Proteinsyntheseapparats durch ionisierende Strahlung findet nicht statt und ist in Übereinstimmung mit Befunden von Schneiderman und Hofer (1980), die zeigen, daß der Proteinsyntheseapparat relativ strahlenresistent ist und nicht das direkte "Target" für Teilungsverzögerung und Zellinaktivierung darstellt.

Welche Bedeutung haben die beobachteten Änderungen der Synthese von Protein P1, P2 und P3?

Die dosisabhängige Stimulierung von P2 und P3 und Syntheseverminderung von P1 deuten an, daß diese Proteine in die strahleninduzierte Blockierung involviert sind. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, daß die Veränderungen in der Syntheserate bereits 8 Std. nach Bestrahlung beobachtet werden, ein Zeitpunkt, an dem das Maximum der G2-Blockierung gemessen wird. P2 und P3 werden zwar gegen Ende des Zellzyklus vermehrt synthetisiert, da die Änderungen jedoch wesentlich geringer als nach Alphabestrahlung sind, ist eine G2-Spezifität nicht wahrscheinlich. Bisher konnten keine Proteine nachgewiesen werden, die ausschließlich in G2 synthetisiert werden (Bravo und Celis, 1980).

Wird die Syntheserate der Proteine durch andere Noxen beeinflusst, welche ebenfalls die Proliferation blockieren?

Die Induktion von P3 und die Repression von P1 werden am effektivsten nach Alphabestrahlung beobachtet. Die Veränderungen sind jedoch auch nach UV-Bestrahlung (Blockierung in

der S-Phase), Serumentzug (Blockierung in der G₀-Phase) und durch Purinentzug bei V 79 pur1 Zellen, die durch Hemmung der DNA- und RNA-Synthese (Sriram und Taylor, 1977) an der G1/S-Grenze blockiert werden, nachzuweisen. Es scheint also, daß jede Blockierung des normalen Zellzyklusablaufes die Syntheseveränderung von P1 und P3 induziert, unabhängig von der Zellzyklusphase, in der die Blockierung stattfindet. Dafür sprechen auch die Befunde, daß nach Alphabestrahlung von V 79 pur1 Zellen sowohl unter normalen Wachstumsbedingungen (→ Blockierung in G2) als auch unter Purinentzug (→ Blockierung an G1/S) die Veränderungen im gleichen Maß auftreten.

Aufgrund der Steigerung der Synthese von P2 und P3 mit zunehmender Dauer der G2-Blockierung nach Alphabestrahlung und beginnendem Absinken nach ca. 40 Stunden, könnten diese Proteine in die Regulation der Blockierung involviert sein. Dies deshalb, da das Absinken der Syntheserate zu einem Zeitpunkt beginnt, an dem ein großer Teil der G2-blockierten Zellen erneut mit der Replikation des Genoms (Endoreduplikation) beginnt (Lücke-Huhle, unveröffentlicht), was als Entkopplung zellulärer Prozesse interpretiert wird.

Bravo et al. (1982) haben ein Protein beschrieben, "Cyclin" genannt, welches in verschiedenen Zellkulturen nach Röntgenstrahlen und in nicht proliferierenden Kulturen, ähnlich wie Protein P1, vermindert synthetisiert wird. Aufgrund der verschiedenen Molekulargewichte der beiden Proteine scheint jedoch Identität ausgeschlossen.

Das Protein P2, das durch Alphabestrahlung stark stimuliert wird, nach UV-Bestrahlung und in V 79 pur1 nach Alphabestrahlung unter Purinentzug vermindert synthetisiert wird, zeigt damit gewisse G2-Spezifität. Aufgrund der vergleichbaren elektrophoretischen Eigenschaften zeigt es Ähnlichkeiten mit einem Protein in HeLa-Zellen. Bravo und Celis (1980) finden für dieses Protein abnehmende Synthese vom Beginn zum Ende der Mitose.

Die Veränderung der Proteinsyntheserate von P1, P2 und P3 kann trotz unbekannter Funktion der Proteine als zellulärer Marker betrachtet werden, um den Proliferationszustand von Zellpopulationen und mögliche Schäden durch verschiedene Noxen zu erkennen.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse erhärten die Vorstellung, daß die Schädigung des Chromatins von Säugetierzellen durch ionisierende Strahlung die Ursache für die G2-Blockierung und damit auch für das Ausmaß der späteren Zellinaktivierung darstellt. Darüber hinaus zeigen Untersuchungen am G2-Chromatin, daß die G2-Blockierung als Reparaturphase anzusehen ist, die die Überlebenschance der Zelle erhöht. Die Reparatur schließt fehlerhafte Reparatur ein, die zwar die Kondensation des Chromatins für die mitotische Teilung erlauben könnte, nicht aber eine Erhöhung der Überlebensrate bewirkt. Eine Verkürzung des G2-Zustandes einer Zelle durch Coffein ist weniger auf direkter Inhibierung von Reparaturprozessen, sondern in einer Änderung der Chromatinstruktur zu suchen, die der Zelle die Kondensation des Chromatins ermöglicht, ohne die Schäden repariert zu haben.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden kausale Zusammenhänge zwischen Chromosomenschäden, G2-Blockierung und Zellinaktivierung aufgezeigt. Diese biologischen Strahlenwirkungen sind abhängig von der absorbierten Strahlendosis und werden am effektivsten durch dicht-ionisierende Strahlung mit einem LET von etwa 100 keV/ μ hervorgerufen. Aus diesem Grunde waren ²⁴¹Americium-Alphaeteilchen (LET 120 keV/ μ) für die folgenden Untersuchungen besonders geeignet.

Bestrahlung mit Alphaeteilchen verursacht bei allen untersuchten Säugetierzellen eine drastische Blockierung in der G2-Phase und eine, im Ausmaß korrelierbare Abnahme des Zellüberlebens (RBE 4,2 - 6,6). Auch die zytofluorometrisch gemessenen Empfindlichkeitsunterschiede in Abhängigkeit vom Zellalter oder zwischen verschiedenen Zelllinien (Chinesische Hamsterzellen V 79 und Mäusefibroblasten L 929) zeigen Korrelation zwischen G2-Blockierung und Zellinaktivierung.

Mit der PCC-Technik kann gezeigt werden, daß über 90 % der G2-blockierten Zellen massive Schädigung ihres Chromatins aufweisen. Neben Brüchen und Austauschfiguren (G2*) lassen sich mit zunehmender Dosis Chromosomen mit dekondensierten Bereichen (G2**) nachweisen. Diese Befunde unterstützen die Vorstellung, daß Chromatinschäden für die G2-Blockierung verantwortlich gemacht werden können.

Reparaturprozesse während der G2-Blockierung werden durch Einbau radioaktiver DNA-Bausteine in G2 Zellen nachgewiesen. Ferner wird eine Abnahme von stark geschädigten G2**-PCC mit zunehmender Dauer der G2-Blockierung gefunden.

Zugabe von 2 mM Coffein führt zu einer drastischen Verkürzung des G2-Blocks. Die Zellen gehen in die Mitose, ohne ihre Chromosomenschäden repariert zu haben. Versuche zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus mit radioaktivem Coffein und anschließender Autoradiographie zeigen, daß Coffein im Zellkern lokalisiert ist. Das kann als ein weiterer Hinweis gewertet werden, daß eine

Struktur des Zellkerns als Target für die G2-Blockierung in Frage kommt.

Ergebnisse mittels der 2D-Gelelektrophorese zeigen direkt nach der Bestrahlung keine Veränderung der Gesamtproteinsynthese, so daß ein Fehlen von Hauptproteinen als Ursache für die G2-Blockierung ausscheidet. Zu späteren Zeiten (ab 8 Std. nach Bestrahlung) wird jedoch ein Protein (P1: MG 39 000 D) mit verminderter Rate synthetisiert, während die Syntheseraten von zwei anderen Proteinen (P2: MG 42 000 D und P3: MG 60 000 D) stimuliert werden. Ähnliche Veränderungen der Syntheseraten dieser Proteine finden sich jedoch auch dann, wenn Zellen durch andere Einflüsse im Zellzyklus blockiert werden. Diese Proteine können damit als zelluläre Marker für den Proliferationszustand einer Zellpopulation angesehen werden.

Alle Befunde dieser Arbeit unterstützen die Vorstellung, daß die strahleninduzierte Blockierung von Säugetierzellen in der G2-Phase durch Chromatinschäden verursacht wird. Die Verlängerung der G2-Phase gibt der Zelle jedoch auch die Möglichkeit zur Reparatur dieser Schäden, wodurch die Überlebenschance einer bestrahlten Zelle erhöht wird.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Al-Bader A.A., Orenco A. and Rao P.N. (1978)
G2phase-specific proteins of HeLa cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 6064

Baisch H., Göhde W. and Linden W.A. (1975)
Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in
the various phases of cell cycle.
Rad. Environm. Biophys. 12, 31

Barendsen G.W., Beusker T.L.J., Vergroesen A.J. and Budke L.
(1960)
Effects of different ionizing radiations on human cells in
tissue culture. II. Biological Experiments.
Radiat. Res. 13, 841

Barendsen G.W., Walter H.M.D., Fowler J.F. and Bewley D.K.
(1963)
Effects of different ionizing radiations on human cells in
tissue culture. III. Experiments with Cyclotron-accelerated
alpha-particles and deuterons.
Radiat. Res. 18, 106

Bases R., Mendez F., Liebeskind D., Elequin F. and Neubort S.
(1980)
DNA of HeLa cells during caffeine-promoted recovery from
X-ray induced G2 arrest.
Int. J. Radiat. Biol. 37, 437

Beck H.P. (1981)
Proliferation kinetics of perturbed cell populations
determined by the BUdR-33258 technique; radiotoxic effects
of incorporated 3H-thymidine.
Cytometry 2, 170

Bravo R. and Celis J.E. (1980)
A search for differential polypeptide synthesis throughout
the cell cycle of HeLa cells.
J. Cell Biol. 84, 795

Bravo R., Fey S.J., Bellatin J., Larsen P.M. and Celis J.E.
(1982)

Identification of a nuclear polypeptide ("cyclin") whose relative proportion is sensitive to changes in the rate of cell proliferation and transformation.

Cell Biol. Int. Rep., im Druck

Burki H.J. and Okada S (1968)

A comparison of the killing of cultured mammalian cells induced by decay of incorporated tritiated molecules at -196°C .

Biophys. J. 8, 445

Chadwick K.H. and Leenhouts H.P. (1973)

A molecular theory of cell survival.

Phys. Med. Biol. 18, 78

Chu E.H.Y., Sun N.C. and Chang C.C. (1972)

Induction of auxotrophic mutations by treatment of Chinese hamster cells with 5-bromodeoxyuridine and black light.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3459

Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W. and Laemmli U.K.
(1977)

Peptid mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis.

J. Biol. Chem. 252, 1102

Dertinger H. and Hülser D. (1981)

Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. I. Dependence on cellular interaction.

Radiat. Environm. Biophys. 19, 101

Dewey W.C. and Highfield D.P. (1976)

G2 block in Chinese hamster cells induced by X-irradiation, hyperthermia, cycloheximide, or actinomycin-D.

Radiat. Res. 65, 511

Domon M., Barton B., Porte A. and Rauth A.M. (1970)

The interaction of caffeine with ultra-violet-light-irradiated DNA.

Int. J. Radiat. Bio. 17, 395

Edwards A.A., Purrot R.J., Prosser J.S. and Lloyd D.C. (1980)
The induction of chromosome aberration in human lymphocytes
by alpha-radiation.

Int. J. Radiat. Biol. 38, 83

Elkind M.M. and Whitmore G.F. (1967)
The radiobiology of cultured mammalian cells.
Gordon and Breach, New York, London, Paris

Fidorra J. (1977)
Die Strahlenempfindlichkeit von Säugetierzellen in den ver-
schiedenen Zyklusphasen und ihre Beziehung zu Erholungs-
prozessen.
Dissertation, Universität Hamburg

Giles R.E. and Ruddle F.H. (1973)
Production of Sendai virus for cell fusion.
In Vitro 9, 103

Hall E.J., Gross W., Dvorak R.F., Kellerer A.M. and Rossi H.H.
(1972)
Survival curves and age response functions for Chinese hamster
cells exposed to X-rays or high LET alpha-particles.
Radiat. Res. 52, 88

Hieber L., Beck H.P. and Lücke-Huhle C. (1981)
G2-delay after irradiation with alpha particles as studied
in synchronized cultures and by the BUdR-33258H technique.
Cytometry 2, 175

Hittelman W.N. and Rao P.N. (1974)
Premature chromosome condensation: II. The nature of chromosome
gaps produced by alkylating agents and ultraviolet light.
Mutation Res. 23, 259

Howard A. and Pelc S.R. (1953)
Synthesis of deoxyribonucleid acid in normal and irradiated
cells and its relation to chromosome breakage.
Heredity, Suppl. 6, 261

- Hug O. and Kellner A.M. (1966)
Stochastik der Strahlenwirkung.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Johnson R.T. and Rao P.N. (1970)
Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome
condensation in interphase nuclei.
Nature 236, 717
- Lang H. (1971)
Der Einfluß von Coffein auf das Schmelzverhalten von DNS.
FEBS Lett. 18, 27
- Leeper D.B., Schneiderman M.H. and Dewey W.C. (1972)
Radiation-induced division delay in synchronized Chinese
hamster ovary cells in monolayer culture.
Radiat. Res. 50, 401
- Le Pecq J.-B. and Paoletti C. (1967)
A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids.
J. Mol. Biol. 27, 87
- Lücke-Huhle C., Blakely E.A., Chang P.Y. and Tobias C.A.
(1979)
Drastic G2 arrest in mammalian cells after irradiation with
heavy-ion beams.
Radiat. Res. 79, 97
- Lücke-Huhle C. (1982)
Alpha-irradiation-induced G2 delay: A period of cell recovery.
Radiat. Res. 89, 298
- Lücke-Huhle C., Comper W., Hieber L and Pech M. (1982a)
Comparative study of G2 delay and survival after ²⁴¹Americium
alpha and ⁶⁰Cobalt-gamma-irradiation.
Radiat. Environm. Biophys., im Druck

- Lücke-Huhle C., Wegner R.D. and Hieber L. (1982b)
Caffeine mediated release of alpha particle-induced G2 arrest
increases the yield of chromosome aberrations.
Int. J. Rad. Biol., im Druck
- Munro T.R. (1970)
The site of the target region for radiation-induced mitotic
delay in cultured mammalian cells.
Radiat. Res. 44, 748
- O'Farrell P.H. (1975)
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.
J. Biol. Chem. 250, 4007
- Puck T.T., Marcus P.I. and Cieciura S.J. (1956)
Clonal growth of mammalian cells in vitro.
J. Exp. Med. 103, 273
- Puck T.T. and Steffen J. (1963)
Life cycle analysis of mammalian cells. I. A method for
localizing metabolic events within the life cycle, and its
application to the action of colcemide and sublethal doses
of X-irradiation.
Biophys. J. 3, 379
- Raju M.R. and Jett J.H. (1973)
RBE and OER variations of mixtures of plutonium alpha
particles and X-rays for damage to human kidney cells (T-1).
Radiat. Res. 60, 473
- Schlag H. and Lücke-Huhle C. (1981)
The influence of ionization density on the DNA synthetic
phase and survival of irradiated mammalian cells.
Int. J. Rad. Biol. 40, 75
- Schneiderman M.H. and Hofer K.G. (1980)
The target for radiation-induced division delay.
Radiat. Res. 84, 462

Sinclair W.K. and Morton R.A. (1965)

X-ray and ultraviolet sensitivity of synchronized Chinese hamster cells at various stages of the cell cycle.

Biophys. J. 5, 1

Skarsgard L.D. (1967)

The radiobiology of cultured mammalian cells, pp. 420-421 (Elkind M.M. and Whitmore C.F., Editors). Gordon and Breach, New York

Sperling K. and Pao P.N. (1974a)

The phenomenon of premature chromosome condensation: Its relevance to basic and applied research.

Humangenetik 23, 235

Sperling K. and Rao P.N. (1974b)

Mammalian cell fusion: V. Replication behavior of heterochromatin as observed by premature chromosome condensation.

Chromosoma 45, 121

Sriram G. and Taylor M.W. (1977)

Purinless death: Ribosomal RNA turnover in a purin-starved ade^- mutant of Chinese hamster cells.

J. Biol. Chem. 252, 5350

Terasima T. and Tolmach L.J. (1961)

Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle.

Nature 190, 1210

Terasima T. and Tolmach L.J. (1963a)

Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells.

Exp. Cell Res. 30, 344

Terasima T. and Tolmach L.J. (1963b)

Variations in several responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle.

Biophys. J. 3, 11

Todaro G.J., Lazar G.K. and Green H. (1965)
The initiation of cell division in a contact-inhibited
mammalian cell line.

J. Cell Comp. Physiol. 66, 325

Ts'o P.O.P. and Lu P. (1964)

Interaction of nucleic acids. I. Physical binding of thymine,
adenine, steroids and aromatic hydrocarbons to nucleic acids.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 17

Walters R.A. and Enger M.D. (1976)

Effects of ionizing radiation on nucleic acid synthesis in
mammalian cells. In Advances in Radiation Biology, Vol. 6,
pp. 1-48 (Lett J.T. and Adler H., Editors), Academic Press,
New York

Warters R.L. and Hofer K.G. (1977)

Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells.

Elucidation of the primary site for radiation-induced division
delay.

Radiat. Res. 69, 348

Weber K. and Osborn M. (1969)

The reliability of molecular weight determinations by
dodecyl-sulfat-polyacrylamid gel electrophoresis.

J. Biol. Chem. 244, 4406

Whitmore G.F., Gulyas S. and Botond J. (1965)

Radiation sensitivity throughout the cell cycle and its
relationship to recovery. In Cellular Radiation Biology,
pp. 423-441.

The Williams and Wilkins Co., Baltimore

Zoetelief J. and Barendsen G.W. (1980)

Comparison of the effectiveness of different types of
radiation for induction of cell reproductive death and
chromosome aberrations in three cell lines.

Rad. Environm. Biophys. 17, 342

G. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabelle 1

Überlebensdaten nach Alpha- und Gammabestrahlung und relative biologische Effektivität

Zelllinie	^{241}Am - Alphateilchen		^{60}Co -Gamma- Strahlung		RBE-Werte	
	D_{37}	D_{10}	\bar{D}_{ML}	D_{10}	$\text{RBE}_{\bar{D}_{ML}}$	RBE_{10}
V 79	0,85	1,8	3,6	7,6	4,2	4,2
V 79 pur1	0,85	1,8	3,6	7,6	4,2	4,2
L 929	0,57	1,2	3,8	6,6	6,6	5,5

Tabelle 2

Zellzyklusphasenverteilung von exponentiell
wachsenden Kontrollzellen

Zell- linie	Methode	G1 (%)	S (%)	G2 (%)	M (%)
V 79	FMF + MI	30	50	16*	4
	LI	-	59	-	-
	PCC + MI	19	58	19	4
L 929	FMF + MI	55	30	11*	4

* G2-Anteil wurde aus der Differenz von zytofluorometrisch gemessenen G2 + M Anteil und Mitoseindex berechnet.

(FMF = Flußzytometrie, MI = Mitoseindex, LI = Markierungsindex)

Tabelle 3

Prozentuale Anteile aberranter G2-PCC in V 79 Zellen
nach Alphabestrahlung mit verschiedenen Dosen

Dosis (Gy)	Anzahl der untersuchten G2-PCC	aberrante G2		Prozentsatz aberranter G2-PCC
		G2*	G2**	
0	70	6	6	17
0,1	50	14	8	44
0,25	51	24	7	56
0,5	45	24	11	78
1,0	70	40	16	80
1,75	74	45	15	82
2,5	72	30	33	88
3,5	58	28	25	89
4,38	87	45	36	93

Tabelle 4

Zeitabhängiger Anstieg aberranter G2-PCC nach
1,75 und 4,38 Gy Alphateilchen

Dosis	1,75 Gy			4,38 Gy		
Zeit nach Be- strahlung (Std)	aberrante G2 (%)	G2*	G2**	aberrante G2 (%)	G2*	G2**
6	74	50	24	82	50	32
8	82	53	29	93	49	44
10	81	61	20	93	52	41
11	82	63	19	-	-	-
12	76	59	17	94	54	40
13	-	-	-	91	59	32
14	82	66	16	93	62	31
16	-	-	-	91	69	22

Tabelle 5

Autoradiographisch ermittelter ^3H -Thymidin-Einbau
in alphabestrahlten V 79 Zellen

Behandlung der Zellen	Anzahl der Silberkörner in			Markierungs- index (%) > 10 Körner
	S-PCC	G2*-PCC	G2**-PCC	
Kontrolle	70 ± 12	-	-	59 ± 3
Kontrolle + HU	10 ± 4	-	-	9 ± 2
4,38 Gy	60 ± 16	9 ± 3	27 ± 6	38 ± 3
4,38 Gy + HU	29 ± 7	8 ± 3	15 ± 3	30 ± 3

HU = Hydroxyharnstoff (5×10^{-3} M)

Tabelle 6

Beeinflussung G2-blockierter Zellen durch Coffein

Behandlung der Zellen	Prozentsatz G2-PCC	aberrante G2-PCC (%)	Klassifizierung	
			G2*	G2**
12 Std nach 4,38 Gy	94	91	59	32
12 Std nach 4,38 Gy + 2 Std 2 mM Coffein	59	90	57	33

Tabelle 7

Relative Proteinsynthese von P1, P2 und P3 in
exponentiell wachsenden und synchronisierten
V 79 Zellen

Wachstums- stadium	P1	P2	P3
exponentiell	0,70	0,45	0,11
G1	0,20	0,33	0,12
S	0,55	0,31	0,17
G2	0,60	0,34	0,30
M	0,37	0,54	0,40

Tabelle 8

Relative Proteinsynthese von P1, P2 und P3 nach
Proliferationsblockierung von V 79 Zellen

Behandlung der Zellen	P1	P2	P3
Kontrolle	0,70	0,45	0,11
Serumentzug	0,47	0,65	0,64
1,75 Gy α	0,28	0,90	0,44
4,38 Gy α	0,10	1,18	0,76
15 J/m ² UV	0,59	0,29	0,71

Tabelle 9

Relative Proteinsynthese von P1, P2 und P3 in
der Mutante V 79 pur1

Behandlung der Zellen	P1	P2	P3
Medium pur ⁺	0,58	0,71	0,25
Medium pur ⁻	0,31	0,69	0,69
4,38 Gy α Medium pur ⁺	0,14	0,86	0,93
4,38 Gy α Medium pur ⁻	0,19	0,19	1,04

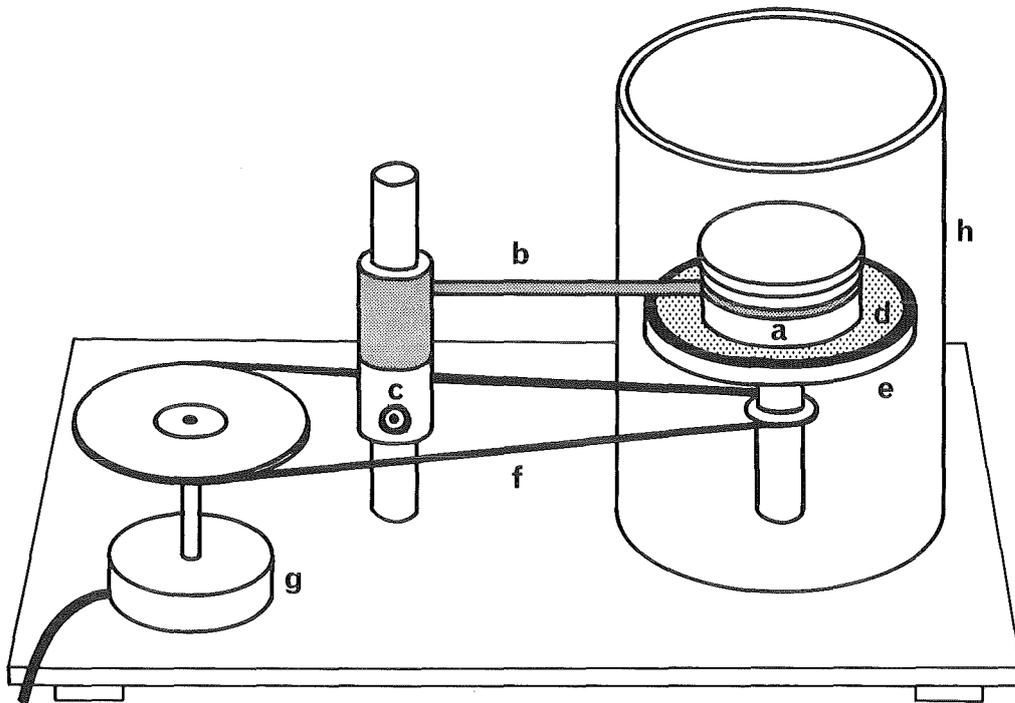


Abbildung 1

Bestrahlungsanordnung für Alphabestahlung

- a Kulturgefäß, bestehend aus einem Glasring mit Melinexfolie als Boden und Plastikdeckel
- b Schwenkbare Probenhalterung
- c Höheneinstellung für Probenhalterung
- d $^{241}\text{Americium}$ -Alphaquelle
- e Rotierender Tisch der Strahlenquelle
- f Antriebsriemen
- g Antriebmotor
- h Plastikhaube

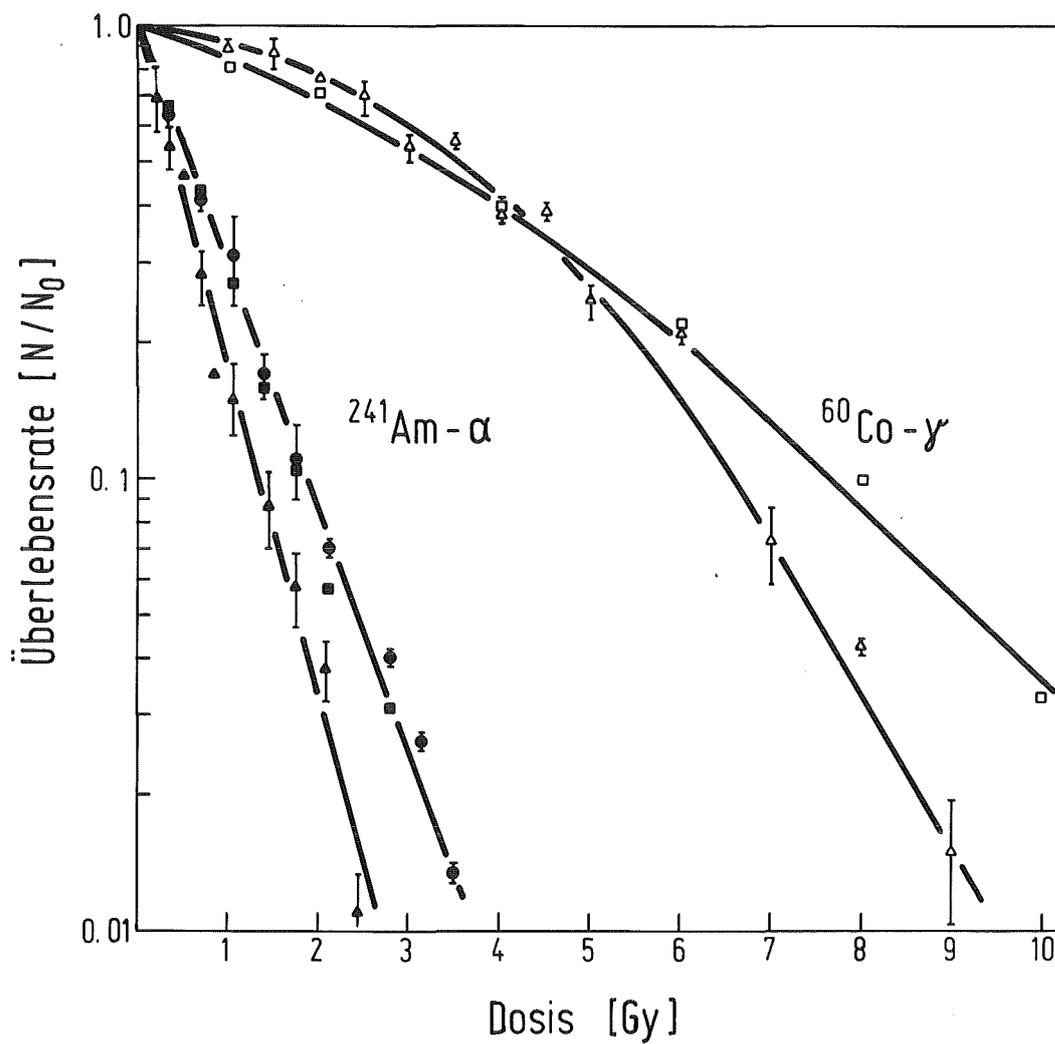


Abbildung 2

Dosis-Effekt-Kurven für das Überleben nach ^{241}Am -Alphastrahlung (ausgefüllte Symbole) und ^{60}Co -Gammastrahlung (offene Symbole) von V 79 Zellen (Kreise), V 79 pur1 (Quadrat) und L 929 Zellen (Dreiecke).

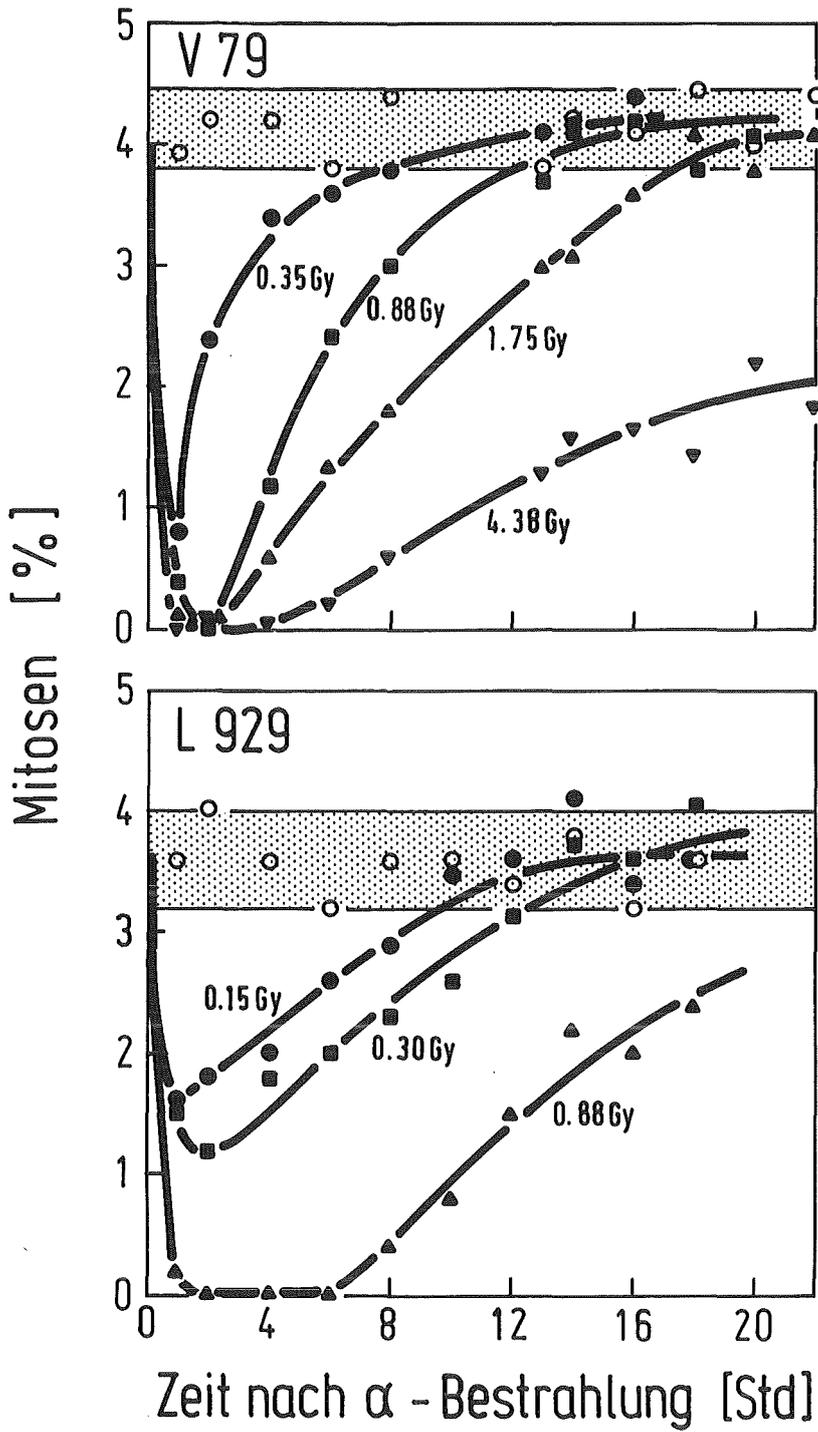


Abbildung 3

Zeitlicher Verlauf des Mitoseindex von V 79 Zellen (oben) und L 929 Zellen (unten) nach Bestrahlung exponentiell wachsender Kulturen mit verschiedenen Dosen von Alphateilchen. Die offenen Kreise sind Kontrollwerte.

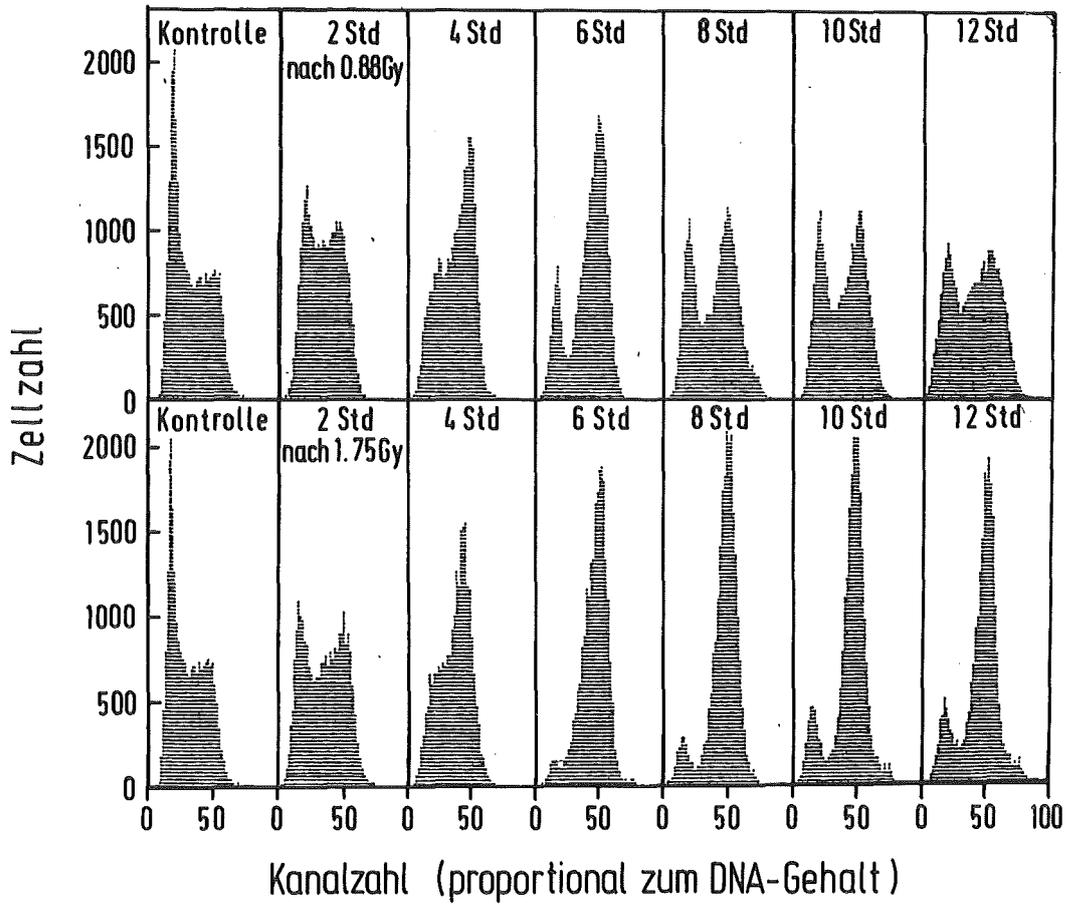


Abbildung 4

DNA-Histogramme von V 79 Zellen, gemessen in 2-stündigen Intervallen nach 0,88 Gy (obere Reihe) und 1,75 Gy Alphateilchen (untere Reihe).

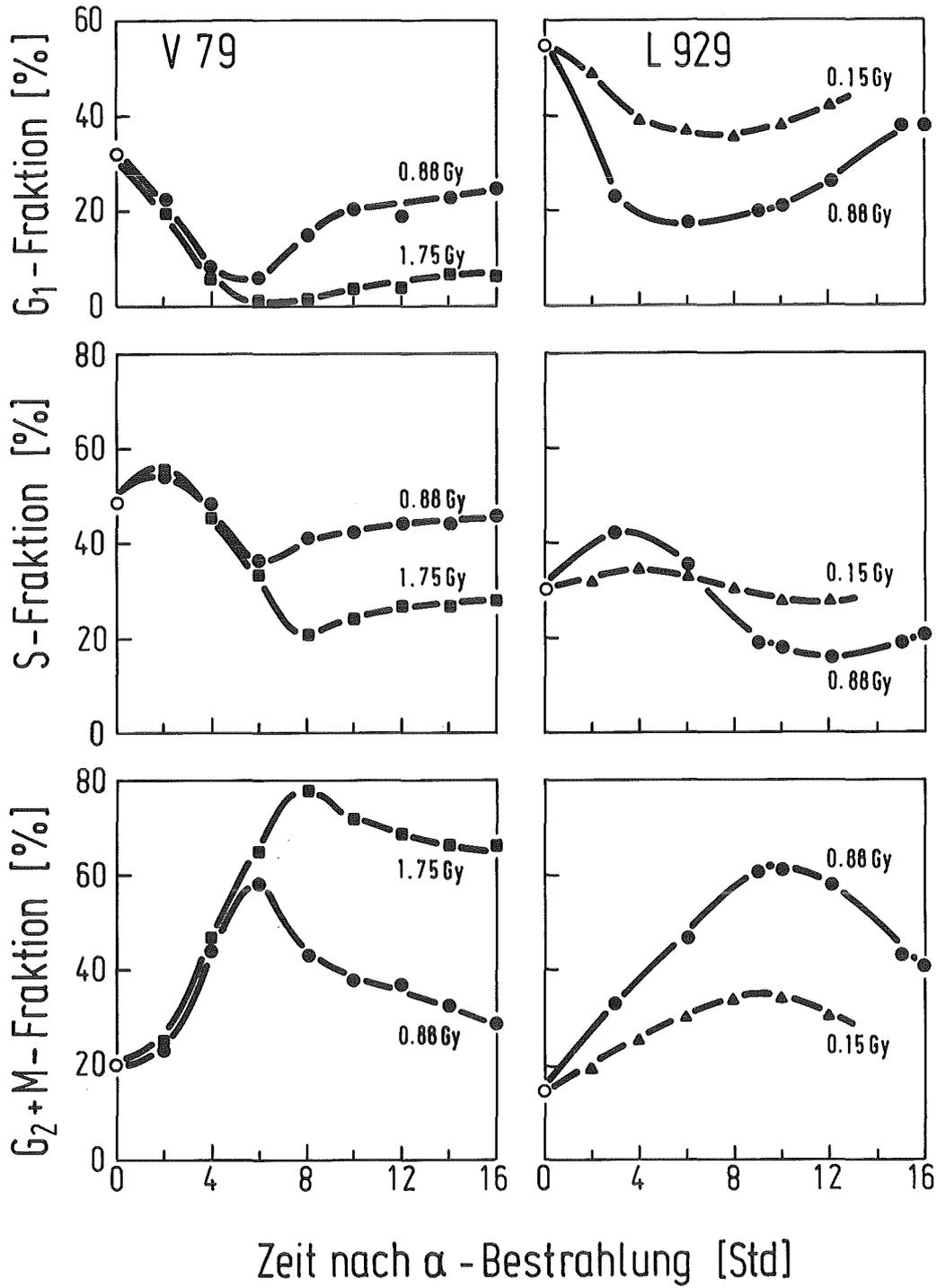


Abbildung 5

Zellzyklusveränderungen von V 79 Zellen (links) und L 929 Zellen (rechts) nach Alphabestrahlung, errechnet aus zytofluorometrisch gemessenen DNA-Histogrammen.

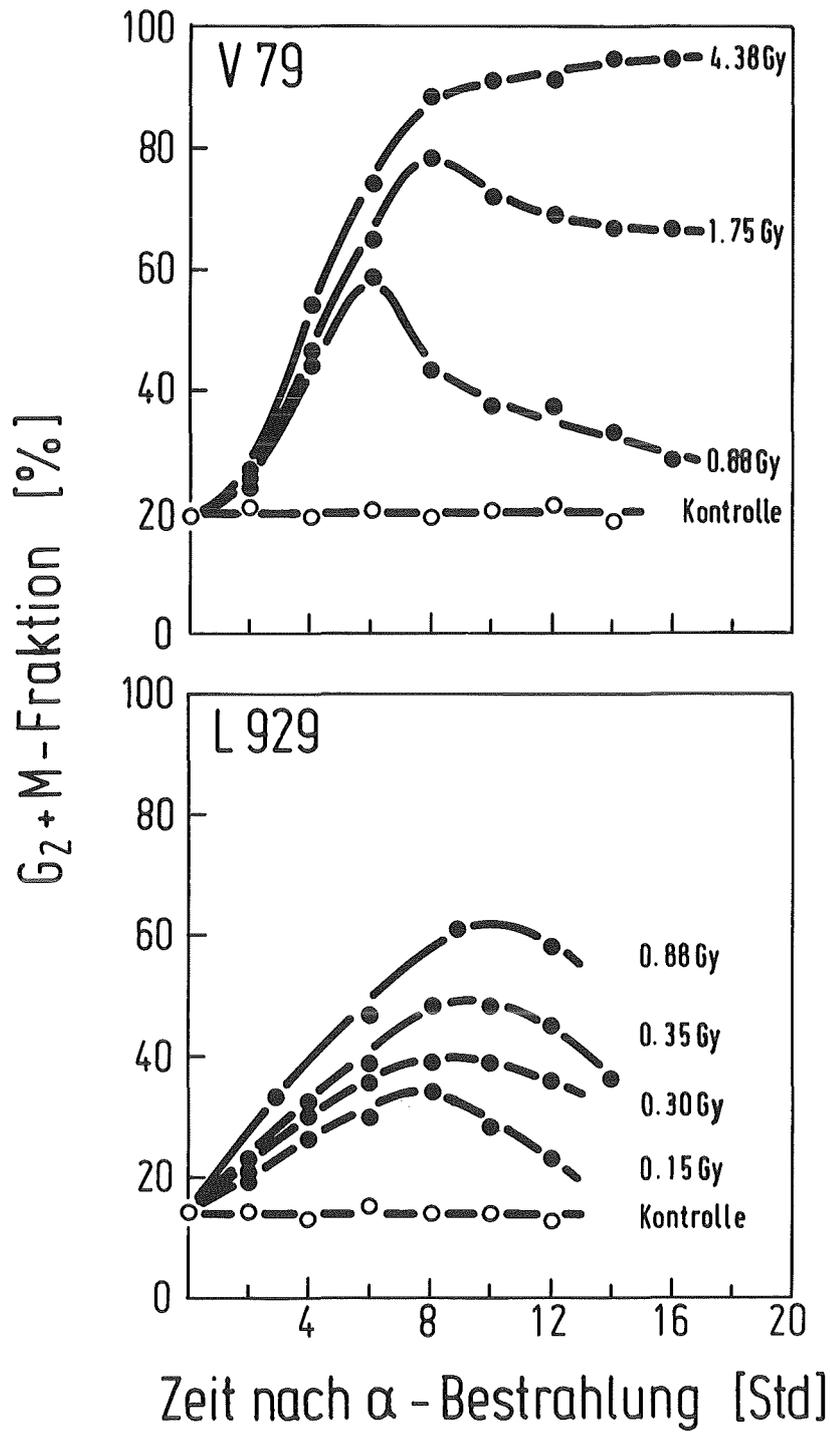


Abbildung 6

Prozentuale Anteile von Zellen im G2+M-Kompartiment nach verschiedenen Dosen von Alphateilchen in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung (V 79: oben; L 929: unten).

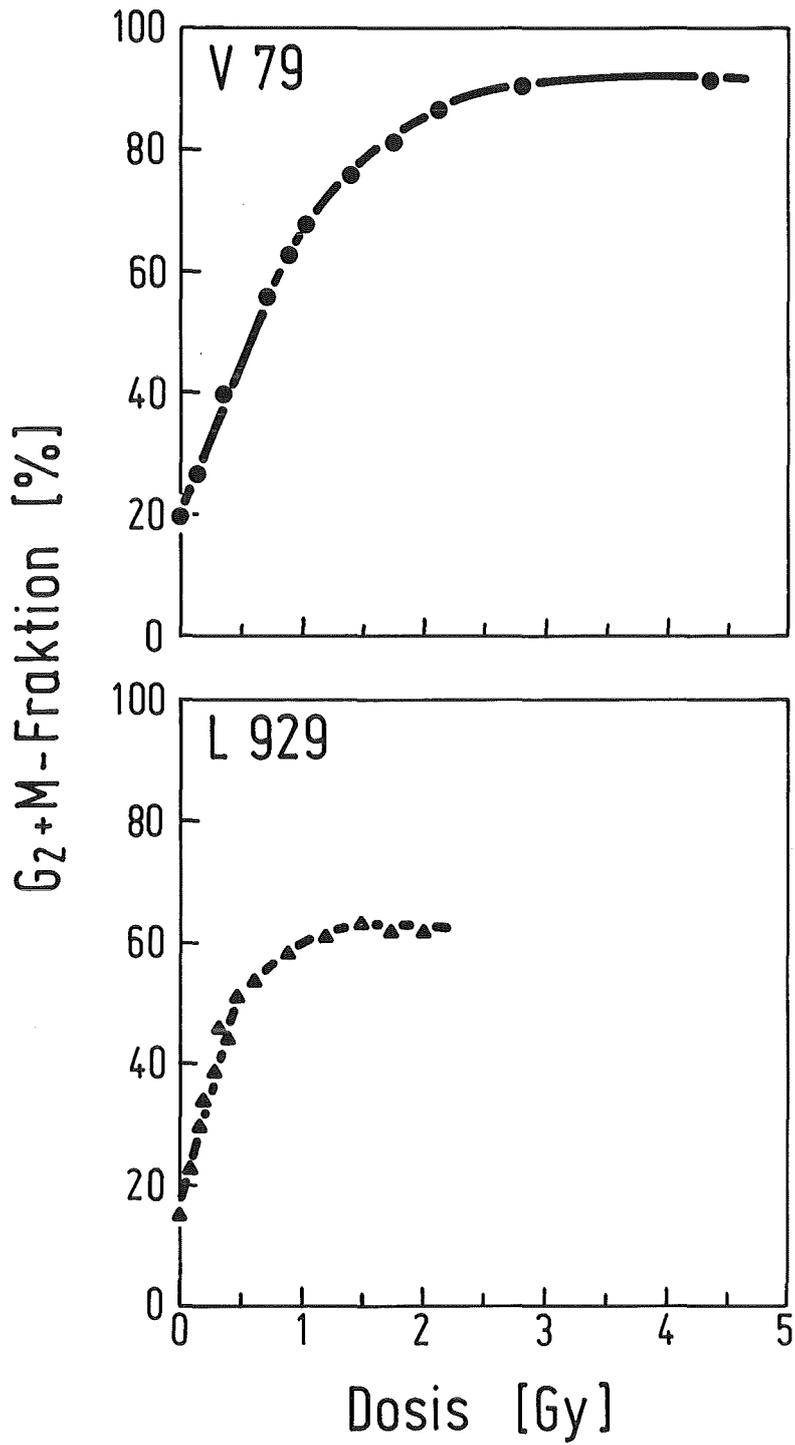


Abbildung 7

Zytofluorometrisch gemessene G₂+M-Ansammlung nach Alphabestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis. V 79 Zellen (oben), L 929 Zellen (unten).

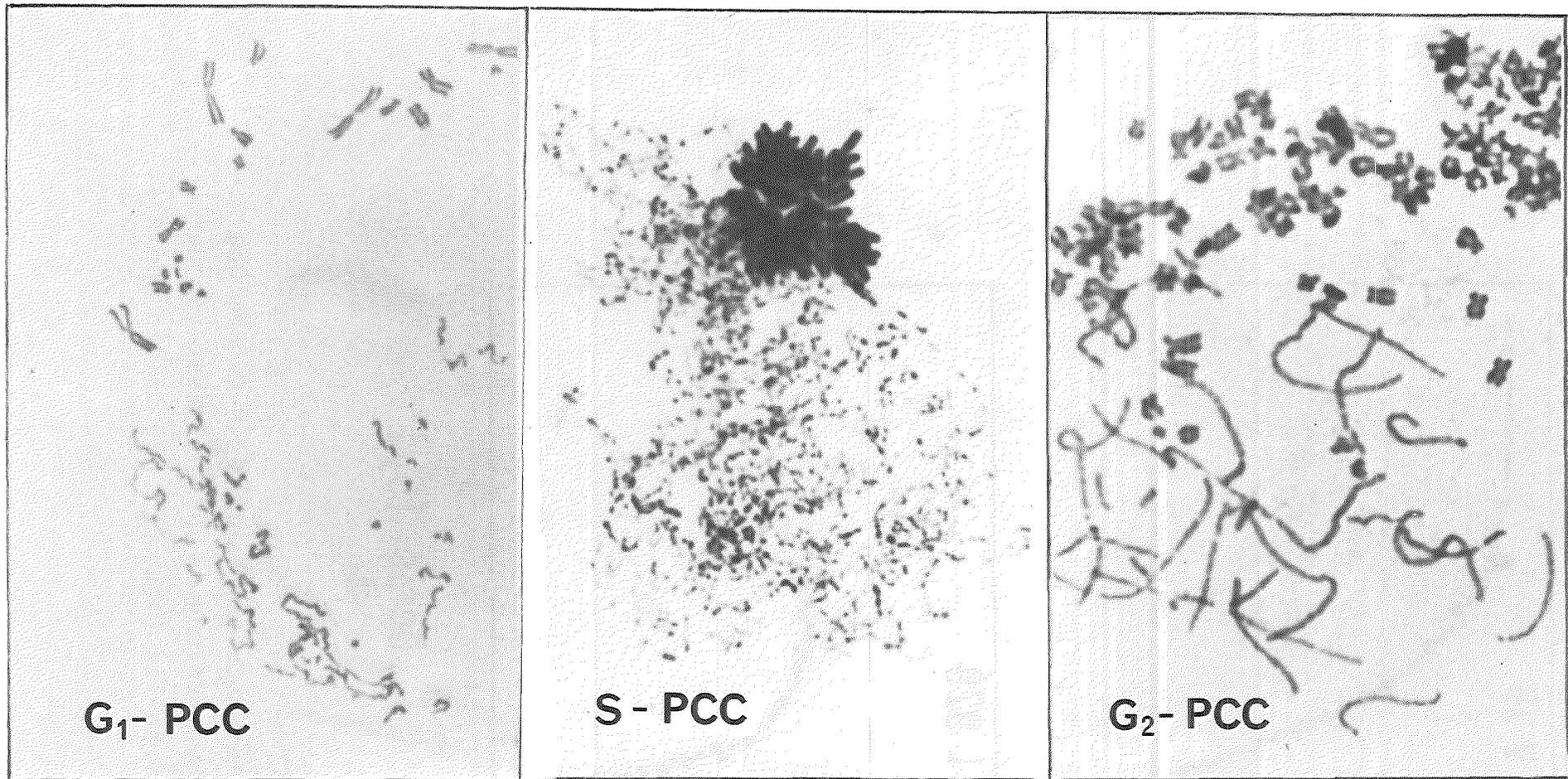


Abbildung 8

Vorzeitig kondensierte Chromosomen von unbestrahlten V 79 Zellen nach Sendai-Virus-induzierter Fusion mit mitotischen Zellen.

G₁-PCC: Chromosomen mit einem langen, meist spiraligen Chromatid

S-PCC : "pulverisiertes" Chromatin

G₂-PCC: Chromosomen mit zwei Chromatiden, deutlich länger als Metaphasechromosomen.

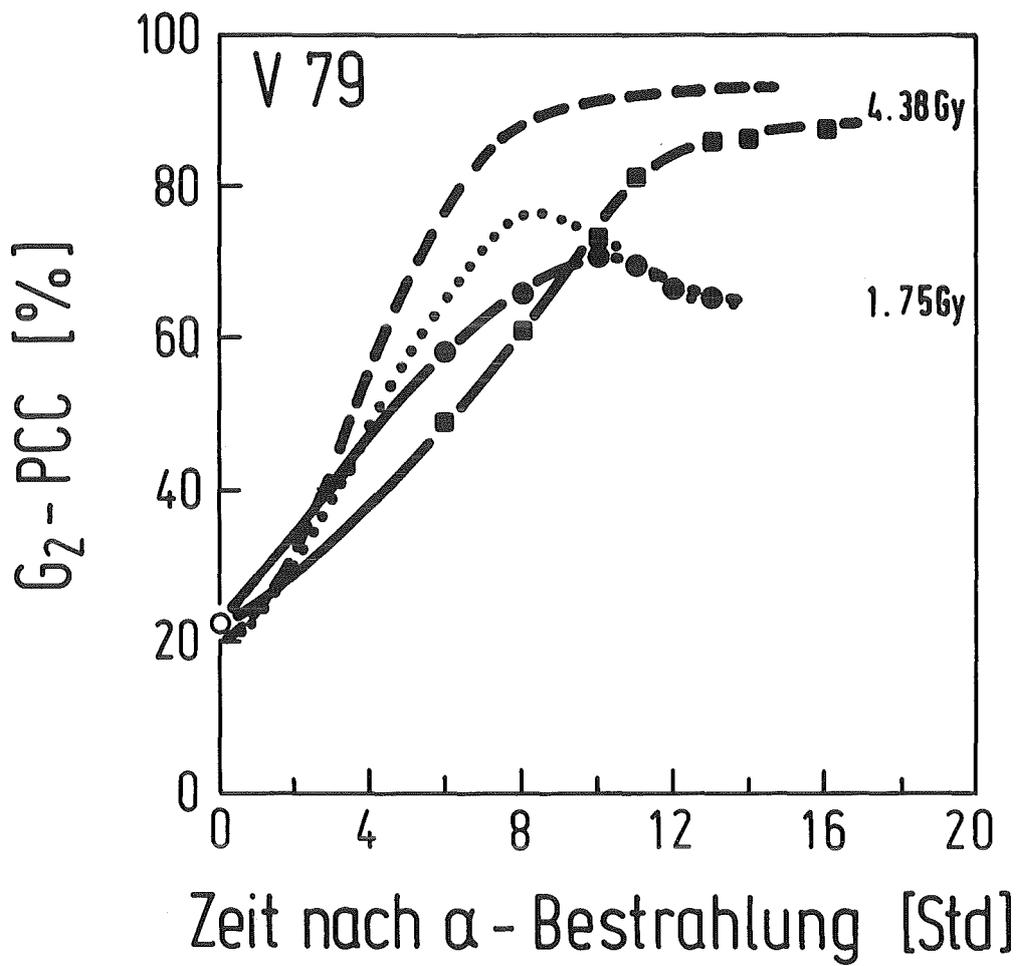


Abbildung 9

Ansammlung von G₂-Zellen, ermittelt durch PCC-Analyse nach 1,75 Gy (●) und 4,38 Gy (■) Alphateilchen in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung. Zum Vergleich sind die zytofluorometrisch erhaltenen Kurven eingezeichnet (1,75 Gy ..., 4,38 Gy ---).

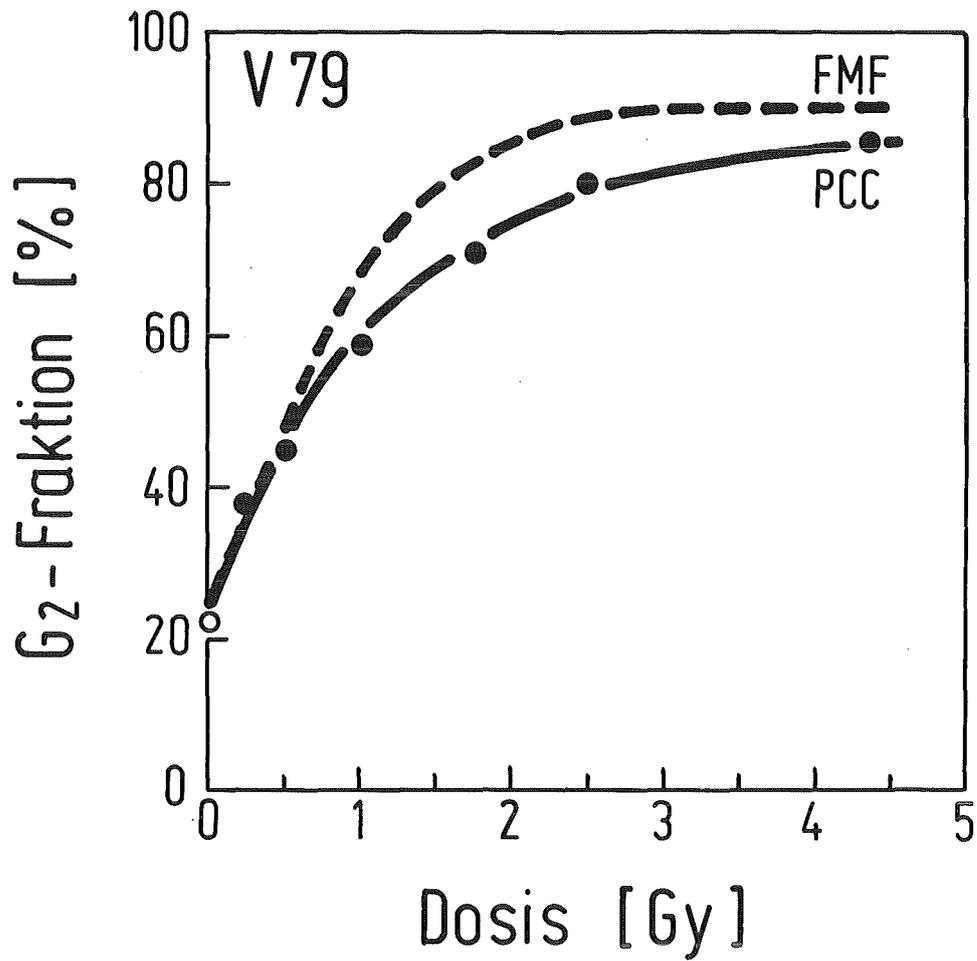


Abbildung 10

Durch PCC-Analyse ermittelte maximale Ansammlung von V 79 Zellen in G2 nach Alphabestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis. Zum Vergleich ist die zytofluorometrisch erhaltene Kurve eingezeichnet (---).

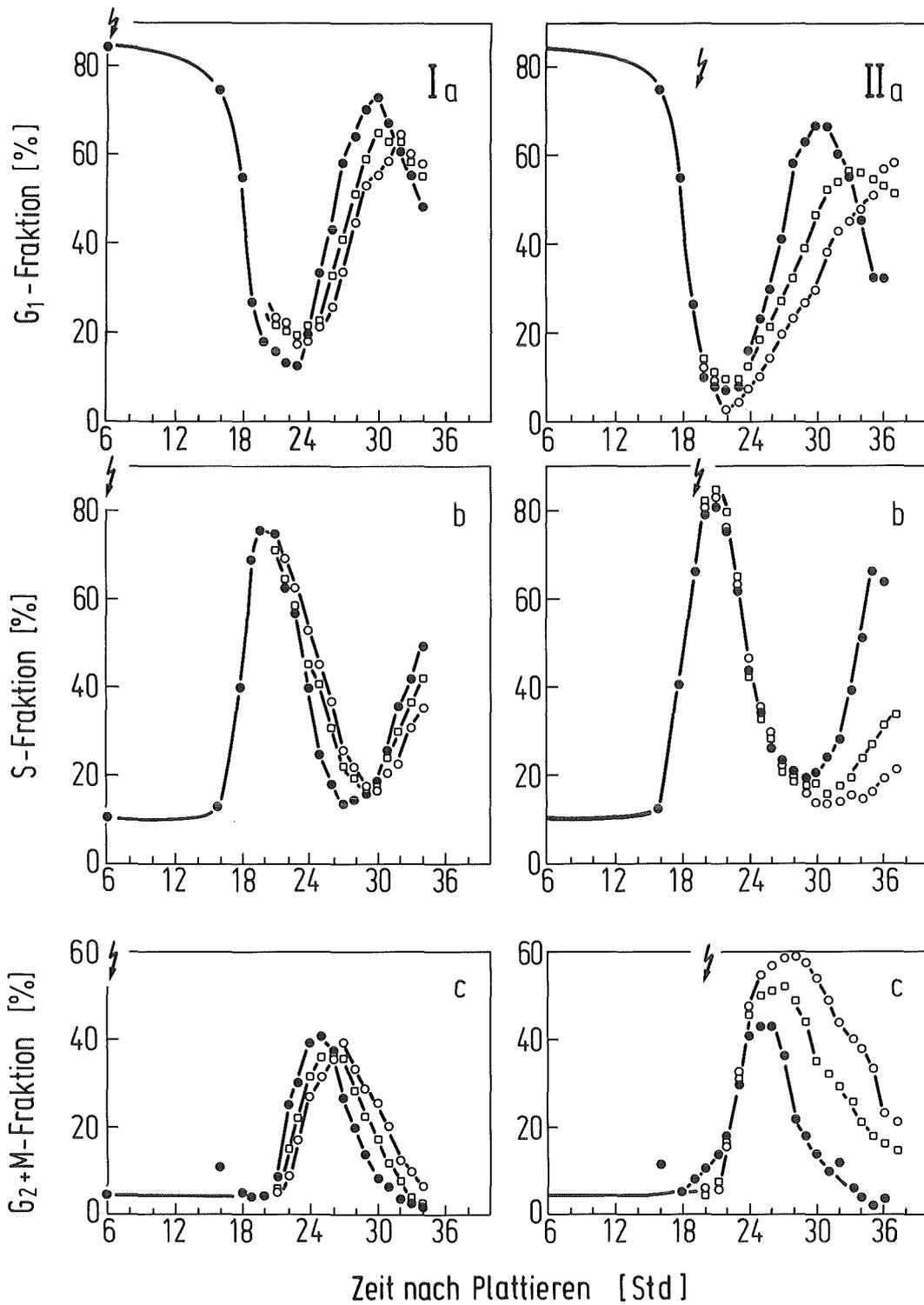


Abbildung 11

Zytofluorometrisch ermittelte Zellzyklusveränderungen von synchronisierten L 929 Zellen nach Bestrahlung mit Alphateilchen während der G1-Phase (I) und der S-Phase (II). Kontrolle (●), 0,15 Gy (□) und 0,3 Gy (○).

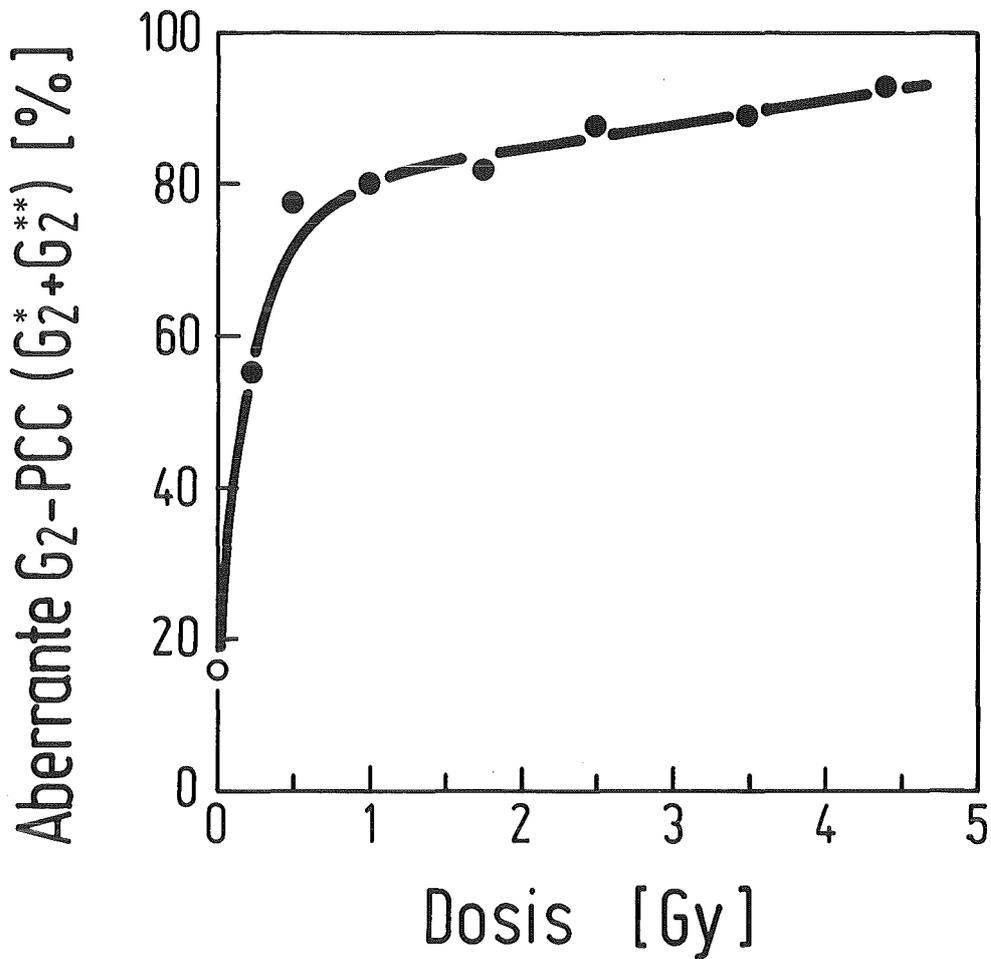


Abbildung 12

Prozentsatz aberranter G2-Zellen nach Alphabestrahlung (bestimmt durch PCC-Analyse) in Abhängigkeit von der Dosis.

G2* = aberrante G2-Zellen mit Brüchen, dizentrischen und azentrischen Chromosomen sowie verschiedenen Austauschfiguren.

G2** = aberrante G2-Zellen mit überwiegend Brüchen und dekondensierten Zonen.

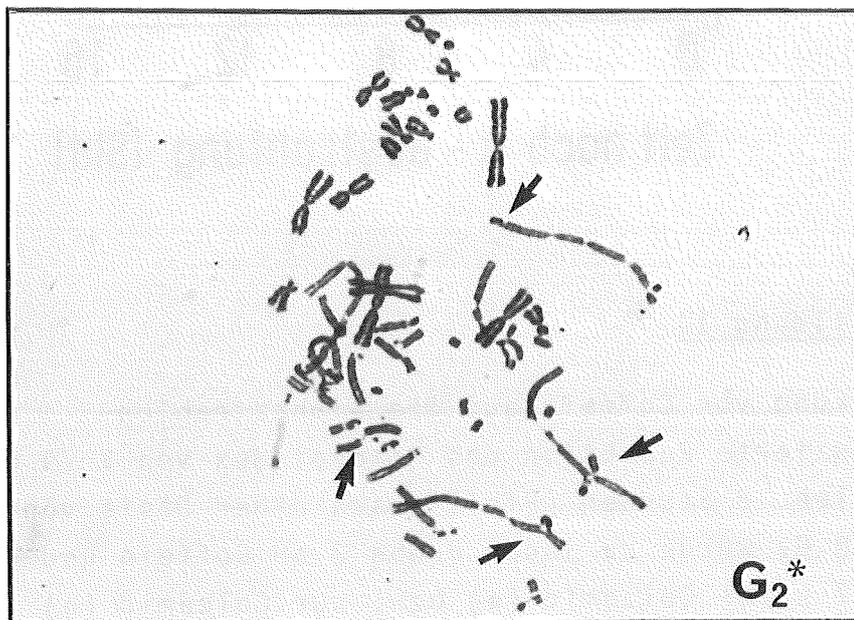
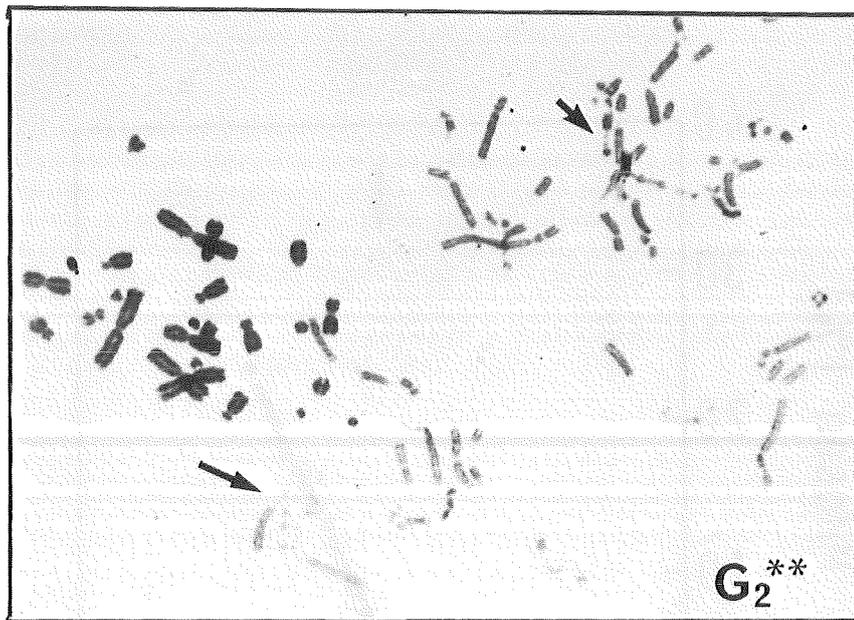


Abbildung 13

Vorzeitig kondensierte Chromosomen aberranter G_2 -Zellen nach Alphabestrahlung.

G_2^* -PCC : Chromosomen mit Brüchen und Austausch, sowie di- und azentrische Chromosomen.

G_2^{**} -PCC: Chromosomen mit überwiegend Brüchen und dekondensierten Bereichen.

Die stark kondensierten Chromosomen stammen von den zur Fusion verwendeten V 79 Mitosen.

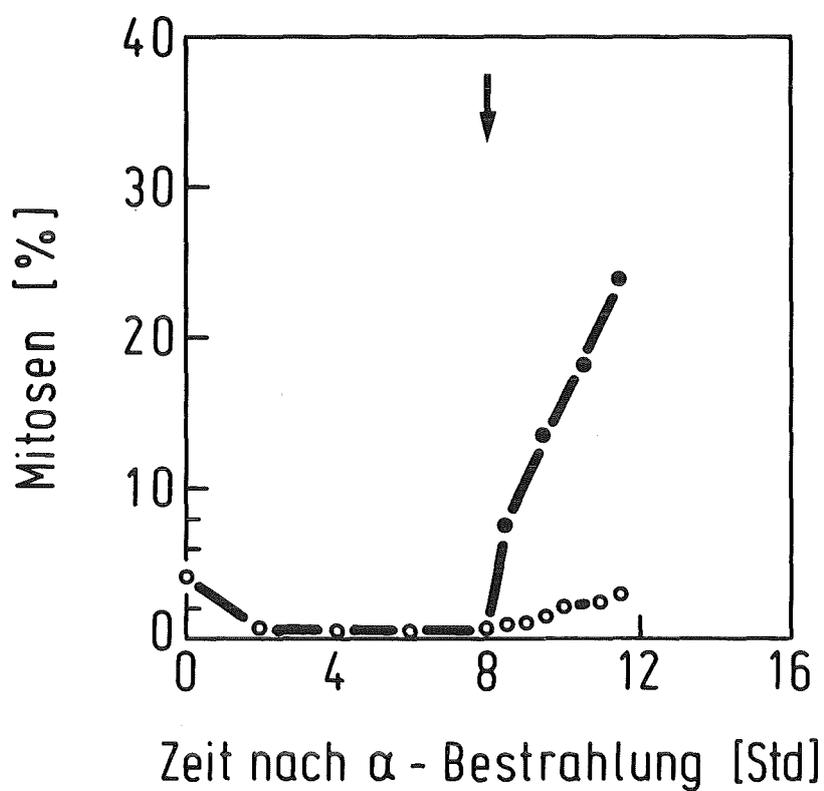


Abbildung 14

Wirkung von Coffein auf die Alphastrahlen-induzierte Reduktion des Mitoseindex von V 79 Zellen. 8 Stunden (Pfeil) nach einer Dosis von 4,38 Gy wurde zu jeder Probe 2 mM Coffein und 0,17 $\mu\text{g/ml}$ Colcemid (●) bzw. nur Colcemid (○) gegeben.

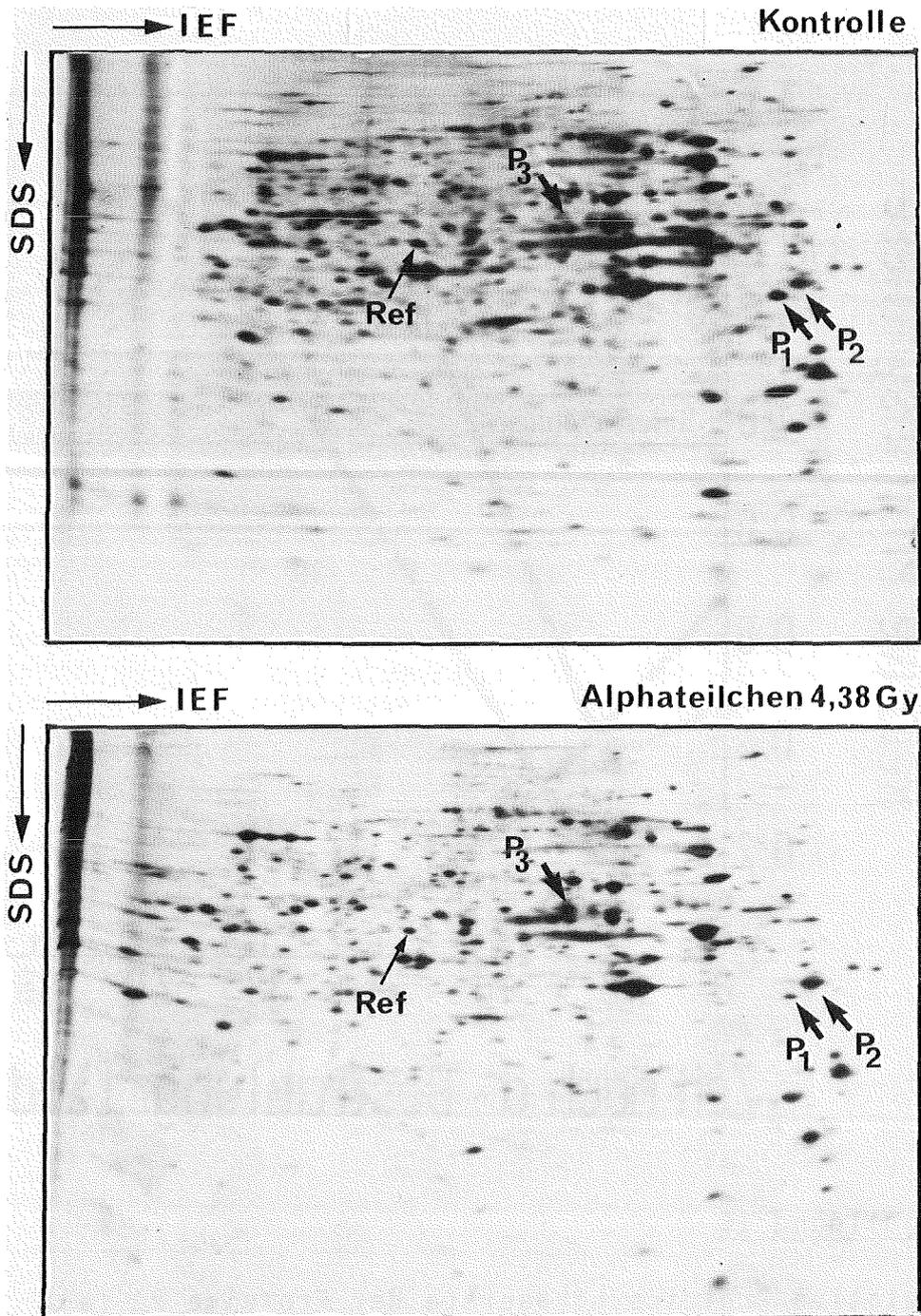


Abbildung 15

Zweidimensionale Trennung der pulsmarkierten Proteine von V 79 Kontrollzellen (oben) und alphabestrahlten V 79 Zellen (4,38 Gy) 39 Stunden nach Bestrahlung (unten). Die Proteine mit veränderter Syntheserate (P1, P2 und P3) und das Referenzprotein (Ref) sind mit Pfeilen markiert. Die Trennung in der ersten Dimension erfolgte nach der Ladung der Proteine (IEF; saure Proteine sind rechts), in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (SDS; das Molekulargewicht nimmt von oben nach unten ab).

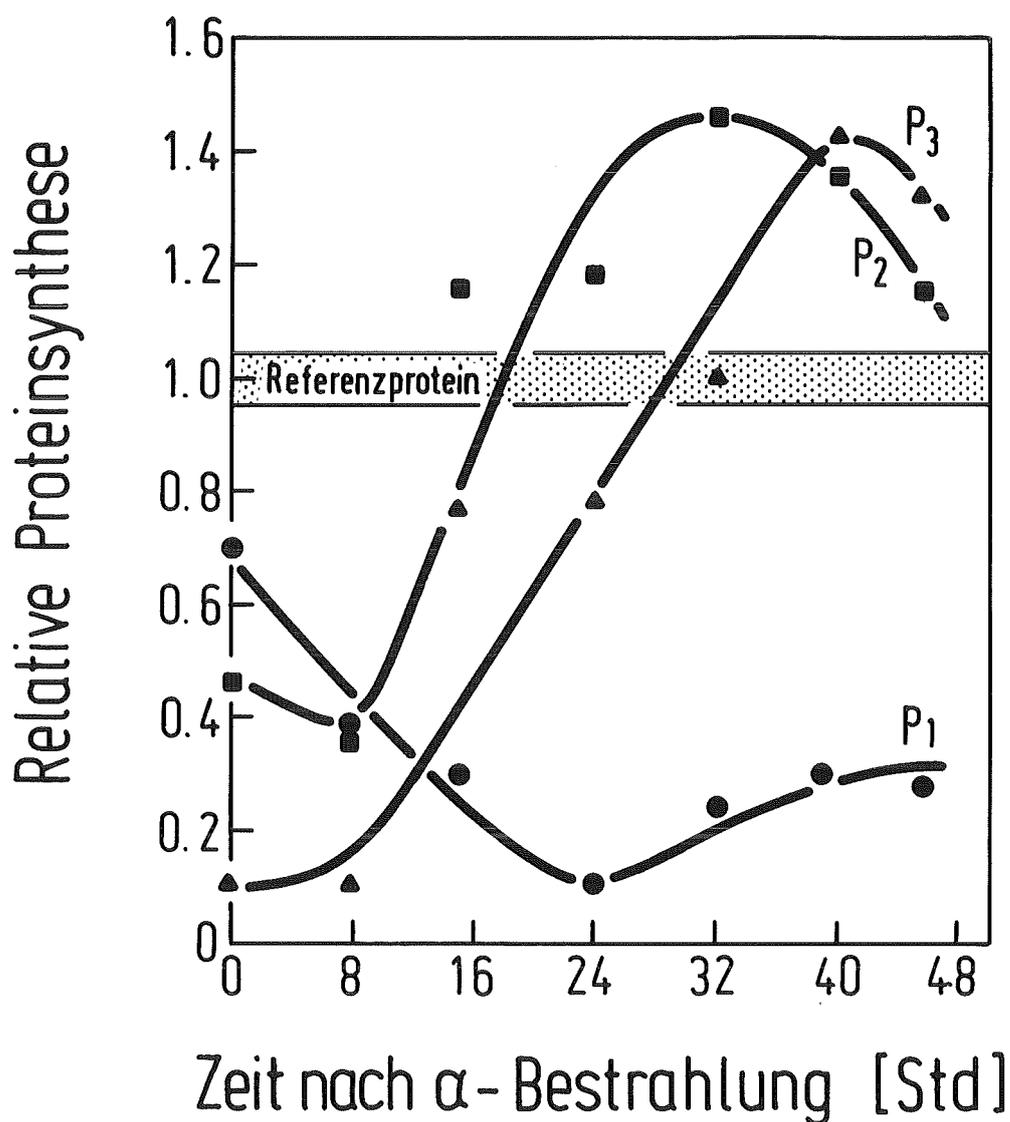


Abbildung 16

Relative Proteinsyntheserate der Proteine P1 (●), P2 (■) und P3 (▲) in V 79 Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach 4,38 Gy Alphateilchen. Die Werte wurden durch densitometrische Messung der Filmschwärzung von Fluorogrammen zweidimensionaler Gele ermittelt. Als Referenzprotein wurde ein Protein genommen, welches keine Veränderungen zeigt.

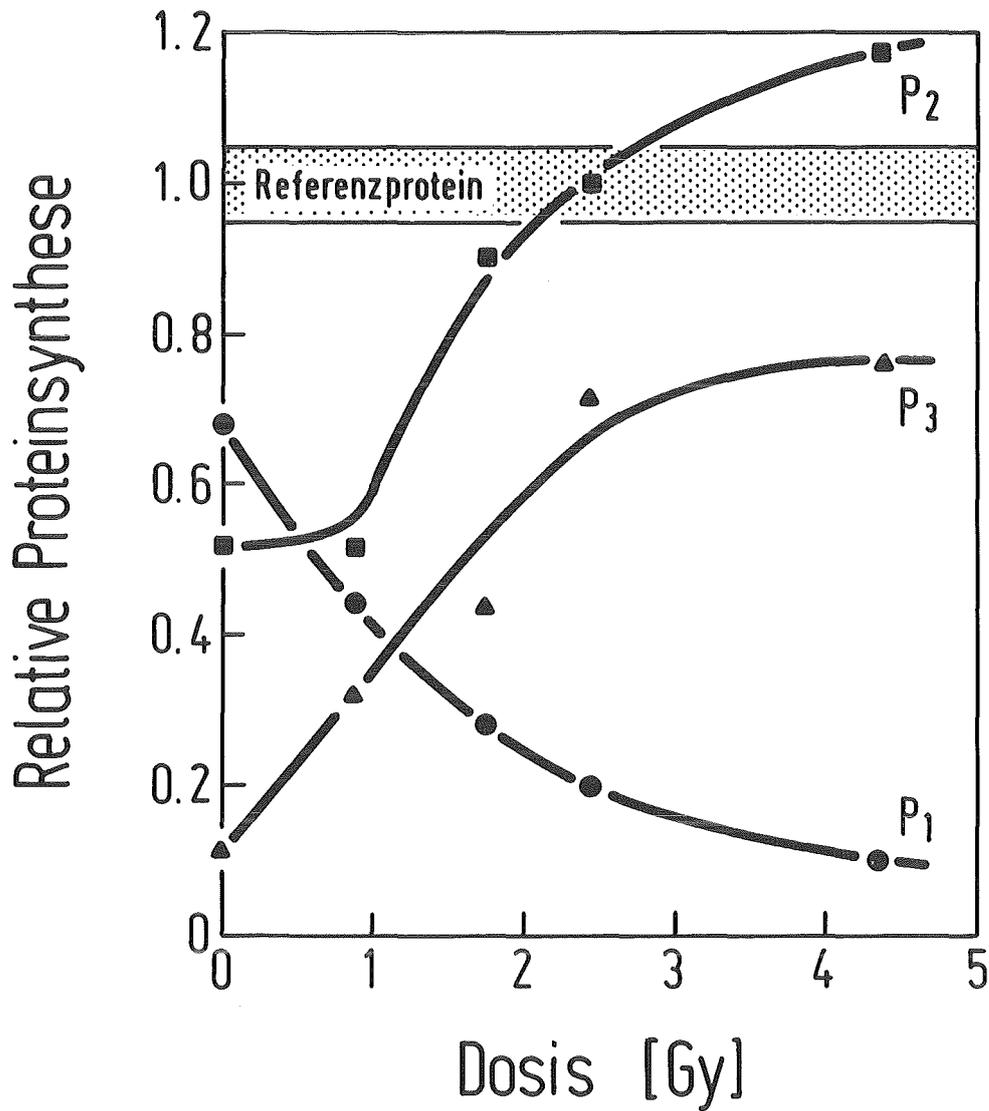


Abbildung 17

Relative Proteinsyntheserate der Proteine P1 (●), P2 (■) und P3 (▲) in V 79 Zellen 24 Stunden nach Alphabestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis. Die Werte wurden durch densitometrische Messung der Filmschwärzung von Fluorogrammen zweidimensionaler Gele ermittelt. Referenzprotein wie in Abb. 16.

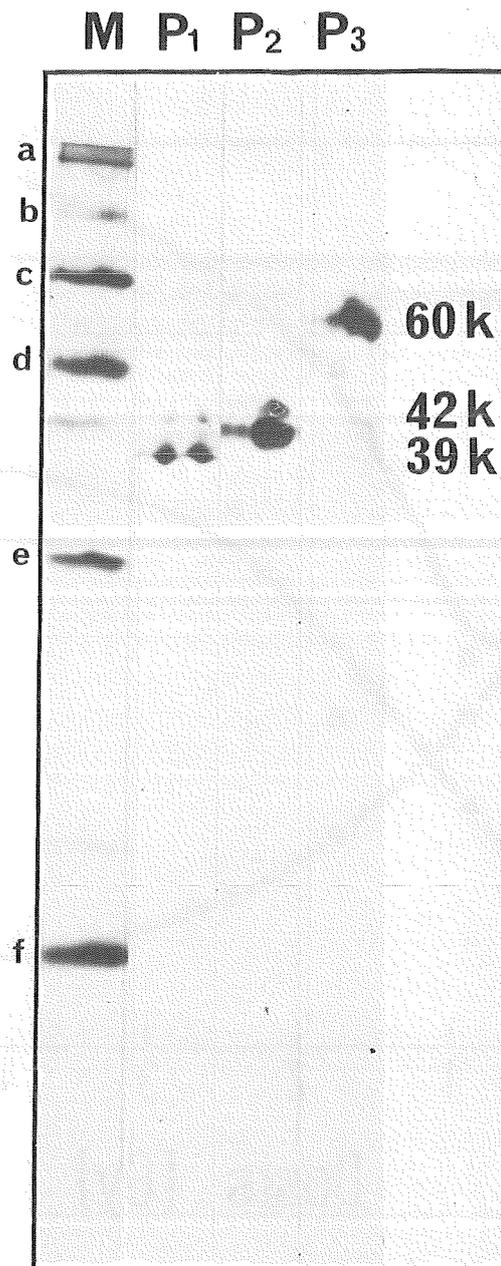


Abbildung 18

Molekulargewichtsbestimmung der Proteine P1, P2 und P3 durch eindimensionale Gelelektrophorese (15 % SDS) zusammen mit ¹⁴C-Markerproteinen (M); Myosin: MG 200 kD (a), Phosphorylase b: MG 92 kD (b), Rinderserumalbumin: MG 69 kD (c), Ovalbumin: MG 46 kD (d), Carboanhydrase: MG 30 kD (e) und Lysozym: MG 14 kD (f).

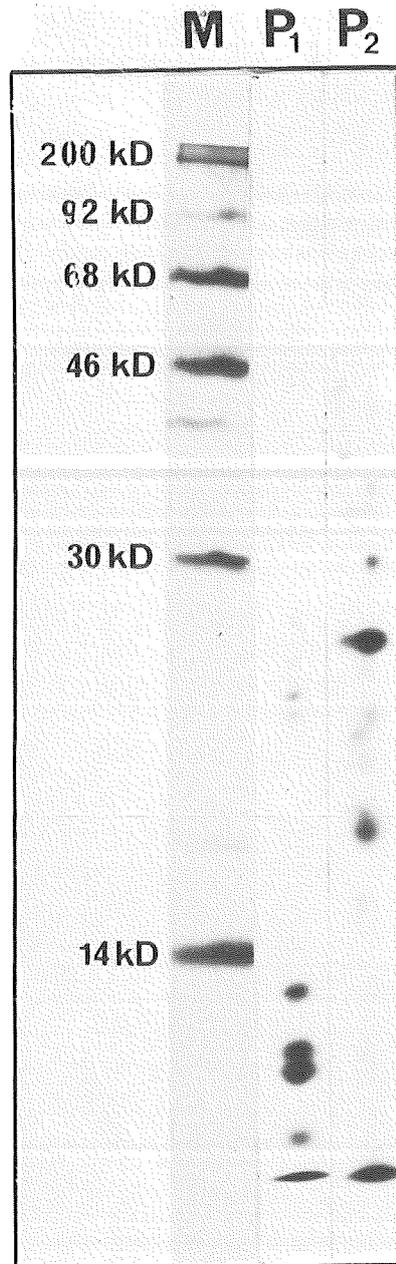


Abbildung 19

Fragmentmuster der Proteine P1 und P2 nach begrenztem proteolytischem Verdau durch V8 Protease.

M: ¹⁴C-Markerproteine (Myosin: MG 200 kD, Phosphorylase b: MG 92 kD, Rinderserumalbumin: MG 69 kD, Ovalbumin: MG 46 kD, Carboanhydrase: MG 30 kD und Lysozym: MG 14 kD).