



KfK 3434  
November 1982

**Erhöhte Strahlenresistenz von  
Sphäroiden aus ionisch  
gekoppelten Zellen:  
zytogenetische und  
biochemische  
Untersuchungen**

G. Hinz  
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE  
Institut für Genetik und für Toxikologie von  
Spaltstoffen

KfK 3434

Erhöhte Strahlenresistenz von Sphäroiden aus ionisch  
gekoppelten Zellen: zytogenetische und biochemische  
Untersuchungen

Gudrun Hinz

Von der Naturwissenschaftlich-Mathematischen  
Gesamtfakultät der Universität Heidelberg  
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:

Bei ionisierender Bestrahlung von Zellaggregaten (Sphäroiden) aus kultivierten Säugetierzellen wird eine gegenüber der Einzelzelle (Monolayer) erhöhte Strahlenresistenz beobachtet, jedoch nur dann, wenn die Zellen die Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation über Gap Junctions besitzen. Zur näheren Charakterisierung dieser "Kontakt-Resistenz" (KR) wurde in der vorliegenden Arbeit ihre Auswirkung auf Veränderungen im Zellzyklus, Mutagenität, Chromosomenschädigung und DNA-Reparatur untersucht. Während die Reparatur von DNA-Brüchen nicht verändert war, bewirkte die KR in allen übrigen Tests eine Reduktion der zytogenetischen Schädigung, die unabhängig vom Proliferationszustand der benutzten Zelllinie war. Ferner ließ sich die KR in noch nicht resistenten Sphäroiden durch Aktivatoren der Adenylat-Cyclase (z.B. Prostaglandin  $E_1$ ) stimulieren, nicht jedoch in Monolayern.

Bestimmungen der basalen Adenylat-Cyclase-Aktivität in verschiedenen Zelllinien erbrachten eine Korrelation zur Aktivität der Gap Junctions, woraus auf eine Regulation dieses Enzyms (und damit des cAMP) durch die Gap Junctions geschlossen wurde. Die gefundenen Eigenschaften der KR zeigen eine starke Analogie zu Zytodifferenzierungsprozessen und lassen die KR als fundamentale Eigenschaft dreidimensional organisierter Gewebe aus kommunizierenden Zellen erscheinen.

Increased radioresistance in spheroids of ionically coupled cells: cytogenetic and biochemical investigations

Abstract:

Aggregates (spheroids) of cultured mammalian cells, exposed to ionizing radiation, show an increased radioresistance compared to single cells (monolayer) provided that the cells can undergo intercellular communication via gap junctions. To characterize the phenomenon of "contact resistance" (CR) further, its effects on cell cycle kinetics, mutagenesis, chromosome damage and DNA-repair were investigated. Whereas the repair of DNA strand breaks remained unchanged, in all other tests CR reduced cytogenetic damage, irrespective of the proliferative status of the cell line used. Furthermore, CR could be induced in spheroids not yet resistant by activators of adenylate cyclase (e.g. prostaglandine E<sub>1</sub>). However, no induction could be achieved in monolayers.

Basal adenylate cyclase activity in different cell lines correlated with the activity of the gap junctions. This suggested that a regulation of this enzyme (and thereby of cAMP) might be mediated by the gap junctions. These properties of CR exhibit a remarkable analogy to processes associated with cytodifferentiation. Thus CR appears to be a basic property of three dimensionally organized tissues of communicating cells.

## Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1.	Einführung	1
1.2.	Problemstellung	4
2.	<u>Das Sphäroidsystem</u>	5
2.1.	Züchtung und Wachstum der Sphäroide	5
2.2.	Verteilung der Sphäroidzellen über den Zellzyklus	8
2.3.	Gap Junctions bei B14-Zellen	10
2.4.	Kontakt-Resistenz der B14-Sphäroide	10
3.	<u>Material und Methoden</u>	14
3.1.	Materialien	14
3.2.	Zellkultur und Bestrahlung	15
3.2.1.	Zelllinien und Wachstum	15
3.2.2.	Bestrahlung	16
3.2.3.	Koloniebildungstest	16
3.3.	Durchflußmikrofluorimetrie	17
3.4.	Chromosomenanalyse	18
3.5.	Reparatur von DNA-Strangbrüchen	19
3.5.1.	Prinzip der alkalischen Strangtrennung mit anschließender Hydroxylapatitchromatographie	19
3.5.2.	Anwendung auf B14-Monolayer und Sphäroide	22
3.5.3.	Fluoreszenz-Markierung und spektralfluorimetrischer Nachweis der DNA	23
3.5.4.	Radioaktive Markierung der B14-Zellen	27
3.6.	Thioguanin-Resistenztest	27
3.7.	Stimulierung der B14-Zellen mit Aktivatoren der Adenylat-Cyclase	30
3.7.1.	Stimulierung mit Prostaglandin E <sub>1</sub>	30
3.7.2.	Stimulierung mit Forskolin	31
3.8.	Messung der Adenylat-Cyclase bei verschiedenen Zelllinien	31
4.	<u>Ergebnisse</u>	34
4.1.	Veränderungen im Zellzyklusverlauf nach Bestrahlung	34
4.2.	Chromosomenaberrationen	36

4.3.	Reparatur von DNA-Strangbrüchen bei ML und Sph	38
4.4.	Zellkontakt und radioaktive Markierbarkeit von B14-Zellen	41
4.5.	Induktion der TG-Resistenz	43
4.6.	Kinetik der Entstehung der Kontakt-Resistenz	45
4.7.	Induktion der Kontakt-Resistenz in kleinen Sphäroiden	45
4.7.1.	Stimulierung mit PGE <sub>1</sub>	45
4.7.2.	Stimulierung mit Forskolin	49
4.8.	Messung der basalen Adenylat-Cyclase-Aktivität bei verschiedenen Zelllinien	49
5.	<u>Diskussion</u>	54
5.1.	Kontakt-Resistenz als Eigenschaft einer Einzelzelle	54
5.2.	Gap Junctions und die Regulation membrangebundener Enzyme	55
5.3.	Die Rolle des dreidimensionalen Kontaktes	56
5.4.	Ist cAMP für die Kontakt-Resistenz von Bedeutung?	57
5.5.	Ist die Kontakt-Resistenz die Folge einer verbesserten DNA-Reparatur?	59
5.6.	Kommt die Kontakt-Resistenz durch SOS-Reparatur der DNA zustande?	60
5.7.	Schlußbemerkungen	63
6.	<u>Zusammenfassung</u>	64
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	66
8.	<u>Anhang</u>	
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	72



## 1. Einleitung

### 1.1. Einführung

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Prokaryonten und Eukaryonten besteht in der Fähigkeit der Eukaryonten, Zellkommunikation zu entwickeln und 3-dimensional organisierte Gewebe zu bilden. Damit verbunden ist eine morphologische und funktionelle Differenzierung der Zellen im Gewebeverband. Differenzierungsprozesse, die durch 3-dimensionale Zellaggregation initiiert werden, sind an so verschiedenartigen Systemen wie dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* oder an Granulosa-Zellen der Ratte beobachtet worden und reichen von der Synthese neuer Proteine bis zur Entwicklung spezifischer Hormonrezeptoren.

Eine wesentliche Rolle bei solchen Gewebedifferenzierungsprozessen spielen die sogenannten Gap Junctions. Bei diesen interzellulären Verbindungen handelt es sich um Membrandifferenzierungen, die bei bestimmten Zellen an Stellen mit engem Membrankontakt entstehen. Im Gefrierbruch stellen sie sich als transzelluläres Porensystem dar, welches den Austausch von Ionen und Molekülen mit einem Molekulargewicht von  $<10^3$  Dalton ermöglicht (1,2). Infolge der durch Ionenaustausch bedingten elektrischen Leitfähigkeit lassen sich Gap Junctions mit Hilfe der Mikro-Elektroden-technik nachweisen (3). Am Beispiel der Entwicklung von Mäuseembryonen (4,5) und der Zytodifferenzierung von embryonalen Teratokarzinom-Zellen (6,7) zeigten Lo und Gilula die Bedeutung von Gap Junctions bei Differenzierungsvorgängen auf. Zusätzlich zur Mikro-Elektroden-technik verwendeten sie die Methode des Farbstoffaustausches.

Die Erforschung der Zellkommunikation über Gap Junctions und der bei dreidimensionaler Zellorganisation auftretenden Prozesse hat durch die Möglichkeit, Zellen *in vitro* als sphärisch wachsende Klone, sogenannte Multizell-Sphäroide zu züchten, neue Impulse erhalten (8). Sutherland und Mc Credie beobachteten an V79 chinesischen Hamsterzellen, daß diese in Suspensionskultur zu kleinen "Zellkügelchen"

aggregierten und schließlich zu multizellulären Sphäroiden heranwachsen. Allerdings wurde das Hauptaugenmerk bislang auf die Eigenschaften der Sphäroide als *in vitro* Tumormodelle gelegt. Sutherland und Mc Credie konnten zeigen, daß Sphäroide morphologisch ähnlich aufgebaut sind wie die Knötchen syngeneischer Transplantate von C3H Mamma-Karzinomen bei Mäusen und wie eine ganze Reihe menschlicher Karzinome der Lunge, der Brust und des Halses (9). Auf Grund mikroskopischer Untersuchungen an V79-Sphäroiden fanden sie, daß große Sphäroide ( $>300 \mu\text{m}$ ) ähnlich wie *in vivo* Tumore in drei Zonen unterteilt werden können: in eine äußere Zellschicht, die aus aktiv proliferierenden Zellen besteht, in eine mittlere Zone, die schlecht ernährt ist und nur mangelhaft mit Sauerstoff versorgt wird und die daher nur wenige mitotische Zellen enthält und in ein inneres Nekrosezentrum. Mit zunehmender Sphäroidgröße erhöht sich die Zahl der Zellen, die sich nicht mehr teilen. Die Wachstumskurve multizellulärer V79-Sphäroide ist vergleichbar der der Maus-Transplantate (9). Bestrahlungsunempfindliche, sauerstoffarme (= hypoxische) Zellen im Inneren dieses *in vitro* Tumormodells wurden von Sutherland und Durand durch Zufuhr von Sauerstoff, Sensibilisierung mit spezifischen Chemikalien und autoradiographische Untersuchungen nachgewiesen (10). Sehr große Sphäroide bestanden zu ungefähr 20 % aus hypoxischen Zellen, was den Verhältnissen bei vielen Tumoren *in vivo* (11) entspricht. Auf Grund all dieser Eigenschaften, die die Sphäroide als *in vitro* Tumormodelle geeignet erscheinen ließen, war und ist die Sphäroidforschung vorwiegend strahlen- und chemotherapeutisch ausgerichtet.

Die Thematik der vorliegenden Doktorarbeit geht auf eine Beobachtung zurück, die Durand und Sutherland (12) an Sphäroiden von V79-Zellen des chinesischen Hamsters machten, und die sie als "Kontakt-Resistenz" bezeichneten. Mit der erwähnten Resistenz hypoxischer Zellen hat dies nichts zu tun: Zellen, die als Sphäroide gezüchtet und als solche mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  bestrahlt wurden, erwiesen sich gegenüber der Strahlung resistenter als der entsprechende Monolayer, der

mit der gleichen Dosis bestrahlt wurde. Dies bedeutet, daß bei gleicher Strahlendosis Sphäroidzellen im Koloniebildungstest besser überlebten als Monolayerzellen. Durand und Sutherland vermuteten, daß für diese erhöhte Strahlenresistenz die ausgeprägte interzelluläre Kommunikation innerhalb des dreidimensionalen Zellverbandes verantwortlich ist. Sie glaubten, daß möglicherweise zwischen den Zellen Substanzen ausgetauscht würden, die es ihnen ermöglichten, DNA-Schäden besser zu reparieren.

Diese Hypothese wurde aber nie streng überprüft, bis Dertinger und Hülser (13) zeigen konnten, daß die Kontakt-Resistenz mit der Fähigkeit der Zellen zur Ausbildung von Gap Junctions korreliert. Bei sechs verschiedenen Zelllinien verglichen sie das Überleben von Monolayer- und Sphäroidkulturen nach  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Bestrahlung. Parallel dazu untersuchten sie mit Hilfe der Mikro-Elektrodentechnik an den Monolayern dieser Zelllinien, ob sie ionisch gekoppelt sind. Dabei stellten sie fest, daß Kontakt-Resistenz nur bei Sphäroiden von ionisch gekoppelten Zelllinien auftritt.

Wie aus diesen Untersuchungen klar hervorgeht, ist die Kontakt-Resistenz also ein Phänomen, welches zusätzlich zur dreidimensionalen Zellorganisation auch das Vorhandensein von Gap Junctions erfordert. Daher könnte es sich hierbei um die Folge eines differenzierungsähnlichen Prozesses handeln.

## 1.2. Problemstellung

In dieser Arbeit sollten Anhaltspunkte dafür gesucht werden, welche Rolle den Gap Junctions und der dreidimensionalen gewebeartigen Organisation der Zellen im Sphäroid bei der Ausbildung der Kontakt-Resistenz zukommt und inwiefern es sich hierbei um einen differenzierungsähnlichen Prozeß handelt. Insbesondere sollte in diesem Zusammenhang die Rolle des cyclischen AMP's über Messungen der membrangebundenen Adenylat-Cyclase ermittelt werden. (Regulation dieses Enzyms durch die Gap Junctions?) Außerdem sollten DNA-bezogene Prozesse der Kontakt-Resistenz näher untersucht werden:

Ist die Kontakt-Resistenz eine Eigenschaft der inneren ruhenden Sphäroidzellen, oder umfaßt sie auch die äußeren proliferierenden Zellen (Messung von Zykluseffekten und Chromosomenaberrationen)?

Funktioniert die DNA-Reparatur in Sphäroiden besser als im Monolayer?

Kommt die Kontakt-Resistenz durch eine sog. SOS-Reparatur der DNA zustande (höhere strahleninduzierte Mutationsrate in Sphäroiden)?

Alle Untersuchungen wurden mit der chinesischen Hamster-Zelllinie B14 FAF 28/B7 durchgeführt, die ionisch gut gekoppelt ist und ausgeprägte Kontakt-Resistenz zeigt (13).

## 2. Das Sphäroidsystem

### 2.1. Züchtung und Wachstum der Sphäroide

Die bei den zytogenetischen Versuchen durchweg verwendete chinesische Hamster-Zelllinie B14 FAF 28/B7 hat unter anderem den Vorteil, daß sie unter den gleichen Ernährungsbedingungen als Monolayer oder als Sphäroide gezüchtet werden kann.

Einige Zelllinien bilden aus einer Suspensionskultur heraus durch spontane Aggregation Sphäroide. In der Regel muß die initiale Aggregation jedoch durch eine spezielle Behandlung induziert werden. Hierzu hat es sich bewährt,  $1-2 \times 10^6$  Einzelzellen für 2 Tage auf einer Bakterienpetrischale (10 cm Durchmesser) bei  $37^{\circ}\text{C}$  zu inkubieren. Da sich die Zellen auf dem unbehandelten Boden dieser Schalen nicht oder nur ungenügend anheften können, bilden sich mit der Zeit Mini-Aggregate aus, die danach in Spinnerkultur überführt werden.

Unter ständigem Rühren (180 UpM) und täglichem Mediumwechsel vergrößert sich der Durchmesser der Sphäroide durch Zellteilungen täglich um durchschnittlich 50 - 60  $\mu\text{m}$ . In Abbildung 1 ist eine Gruppe von Sphäroiden, wie sie nach 3 Tagen Spinnerkultur erhalten werden, zu sehen. Ihr Durchmesser beträgt zwischen 260 und 300  $\mu\text{m}$ .

Die Wachstumskurve der B14-Sphäroide ist in Abbildung 2 dargestellt. Hierbei wurde das Sphäroid-Volumen, das aus dem mikroskopisch ermittelten Durchmesser berechnet wurde, gegen die Tage in Spinnerkultur aufgetragen. Der Tag 0 bezeichnet den Tag, an dem die Mini-Sphäroide von der Petrischale in die Spinnerflasche überführt wurden. Wie aus dieser Abbildung auf Grund der Tatsache, daß das Wachstum in halblogarithmischer Darstellung keiner Geraden folgt, klar hervorgeht, vermehrt sich die Zahl der Zellen im Sphäroid nicht exponentiell, sondern langsamer. Dies läßt sich dadurch erklären, daß mit zunehmendem Sphäroid-Volumen immer weniger Zellen, insbesondere die inneren Sphäroidzellen, an der Proliferation teilnehmen.

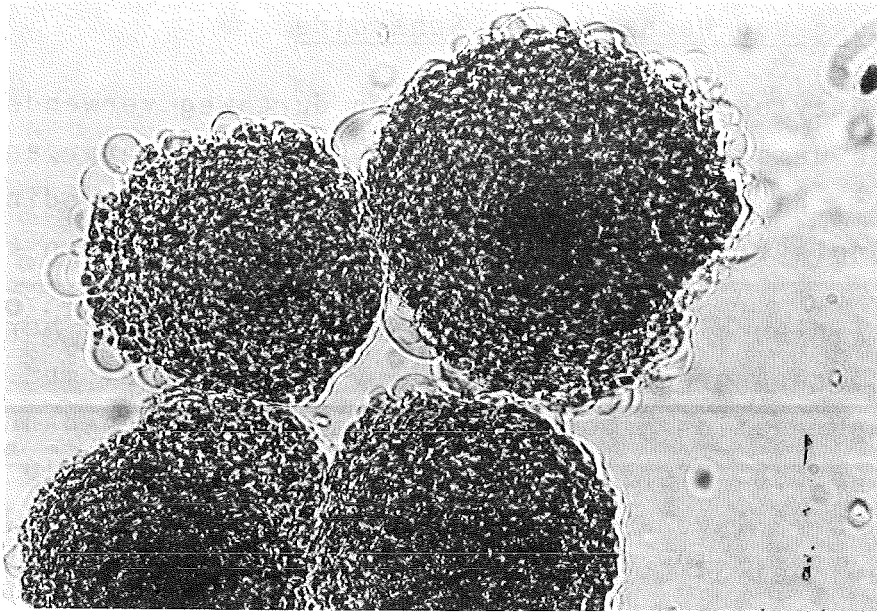


Abb. 1: Multizell-Sphäroide der chinesischen Hamster-Zelllinie B14 FAF 28/B7 nach 3. Tagen Wachstum in Spinnerkultur; MEM-Medium mit Hank's Salzen und 15 % FCS; Größe: 260 - 300  $\mu\text{m}$ .

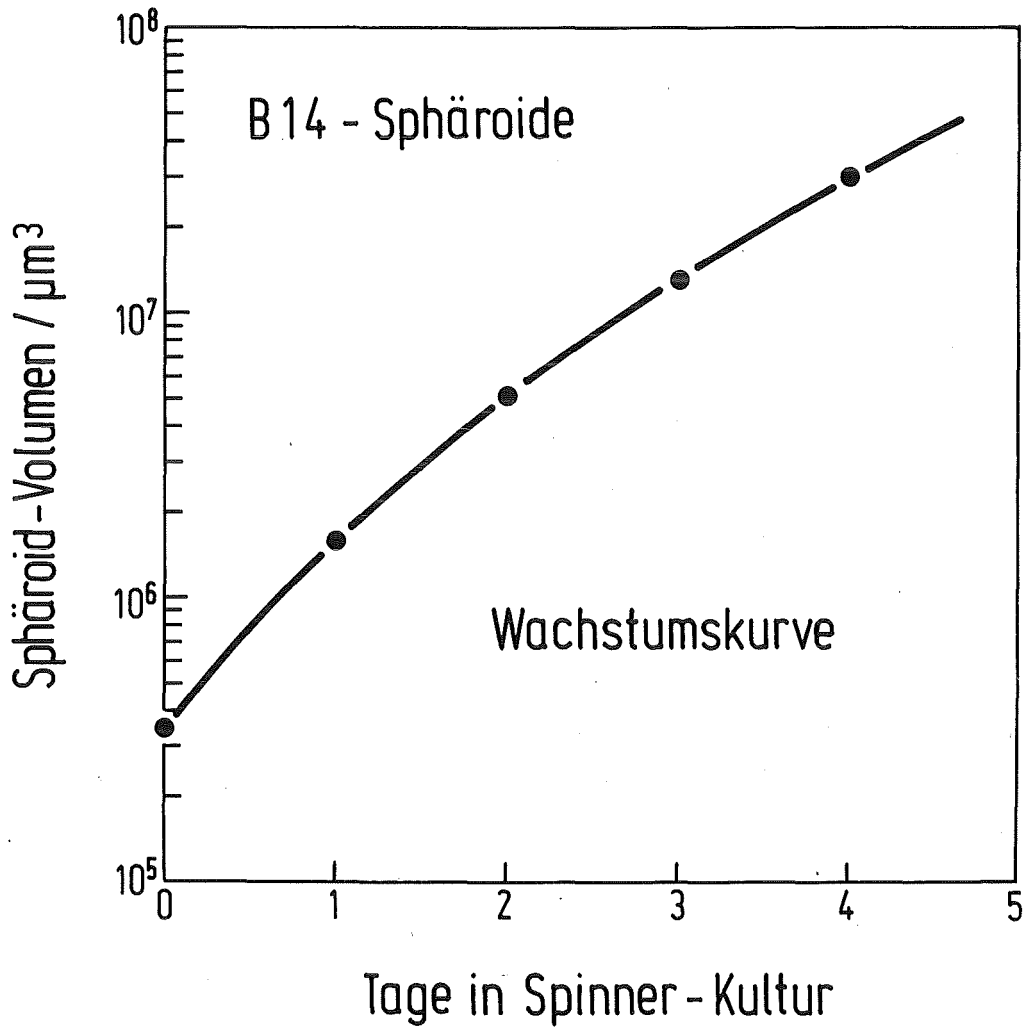


Abb. 2: Wachstumskurve der B14-Sphäroide; das mikroskopisch ermittelte Sphäroid-Volumen wurde gegen die Tage in Spinnerkultur aufgetragen; der Tag 0 bezeichnet den Tag, an dem die Miniaggregate von der Petrischale in die Spinnerflasche überführt wurden.

## 2.2. Verteilung der Sphäroidzellen über den Zellzyklus

Um Aufschluß darüber zu erhalten, welche Zellen das Sphäroid-Wachstum bedingen, wurden die Sphäroide mit Hilfe der sog. "fraktionierten Trypsinierung" (14), von außen nach innen fortschreitend, in eine Folge von Einzelfraktionen dissoziiert, die dann mittels der Durchflußmikrofluorimetrie (FMF-Technik; siehe Material und Methoden 3.3.) auf ihre DNA-Verteilung hin untersucht wurden. Bei der fraktionierten Trypsinierung werden unter Einwirkung von 0,25 %igem Trypsin zunächst die äußeren Zellen unter dem Mikroskop abgeschüttelt. Dann wird die Trypsinierung durch Medium gestoppt und, nach Abziehen der entstandenen Einzelzellsuspension, durch Zugabe von Trypsin erneut gestartet. Hier wurden lediglich die äußeren und die nach Verwerfung einer Zwischenfraktion (Mischpopulation) erhaltenen inneren Zellen weiter untersucht. Von beiden Fraktionen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben (3.3.), Zellkerne präpariert, von denen nach Färbung mit Ethidiumbromid DNA-Histogramme aufgenommen wurden (Abb. 3). Aus den in Abbildung 3 gezeigten Histogrammen für die äußeren und die inneren B14-Sphäroidzellen wurde der Prozentsatz der Zellen in den einzelnen Stadien des Zellzyklus errechnet (Tabelle 1; siehe Material und Methoden).

Tab. 1: Zyklus-Phasenverteilung von äußeren und inneren Sphäroidzellen der Zelllinie B14 FAF 28/B7

Zyklus-Phase	äußere Zellen %	innere Zellen %
G <sub>1</sub>	34	77
S	45	8
G <sub>2</sub> +M	21	15

Wie aus Abb. 3 und Tab. 1 hervorgeht, besteht das Innere eines Sphäroids zum überwiegenden Teil aus G<sub>1</sub>-Zellen. Ferner gibt es kaum S-Phase-Zellen. Damit handelt es sich



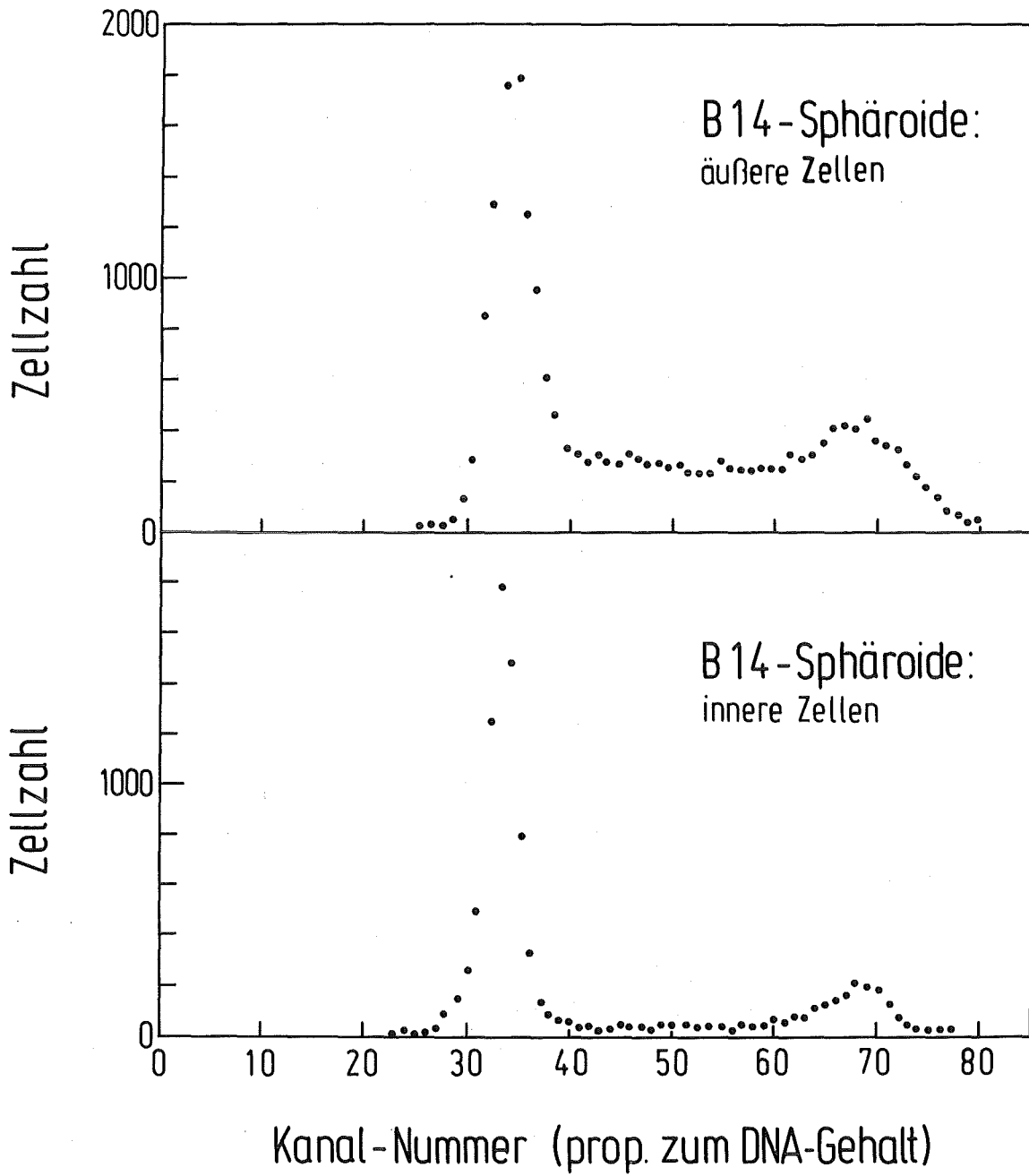


Abb. 3: Zellzyklusverteilung von äußeren und inneren Sphäroidzellen der B14-Zelllinie; die DNA-Verteilung wurde mit Hilfe der FMF-Technik bestimmt.

bei den inneren Zellen praktisch um Ruhezellen, von denen keine Proliferation ausgeht.

Im Gegensatz dazu stellen die äußeren Zellen mit 45 % S-Zellen eine aktiv proliferierende Subpopulation der Sphäroide dar und sind in dieser Hinsicht exponentiell wachsenden Monolayern vergleichbar (siehe auch Ergebnisse 4.1., Abb. 9 für  $t = 0$ ).

Aus dieser Zyklus-Phasenverteilung erklärt sich auch das nicht-exponentielle Wachstum der Sphäroide. Mit zunehmender Größe erniedrigt sich, relativ zur Gesamtzellzahl, die Anzahl an äußeren proliferierenden Zellen, da sie nur in erster Näherung proportional zur Oberfläche zunimmt. Die bei sehr großen Sphäroiden häufig beobachtete zentrale Nekrose tritt bei den hier benutzten Exemplaren von höchstens 300  $\mu\text{m}$  Durchmesser nicht auf.

### 2.3. Gap Junctions bei B14-Zellen

Es wurde bereits erwähnt (siehe Einleitung, (13)), daß die Kontakt-Resistenz mit der Fähigkeit der Zellen zur Ausbildung von Gap Junctions korreliert. Auch bei den B14 chinesischen Hamsterzellen ließen sich Gap Junctions nachweisen, und zwar sowohl infolge ionischer Kopplung (13) als auch durch Elektronenmikroskopie. Abbildung 4 zeigt eine solche elektronenmikroskopische Gefrierbruchaufnahme von Gap Junctions in B14-Sphäroiden. Im Gefrierbruch erscheinen diese Differenzierungen der Plasmamembran, die an Stellen mit engem Zell-Zell-Kontakt entstehen, als transzelluläres Porensystem aus polygonal angeordneten, einheitlich großen Intramembran-Proteinpartikeln, den sog. "Connexons" (15).

### 2.4. Kontakt-Resistenz der B14-Sphäroide

Wie Dertinger und Hülser (13) zeigen konnten, handelt es sich bei den B14 FAF 28/B7 Zellen um eine gut gekoppelte Zelllinie, deren Sphäroide gegenüber einem entsprechenden Monolayer eine ausgeprägte Kontakt-Resistenz zeigen. In Abbildung 5 wurden die Dosis-Effekt-Kurven von B14-Monolayer und Sphäroiden gegenübergestellt. Hierfür wurden Monolayer und Sphäroide



Abb. 4: Gefrierbruchaufnahme von Gap Junctions bei B14-Sphäroiden. Balkenlänge 1  $\mu\text{m}$ .  
Diese Aufnahme wurde von Herrn Hülser, Universität Stuttgart, angefertigt.

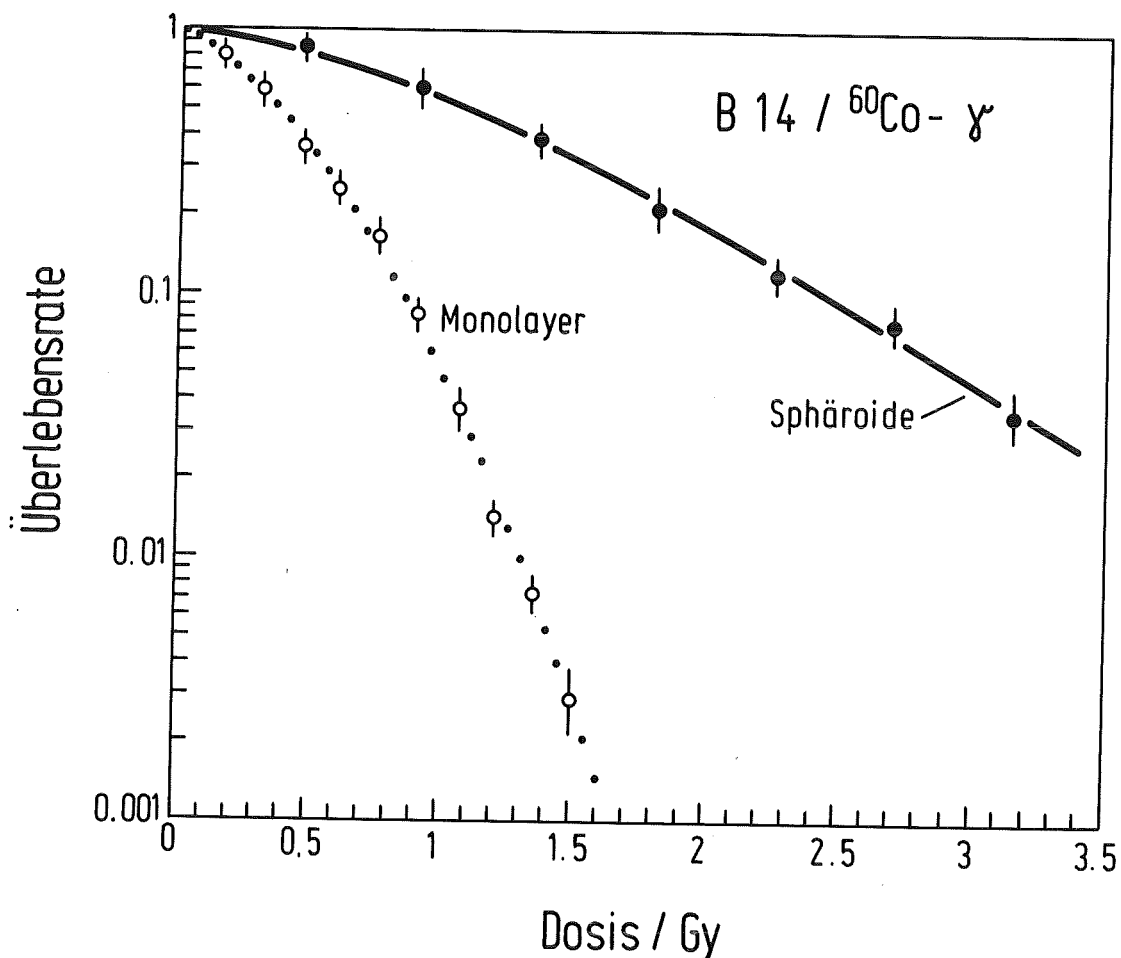


Abb. 5: Dosis-Effekt-Kurve der Zelllinie B14 FAF 28/B7. Überleben von Monolayern und Sphäroiden nach Bestrahlung mit steigenden Dosen  $^{60}\text{Co}-\gamma$ ; Bestrahlung bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

(Durchmesser  $270\ \mu\text{m}$ ) unter gleichen experimentellen Bedingungen mit steigenden Dosen  $^{60}\text{Co}-\gamma$  bestrahlt, anschließend trypsinisiert und auf ihre Koloniebildungsfähigkeit getestet. Dabei war es wichtig, daß die Temperatur während der Bestrahlung der Sphäroide konstant bei  $37^{\circ}\text{C}$  gehalten wurde, da nur unter diesen Bedingungen die Kontakt-Resistenz beobachtet wird (16).

Wie aus Abbildung 5 deutlich hervorgeht, überleben die Sphäroide bei gleicher Dosis besser als die entsprechenden Monolayer.

Es spielt dabei keine Rolle, ob die Sphäroide nach der Bestrahlung total trypsinisiert und alle Zellen auf ihre Lebensfähigkeit getestet wurden, oder ob nach fraktionierter Trypsinierung nur die äußeren Sphäroidzellen, die in ihrem Proliferationsverhalten identisch sind mit einem exponentiell wachsenden Monolayer, verwendet wurden. In beiden Fällen ist die Kontakt-Resistenz voll ausgeprägt.

Im Gegensatz zu den V79-Sphäroiden tritt bei den B14-Sphäroiden die von Sutherland und Durand (10) beobachtete Hypoxie nicht auf. Der Dosis-Effekt-Kurve der B14-Sphäroide fehlt die typische hypoxische Schulter, woraus gefolgert werden kann, daß alle Sphäroidzellen ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

Amersham Buchler, Braunschweig:

[2-<sup>14</sup>C] Thymidin (57,7 mCi/mmol)

Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien:

Hydroxylapatit für die Säulenchromatographie  
(DNA Grade, Bio-Gel HTP)

Fa. Boehringer, Mannheim:

Kreatin-Phosphat

Kreatin-Kinase (E.C. 2.7.3.2, 25 U/mg)

ATP, GTP

Calbiochem - Behring Corp., Gießen:

Forskolin

Ciba AG, Wehr/Baden:

Colcemid ( N-Desacetyl-N-Methyl-Colchicin)

Gibco, Europe:

fötales Kälberserum

Fa. Merck, Darmstadt:

Giensa (Azur-Eosin-Methylenblau)

Löfflers-Methylenblau

neutrales Aluminiumoxid (Typ 90, Aktivitätsgrad I)

Pharma - Waldhof GmbH:

cAMP

Fa. Serva, Heidelberg:

MEM-Medium mit Hank's Salzen

DNA aus Kalbsthymus

DTT

Ethidiumbromid

Mithramycin

6-Thioguanin

Fa. Sigma, München:

3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin  
Propidiumjodid  
Prostaglandin E1

Sonstige Bezugsquelle:

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP wurde von G. Schultz und K.H. Jakobs, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Die spezifische Aktivität lag zum Zeitpunkt der Präparation zwischen 50 und 100 Ci/mmol.

### 3.2. Zellkultur und Bestrahlung

#### 3.2.1. Zelllinien und Wachstum

Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Versuche mit der gut gekoppelten chinesischen Hamsterzelllinie B14 FAF 28/B7 durchgeführt, die von Dr. F. Otto (Fraunhofer-Institut, Schmallenberg) zur Verfügung gestellt wurde. Die geringe Zahl an Chromosomen (22; diploid) ließ diese Zelllinie auch für Untersuchungen von Chromosomenschäden besonders geeignet erscheinen.

Unter optimalen Wachstumsbedingungen betrug die Generationszeit dieser Zellen 11 Stunden.

Die schnell wachsenden Zellen wurden als Monolayer in T<sub>260</sub>-Flaschen (Falcon) 3mal wöchentlich subkultiviert. Für die zytogenetischen Untersuchungen wurden die Zellen auf 6 cm Petrischalen (20 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) angesetzt. Als Medium diente Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) mit Hank's Salzen, dem 15 % fötales Kälberserum (FCS) und 0,1 % Bycomycin zugesetzt wurde. Der optimale pH-Wert wurde durch eine 3 % CO<sub>2</sub> enthaltende Gasatmosphäre sichergestellt. Zur Sphäroidkultur wurden Bellco-Spinnerflaschen (100 ml) und Schrittmotor-gesteuerte, drehzahlkonstante Magnetrüher benutzt. Es gelangte das gleiche Medium wie bei den Monolayern zur Anwendung.

Weitere Zelllinien:

Für die Messungen der Adenylat-Cyclase wurden zusätzlich zu den B14-Zellen noch 3 weitere Zelllinien herangezogen, nämlich

die V79-Linie des chinesischen Hamsters, die nur schwach gekoppelt war und keine ausgeprägte Kontakt-Resistenz zeigte (13); ferner 2 Mäusezelllinien: die ungekoppelten L-Zellen (13) und die gut gekoppelten 3T3-Zellen mit ausgeprägter Kontakt-Resistenz (13). Monolayer und Sphäroide dieser Zelllinien wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie bei den B14-Zellen. Entsprechend der längeren Generationszeiten wuchsen jedoch die Sphäroide der L- und der 3T3-Zellen etwa nur halb so schnell wie die der B14-Zellen.

### 3.2.2. Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in einer  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Quelle (Gammacell 200; Atomic Energy of Canada Ltd.), deren Dosisleistung bei 1.56 Gy/min lag. Das hohe Durchdringungsvermögen dieser Strahlung (Halbwertsschichtdicke in biologischem Material 11-12 cm (17)) stellt sicher, daß im Sphäroid alle Zellen die gleiche Dosis erhalten.

Zur Bestrahlung wurden 2 Tage alte, exponentiell wachsende Monolayer (Zelldichte ca.  $3 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ ) verwendet. Bestrahlt wurde immer bei  $37^\circ\text{C}$  unter aeroben Bedingungen.

Die Bestrahlung der Sphäroide erfolgte stets unter den gleichen Bedingungen wie bei den Monolayern. Es wurde hierzu eine geeignete Anzahl Sphäroide auf 6 cm Plastik-Petrischalen in 5 ml Medium gegeben.

### 3.2.3. Koloniebildungstest

Sofort nach Bestrahlung wurden die Monolayer bzw. die Sphäroide trypsiniert, die Zellen gezählt und eine geeignete Zahl auf 6 cm Plastik-Petrischalen plattiert, so daß zwischen 50 und 150 Kolonien heranwuchsen.

Nach 8 Tagen wurden die Kolonien 1 Stunde mit Methanol fixiert und anschließend 15 Minuten mit Methylenblau (1:3 mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. verdünnt) gefärbt.

Schließlich wurden unter dem Binokular alle die Kolonien gezählt, die aus mindestens 50 Zellen bestanden. Bei den unbestrahlten Kontrollen lag die Koloniebildungsfähigkeit (Plating



Efficiency) bei 0,8 - 0,9 (80 - 90 %). Das Überleben errechnet sich aus dem Bruchteil der Koloniebildner in den bestrahlten Kulturen dividiert durch die Plating Efficiency.

### 3.3. Durchflußmikrofluorimetrie

Die Wirkung der Strahlung auf den Zellzyklus wurde aus der Verteilung der DNA, wie sie sich aus durchflußmikrofluorimetrischen Messungen ergab, ermittelt. Um unspezifische Fluorochrombindung auszuschließen, wurden nur Zellkerne analysiert. Zu ihrer Präparation wurde Vindelov's "pH 10"-Verfahren (18) benutzt und leicht angeändert, so daß die ursprüngliche Vorschrift zu einem einzigen Schritt zusammengefaßt wurde:

#### Reagenzien:

1. Hypertonische Lösung:  
0,034 M Glycin-NaOH-Puffer pH 10  
0,3 M NaCl  
1 ml/l Triton-X-100
2. 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6
3. 1 %ige RNase-Lösung in Tris-HCl-Puffer
4. Ethidiumbromid-Färbelösung  
0,2 mg/ml H<sub>2</sub>O

#### Methode:

Monolayer und Sphäroide wurden zunächst mit 0,05 %igem Trypsin vereinzelt, die Zellen abzentrifugiert (5 Minuten bei 800 UpM) und in einer Konzentration von  $10^6$ - $10^7$  Zellen ml<sup>-1</sup> in Tris-HCl-Puffer pH 7,6 aufgenommen. Die Präparation der Kerne erfolgte dann durch hypertonen Schock nach Zugabe von 4 ml hypertonen Lösung zu 0,2 ml Zellsuspension unter Hinzufügung von 0,2 ml 1 %iger RNase-Lösung und 0,1 ml Ethidiumbromid-Lösung. Nach 10 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Proben wieder auf Zimmertemperatur erwärmt und die DNA-Histogramme mit dem "Cytograf" (Modell 4800 A, Bio-Physics-Systems) aufgenommen.

Der Prozentsatz an Zellen in den einzelnen Stadien des Zellzyklus wurde aus den Histogrammen nach der "Methode 1" von Baisch et al. (19) errechnet.

### 3.4. Chromosomenanalyse

Um vergleichen zu können, wie stark die Chromosomen von Monolayern und Sphäroiden nach Bestrahlung mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  geschädigt werden, wurden exponentiell wachsende Monolayer und Sphäroide (Durchmesser ca. 270  $\mu\text{m}$ ) mit 5 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die Kulturen zur Ausbildung der Aberrationen für weitere 20 Stunden inkubiert. Für die nächsten 4 Stunden wurde zur Anreicherung der Mitosen Colcemid in einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben. Durch einen seitlichen Schlag gegen die Petrischalen wurden die abgerundeten Mitosezellen vom Monolayer abgelöst und weiter verarbeitet. Bei den Sphäroiden erwies sich vorsichtiges Pipettieren als geeignete Methode, um die Mitosezellen von der äußeren Zellschicht abzutrennen. Jeweils 2 ml der so gewonnenen Zellsuspensionen wurden 1:3 mit destilliertem Wasser verdünnt und 10 Minuten bei 37°C quellen gelassen. Nach dieser Behandlung wurde DMSO zugegeben, so daß dessen Endkonzentration 6 % betrug. Proben von jeweils 0,3 ml wurden mit Hilfe der Zytozentrifuge (Cytospin, Shandon Southern Products Ltd., Runcorn, Cheshire) direkt auf Objektträger zentrifugiert (250 g; 20 Minuten). Die Objektträger wurden anschließend 1 Stunde bei 4°C in Methanol-Eisessig (1:3) fixiert und 15 Minuten mit verdünnter Giemsa-Lösung (1:20) gefärbt. Unter dem Mikroskop wurden bei 1000facher Vergrößerung (Öl-Immersion) pro Experiment mehr als 100 Metaphasen untersucht. Dabei wurden alle sichtbaren Chromosomenaberrationen erfaßt, unabhängig davon, ob es sich um Aberrationen vom Chromosomen- oder vom Chromatidtyp handelte. Werden die Zellen nämlich in  $G_1$  bestrahlt, so reagiert das unreduplizierte Chromosom als sei es funktionell "einsträngig", und es entstehen Aberrationen vom Chromosomentyp, wie z.B. Ringe und mehrzentrische Chromosomen. Werden die Zellen dagegen in der S- oder  $G_2$ -Phase von der Strahlung getroffen, d.h. werden beide durch die Reduplikation entstandenen Chromatiden er-

faßt, so entstehen Aberrationen vom Chromatidtyp, wie z.B. Brüche und Chromatidaustausche. Neben diesen beiden Grundtypen struktureller Chromosomenaberrationen werden nach Bestrahlung oft noch sog. "Gaps" oder achromatische Lücken beobachtet, die ebenfalls gezählt wurden. Im Gegensatz zu Chromatidbrüchen führen sie in der Anaphase nicht zu azen-trischen Fragmenten und stellen somit keine echten Diskonti-nuitäten der Chromosomenstruktur dar (20). Indem die Aberra-tionen erst einen Tag nach Bestrahlung bestimmt wurden, ge-langten Zellen, die in allen Phasen des Zellzyklus bestrahlt worden waren, zur Auswertung; daher wurden Aberrationen vom Chromatid- und Chromosomentyp registriert.

### 3.5. Reparatur von DNA-Strangbrüchen

#### 3.5.1. Prinzip der alkalischen Strangtrennung mit anschließender Hydroxylapatitchromatographie

Die Messung von Erzeugung und Reparatur strahleninduzierter Strangbrüche der DNA erfolgte durch Strangtrennung in alkali-scher Lösung mit anschließender Hydroxylapatitchromatographie. Bestimmt wird dabei der Anteil an doppelsträngiger DNA.

Rydberg (21) leitete den von Ahnström et al. (22,23) experi-mentell gefundenen Zusammenhang zwischen der Strangbruchhäufig-keit und dem Anteil doppelsträngiger DNA nach 30 minütiger Lysis in alkalischer Lösung theoretisch ab.

Wie in Abbildung 6 gezeigt wird, gliedert sich diese Methode in 6 Schritte:

- a) Markierung der Zellen; entfällt bei fluorimetrischer DNA-Bestimmung
- b) Bestrahlung
- c) alkalische Denaturierung mit anschließender Renaturierung
- d) Ultraschallbehandlung
- e) chromatographische Trennung von doppelsträngiger und ein-zelsträngiger DNA über Hydroxylapatitsäulen
- f) Bestimmung der DNA-Mengen in den Fraktionen (Szintilla-tions- oder Fluoreszenznachweis)

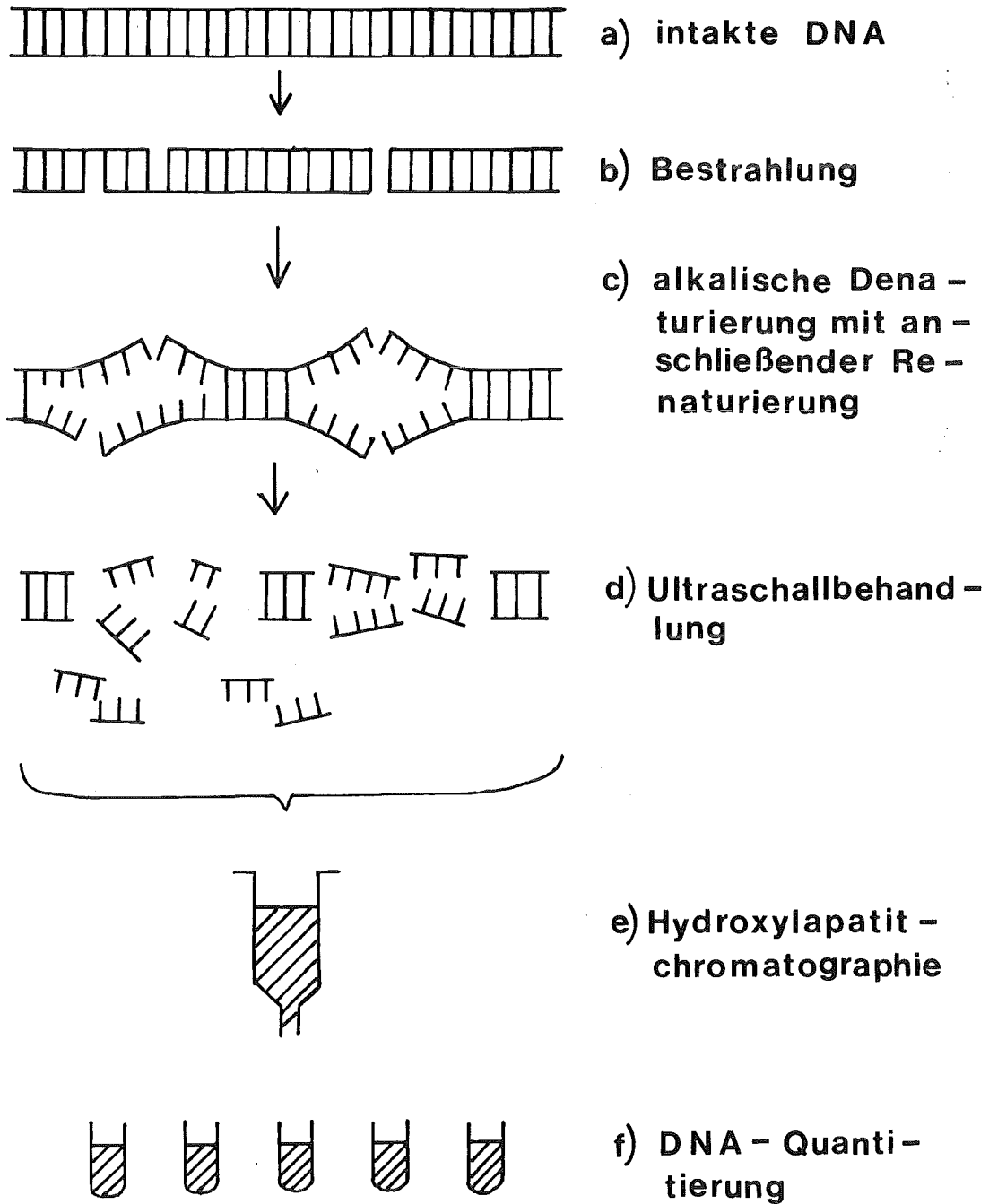


Abb. 6: Schematische Darstellung der Methode zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen.

Zur Markierung der DNA werden den Zellen radioaktive DNA-Vorläufer, in der Regel [ $^{14}\text{C}$ ] Thymidin, angeboten, die sie während der DNA-Synthese einbauen. Die alkalische Denaturierung erfolgt zu dem Zeitpunkt nach Bestrahlung, für den die Anzahl der Strangbrüche bestimmt werden soll. Durch die Alkali-Behandlung kommt es, ausgehend von den Bruchstellen der DNA, zur Strangseparation. Die Denaturierung wird zu einem definierten Zeitpunkt durch Neutralisation der alkalischen Lösung unterbrochen. Die DNA liegt nun teilweise einzelsträngig vor, und zwar nimmt der einzelsträngige Anteil mit der Zahl der vorhandenen Strangbrüche zu, da jeder Bruch eine Ansatzstelle zur Auftrennung des Doppelstranges ist. Es spielt dabei keine Rolle, ob es sich um einen Einzel- oder Doppelstrangbruch handelt.

Unmittelbar nach diesem Denaturierungs-, Renaturierungsschritt wird das Molekulargewicht der DNA durch Ultraschallbehandlung auf ca.  $2 \times 10^6$  reduziert. Die Auftrennung dieses Gemisches aus einzel- und doppelsträngigen DNA-Bruchstücken (siehe Abb. 6) erfolgt nach der von Britten und Kohne (24) beschriebenen Methode der Hydroxylapatitchromatographie. Auf Grund der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den negativen Phosphatgruppen der DNA und den positiven Ionen des Apatits bindet die DNA an das Hydroxylapatit. Doppelsträngige DNA besitzt mehr Phosphatgruppen und wird daher stärker gebunden. Mit Phosphatpuffern steigender Molarität wird diese Wechselwirkung zunehmend vermindert. Daher kann mit einem Phosphatpuffer niedriger Molarität zunächst die einzelsträngige DNA und bei höherer Molarität die doppelsträngige DNA eluiert werden. Normalerweise wird der relative Anteil der einzelnen Fraktionen über die Menge der in die DNA eingebauten Aktivität mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie ermittelt. Da sich die B14-Zellen als Monolayer nur bei extrem geringer Zelldichte (siehe 3.5.) als Sphäroide überhaupt nicht mit [ $^{14}\text{C}$ ] Thymidin markieren ließen, erfolgte die DNA-Bestimmung in den Fraktionen nach der unter 3.5.3. beschriebenen fluorimetrischen Methode.

### 3.5.2. Anwendung auf B14-Monolayer und Sphäroide

Exponentiell wachsende Monolayer und Sphäroide (Durchmesser ca. 270  $\mu\text{m}$ ) wurden bei 37 $^{\circ}\text{C}$  mit 10 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  bestrahlt. Nach festgesetzten Reparaturzeiten (15, 30 und 60 Minuten, Inkubation bei 37 $^{\circ}\text{C}$ ) oder sofort nach Bestrahlung wurden die Zellen augenblicklich auf 4 $^{\circ}\text{C}$  gekühlt, um weitere Reparatur der induzierten Brüche zu verhindern. Zusätzlich wurden bei jeder Versuchsreihe eine unbestrahlte Kontrolle und eine auf Eis bestrahlte Probe mitgeführt. Durch Zugabe einer eiskalten Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 % Trypsin, 0,5 mM EDTA) wurden die Zellen vereinzelt und anschließend gezählt. Die Zellzahl wurde so eingestellt, daß 1 ml Denaturierungslösung ca.  $1 \times 10^6$  Zellen enthielt. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurde die DNA-Strangtrennung durch vorsichtiges Zupipettieren von 1 ml Denaturierungslösung (0,03 M NaOH, 0,01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,9 M NaCl, pH 12,1) gestartet. Die Proben standen 30 Minuten bei 20 $^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln. Beendet wurde die DNA-Strangtrennung durch Neutralisation mit 1 ml Renaturierungsreagenz (0,034 M HCl). Anschließend wurde das Molekulargewicht durch 15 Sekunden dauernde Ultraschallbehandlung (Bronson-Sonifier, Modell Nr. 5125, ausgerüstet mit Mikrotip) reduziert. Nach Zugabe von SDS (1,23 % Endkonzentration) konnten die Proben bei -20 $^{\circ}\text{C}$  mehrere Wochen ohne signifikante Änderungen in den Ergebnissen aufbewahrt werden.

Die Trennung von einzel- und doppelsträngiger DNA erfolgte nach der von Britten und Kohne (24) und von Ahnström und Erixon (22) beschriebenen Methode. Als Säulen dienten 2 ml Spritzen (1 x 3 cm), gefüllt mit 2 ml Hydroxylapatitsuspension (pro Säule 0,375 g Hydroxylapatit in 2 ml 0,0125 M  $\text{KPO}_4$ -Puffer, pH 7,0). Die Säulen steckten in einem auf 60 $^{\circ}\text{C}$  erwärmten Heizblock. Der pH-Wert aller verwendeten  $\text{KPO}_4$ -Puffer lag bei 7. Die Chromatographie vollzog sich wie folgt:

1. Waschen der Säulen mit 0,0125 M  $\text{KPO}_4$ -Puffer
2. Kurzes Aufwärmen der DNA-Lösungen auf 60 $^{\circ}\text{C}$ ; 1:3 Verdünnung mit  $\text{H}_2\text{O}$ ;  
Auftragung von 1 ml dieser Lösungen auf die Säulen

3. Waschen der Säulen mit 1,5 ml 0,0125 M  $\text{KPO}_4$ -Puffer; bei diesem Waschvorgang wurde der größte Anteil an SDS und das NaCl eluiert
4. Elution einzelsträngiger DNA mit 2 x 1,5 ml 0,125 M  $\text{KPO}_4$ -Puffer
5. Elution doppelsträngiger DNA mit 2 x 1,5 ml 0,25 M  $\text{KPO}_4$ -Puffer

Mit Propidiumjodid (PJ) und Mithramycin (MI) als Fluorochromen wurde die Menge an einzel- und doppelsträngiger DNA fluorimetrisch bestimmt.

### 3.5.3. Fluoreszenz-Markierung und spektralfluorimetrischer Nachweis der DNA

Die natürliche Fluoreszenz der DNA ist zu schwach, um als quantitativer Nachweis für die DNA infrage zu kommen. Es gibt jedoch eine Reihe spezifischer Fluorochrome, die einen quantitativen Nachweis der DNA ermöglichen (s. z.B. das bei der Durchflußmikrofluorimetrie verwendete Ethidiumbromid). Ein gewisses Problem ist die geringe Menge und Konzentration der von den Hydroxylapatitsäulen eluierten DNA, die in der Größenordnung von  $\mu\text{g/ml}$  liegt, und die daher erhebliche Anforderungen an die Empfindlichkeit des Fluoreszenz-Nachweises stellt. Die kleinste Menge reproduzierbar nachzuweisender DNA ist gegeben durch die Untergrund-Fluoreszenz des freien, nicht DNA-gebundenen Fluorochroms und die Emissions-Stabilität der Lichtquelle. Letzteres wurde erreicht, indem die Xe-Lampe des verwendeten Spektralfluorometers (Farrand, Mk I, Farrand Optical Co., Inc., New York) durch eine Emissions-stabilisierte Halogenlampe ersetzt wurde, die für die benutzten Fluorochrome eine ausreichende Spektraldichte hatte. Um die Untergrund-Fluoreszenz klein zu halten, wurde zunächst versucht, mit Hilfe von Energieübertragung unter Benutzung von 2 Fluorochromen möglichst ausschließlich die Fluoreszenz von DNA-gebundenem Farbstoff zu erhalten.

Energieübertragung in DNA kann zwischen 2 geeigneten Fluorochromen dann stattfinden, wenn die Fluoreszenzemission eines Donor-Fluorochroms mit dem Anregungsspektrum eines passenden Akzeptor-Fluorochroms überlappt, wobei beide Farbstoffmoleküle innerhalb einer kritischen Distanz von 25 - 35 Å längs der DNA gebunden sein müssen (25). Gute Ergebnisse wurden in der Durchflußmikrofluorimetrie mit Mithramycin als Donor (Anregung: 450 nm; Emission: 570 nm) und Propidiumjodid (Anregung: 470 nm; Emission: 615 nm) als Akzeptor erzielt (25). Regt man in diesem Farbstoffgemisch in Abwesenheit von DNA das MI (450 nm) an, so erhält man naturgemäß nur eine schwache PJ-Fluoreszenz (615 nm), da die Bedingungen für eine Energieübertragung nicht erfüllt sind. In Anwesenheit von DNA verschiebt sich jedoch die PJ-Anregung von 470 nm nach 530 nm und überlappt mit der MI (Donor)-Emission von 570 nm. Jetzt findet Energieübertragung (MI → PJ) statt, und es wird eine starke PJ-Fluoreszenz (615 nm) bei fast völliger Abwesenheit der MI-Emission (570 nm) gemessen. Mit der in Tabelle 2 angegebenen Färbelösung (25) wurde diese Methode an Kalbsthymus-DNA erprobt. Es zeigte sich jedoch, daß nur DNA-Konzentrationen oberhalb 10 µg/ml nachweisbar waren.

Im endgültigen Versuchsprotokoll wurde nur noch die Fluoreszenz des PJ herangezogen. Maximale Empfindlichkeit bei gleichzeitiger Linearität des DNA-Nachweises wurde erzielt, indem die PJ-Anregung in der Nähe des Anregungspeaks des DNA-gebundenen Farbstoffes (530 nm) durchgeführt wurde, und zwar in der langwelligen Flanke dieses Peaks bei genau 565 nm (Emission bei 615 nm). Mit reiner Fluorochrom-Lösung ergab sich so nur eine minimale Fluoreszenz, was das Problem der Untergrund-Fluoreszenz befriedigend löste. Abbildung 7 zeigt, daß selbst DNA-Mengen in der Größenordnung 0,1 µg noch gut nachweisbar sind und daß eine lineare Eichkurve erhalten wird. Darüber hinaus besteht keine Abhängigkeit von den Ionenstärken, wie sie bei der Hydroxylapatitchromatographie auftreten. Allerdings störten Reste von SDS in den Fraktionen, die deshalb mit K-Acetat (0,3 M; 15 Min. bei 4°C) ausgefällt wurden. Schließlich wurde, um eventuell vorhandene Spuren von RNA zu eliminieren, eine RNase-Behandlung eingeschaltet (20 µl 1 %ige RNase pro 0,5 ml Probelösung).



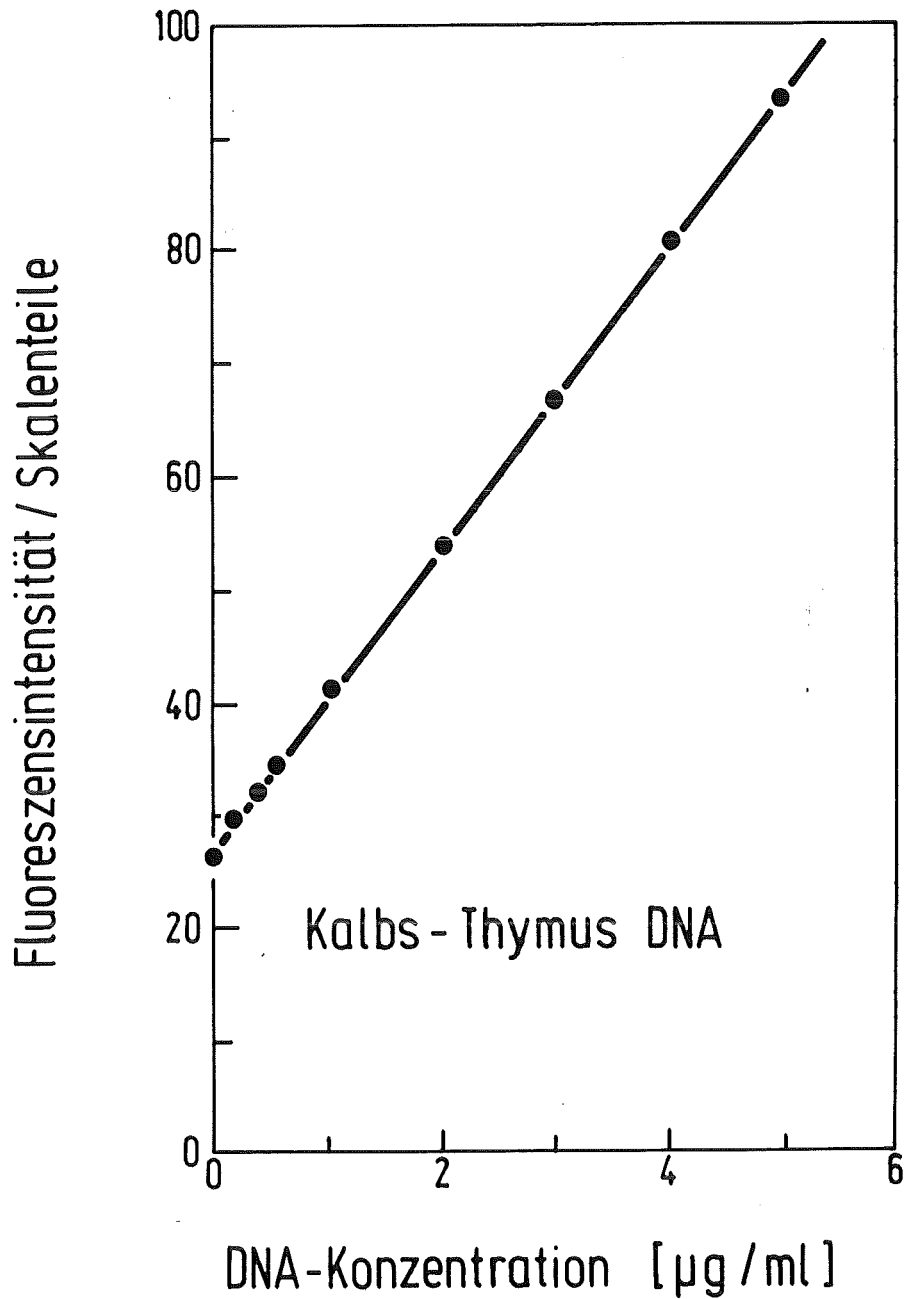


Abb. 7: DNA-Eichkurve; DNA-Nachweis mit einer Lösung aus PJ (25 µg/ml), MI (50 µg/ml) und MgCl<sub>2</sub> (15 mM)

Wellenlängen: Anregung: 565 nm

Emission: 615 nm

In Tabelle 2 wurde die Aufarbeitung der DNA-Proben nach Hydroxylapatitchromatographie nochmals zusammengefaßt.

Tab. 2: Aufarbeitung der DNA-Proben nach Hydroxylapatit-chromatographie

RNase-Behandlung	20 µl (1 %ig) pro 0,5 ml Probe 30 Min.; 37°C
Fällung des SDS mit KAc	0,3 M an KAc 15 Min.; 4°C
Zentrifugation	2000 UpM 10 Min.; 4°C
fluorimetrische Messung	0,5 ml Probe + 20 µl Färbemix Färbemix: MI: 50 µg/ml PJ: 25 µg/ml MgCl <sub>2</sub> : 15 mM

Der Prozentsatz reparierter DNA errechnete sich folgendermaßen aus der Fraktion, die die doppelsträngige DNA enthielt:

$$\frac{(f_t - f_o)}{(f_c - f_o)} \times 100$$

wobei  $f_t$ ,  $f_o$ ,  $f_c$  die Bruchteile doppelsträngiger DNA bedeuten, die man nach Bestrahlung und Inkubation ( $f_t$ ;  $t$  = Reparaturzeit), ohne Reparatur ( $f_o$ ; Bestrahlung auf Eis) und mit unbestrahlten Kontrollen ( $f_c$ ) erhielt.

### 3.5.4. Radioaktive Markierung der B14-Zellen

Obwohl, wie schon bemerkt, weder B14-Monolayer noch Sphäroide eine Markierung ihrer DNA zuließen, was die Reparaturmessungen erschwerte, wurde eine genauere Untersuchung dieses ungewöhnlichen Phänomens unternommen. Zu diesem Zweck wurde exponentiell wachsenden Zellen über 2 Generationszeiten  $0,04 \mu\text{Ci/ml}$   $[2-^{14}\text{C}]$  Thymidin ( $57,7 \text{ mCi/mmol}$ ) angeboten. Die von den Zellen nicht aufgenommene Aktivität wurde ausgewaschen und die Aktivität in den Zellen auf 2 Arten bestimmt:

1. Messung des insgesamt von den Zellen aufgenommenen  $[2-^{14}\text{C}]$  Thymidins: ca.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden mit 2 % SDS lysiert und in 10 ml Instagel als Zählcocktail gemessen.
2. Bestimmung der in die DNA eingebauten Aktivität; das von  $1 \times 10^5$  Zellen in die DNA eingebaute  $[2-^{14}\text{C}]$  Thymidin wurde mit 10 %iger TCA gefällt und auf Whatman Glasfiberfilter abgesaugt. Die Filter wurden mit 5 %iger TCA nachgespült, unter einer Infrarot-Lampe getrocknet und mit Quickszint versetzt.

Die Radioaktivität wurde mit einem Packard Tricarb (Modell 2650)-Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Alle Markierungsversuche wurden auch mit den V79 chinesischen Hamsterzellen als Referenzzelllinie sowie mit äußeren proliferierenden Zellen von B14-Sphäroiden durchgeführt.

### 3.6. Thioguanin-Resistenztest

Die Resistenz gegen toxische Purinanaloga, wie z.B. 6-Thioguanin (TG) oder 8-Azaguanin (AG), wird häufig als Maß für die mutagene Wirkung von Strahlung herangezogen (26,27). Bei dem TG-Resistenztest handelt es sich um ein biochemisch gut definiertes Mutationssystem. Die Selektion von Mutanten beruht darauf, daß Wildtypzellen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoriboxyl-Transferase (HPRT; E.C. 2.4. 28) Aktivität besitzen, mit deren Hilfe Purinanaloga wie TG und AG in toxische Metabolite umgewandelt werden, die zum Zelltod führen. Durch mutagene Behandlung, wie z.B.  $\gamma$ -Bestrahlung oder chemische Einwirkung, ver-

liert ein Teil der Zellen diese HPRT-Aktivität (28), und die entsprechenden Zellen werden resistent gegen das Purin-analoga. Diese Zellen können auch nicht in HAT-Medium überleben (29):

H: Hypoxanthin; Purinquelle

A: Aminopterin; Inhibitor der Purin- und Pyrimidinsynthese

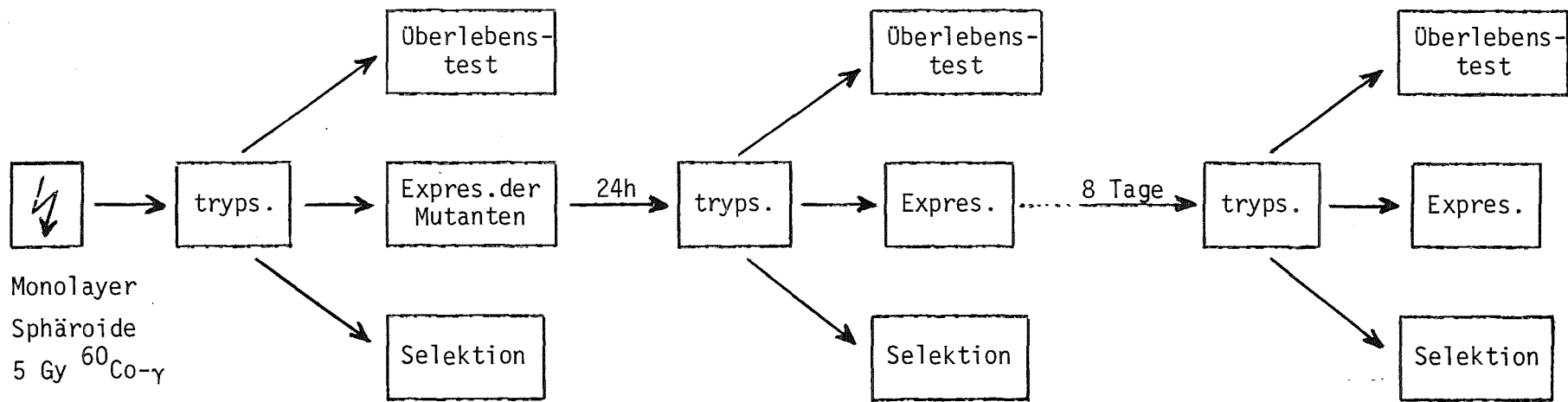
T: Thymidin; Pyrimidinquelle

In Tabelle 3 wurden die wesentlichen Fakten über das HPRT-Enzymsystem und über die Induktion und Selektion der Mutanten kurz zusammengefaßt.

Tab. 3: Das HPRT-Mutationssystem

Enzym-System:		
Hypoxanthin Guanin (oder TG, AG)	HPRT →	IMP GMP (oder TG, AG) MP
Mutanten-Induktion und Selektion:		
Wild-Typ	Mutation (induz. durch phys. oder chem. Agenzien)	Mutante
Genotyp: HPRT <sup>+</sup>		HPRT <sup>-</sup>
Phänotyp: TG <sup>S</sup> HAT <sup>S</sup>		TG <sup>r</sup> HAT <sup>r</sup>

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurde in Abänderung des von Hsie (30) entwickelten Testsystems ein strenges Versuchsprotokoll aufgestellt, das es ermöglichte, Schwankungen in den Daten minimal zu halten. Der Versuchsablauf kann anhand von Abbildung 8 erläutert werden.



Überlebenstest:  $1 \times 10^2$  Zellen/20 cm<sup>2</sup> Petrischale  
 Expression der Mutanten:  $1 \times 10^6$  Zellen/50 cm<sup>2</sup> Petrischale  
 Selektion:  $1 \times 10^5$  Zellen/50 cm<sup>2</sup> Petrischale  
 5 µg TG/ml

Abb. 8: Versuchsprotokoll des TG-Resistenztests.

Exponentiell wachsende Monolayer und Sphäroide (Durchmesser ca. 270  $\mu\text{m}$ ) wurden bei 37°C mit 5 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  bestrahlt, sofort trypsiniert und die Zellen gezählt. Nach dieser mutagenen Behandlung gliedert sich der weitere Versuchsablauf in die 3 Schritte Expression der Mutanten, Selektion in TG-haltigem Medium und Bestimmung der Überlebensfähigkeit im Koloniebildungstest. Zur Expression wurden  $1 \times 10^6$  Zellen auf  $50 \text{ cm}^2$  Plastik-Petrischalen plattiert. Durch tägliches Subkultivieren blieb die Zelldichte über die gesamte Expressionszeit von 8 Tagen weitgehend konstant. Für die Selektion der Mutanten wurden jeden Tag 5 Petrischalen ( $50 \text{ cm}^2$ ), die 14 ml Selektionsmedium (5  $\mu\text{g}$  TG/ml) enthielten, mit je  $1 \times 10^5$  Zellen beimpft. Zusätzlich erfolgte zur Bestimmung der Überlebensrate täglich ein Koloniebildungstest in normalem Medium. Die Mutationsrate errechnet sich für jeden Expressionstag als die Anzahl der TG<sup>r</sup>-Mutanten pro  $10^5$  überlebende Zellen (Zahl der Mutanten-Kolonien dividiert durch die Überlebensrate).

Im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Kontakt-Resistenz und cyclischem AMP (siehe 4.7.) wurde der Gebrauch von dialysiertem Serum, was oft empfohlen wird, um die spontane Mutationsrate möglichst niedrig zu halten (30), vermieden.

### 3.7. Stimulierung der B14-Zellen mit Aktivatoren der Adenylat-Cyclase

#### 3.7.1. Stimulierung mit Prostaglandin E<sub>1</sub>

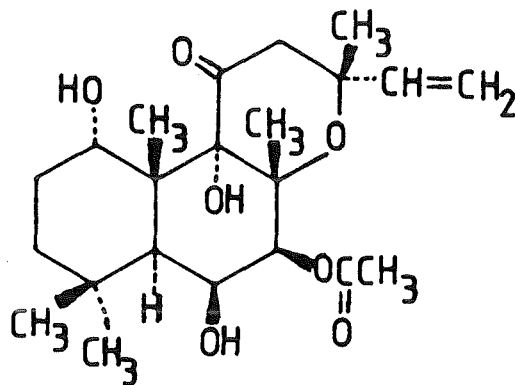
Um Aufschluß darüber zu gewinnen, ob ein Zusammenhang zwischen der Kontakt-Resistenz der B14-Zellen und cyclischem AMP besteht, wurde die Wirkung von Prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>), einem Stimulator der Adenylat-Cyclase (E.C. 4.6.1.1) (31), auf B14-Monolayer und kleine Sphäroide (Durchmesser 150  $\mu\text{m}$ ) untersucht. Hierzu wurden die Zellen für festgesetzte Zeiten (12,27,47,87, 127 Minuten inklusive Bestrahlungsdauer) mit PGE<sub>1</sub> (10  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend mit 10 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  bestrahlt. Bereits 1 Stunde vor PGE<sub>1</sub>-Inkubation erfolgte zusätzlich die Zugabe von "MIX" (3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin; 50  $\mu\text{M}$ ), dem wirkungs-

vollsten Inhibitor der cyclischen 3':5'-Nukleotid-Phosphodiesterase (E.C. 3.1.4.17) (32). Im Koloniebildungstest wurden die Zellen unmittelbar nach Bestrahlung auf ihre Überlebensrate, bezogen auf "MIX"- und PGE<sub>1</sub>-behandelte Kontrollen, getestet.

### 3.7.2. Stimulierung mit Forskolin

Forskolin, ein kardioaktives Diterpen aus den Wurzeln von *Coleus forskohlii* (33), wurde erst in neuester Zeit als Aktivator der Adenylat-Cyclase erkannt (34,35). Gegenüber PGE<sub>1</sub> besitzt Forskolin den Vorteil, daß es ohne spezifische Rezeptoren auf das Enzym-System wirkt und die Bildung von cAMP anregt.

Formel:



Das Versuchsprotokoll war identisch mit demjenigen der PGE<sub>1</sub>-Behandlung (Forskolin-Konzentration 3 µM; 5 Minuten Vorinkubation).

### 3.8. Messung der Adenylat-Cyclase bei verschiedenen Zelllinien

Die Messung der Aktivität der Adenylat-Cyclase an Membranpräparaten wird durch die Umwandlungsrate von [<sup>32</sup>P] markiertem ATP in cAMP bestimmt. Bei diesen Untersuchungen vertraten die B14 chinesischen Hamsterzellen und die 3T3-Mäusezellen die gut gekoppelten Zelllinien, die L-Mäusezellen und die V79 chinesischen Hamsterzellen die nicht (L) bzw. schlecht gekoppelten (V79) Zelllinien (13).

### Präparation der Zellhomogenate:

Die basale Aktivität der membrangebundenen Adenylat-Cyclase wurde für diese Zelllinien in Homogenaten von großen Sphäroiden (Durchmesser 270  $\mu\text{m}$ ) und von Monolayern verschiedener Dichte (Einzelzellen, exponentiell, Plateau) gemessen. Zur Gewinnung einer genügenden Zahl von Einzelzellen wurden exponentiell wachsende Monolayer abtrypsiniert und 4 Stunden in Suspensionskultur gehalten. Sphäroide und Einzelzellen wurden 10 Minuten bei 1000 UpM abzentrifugiert, 4mal mit Krebs-Ringer-Lösung gewaschen und in Homogenisationspuffer (Sucrose 330 mM; DTT 1 mM;  $\text{MgCl}_2$  1 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) aufgenommen. Die Monolayerkulturen (exponentiell und Plateau) wurden nach dem Waschen mit Krebs-Ringer-Lösung in Homogenisationspuffer abgeschabt, zentrifugiert (10 Min. bei 1000 UpM) und vorsichtig in Homogenisationspuffer resuspendiert. Alle Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur Messung der Adenylat-Cyclase aufbewahrt.

Homogenisiert wurden die Zellen in 1 ml Triethanolamin-HCl (TAA; 50 mM, pH 7,4) in einem Glas/Teflon-Potter (10 Hübe). Die Zellhomogenate wurden 10 Minuten bei 15 000 UpM und bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und die Sedimente in TAA (50 mM; pH 7,4) aufgenommen.

### Adenylat-Cyclase-Test:

Die Messung der Adenylat-Cyclase erfolgte nach der Methode von Schultz und Jakobs (36). Ein 100  $\mu\text{l}$  Standardansatz bestand aus 50  $\mu\text{l}$  Zellhomogenat (herrührend von jeweils ca.  $1 \times 10^6$  Zellen), 40  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch und 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Diese 100  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen enthielten 50 mM TAA-HCl-Puffer (pH 7,4), 1 mM "MIX", 0,1 mM EGTA (Ethylenglykol-bis ( $\beta$ -Aminomethylether)N,N'-tetraacetat), 1 mM DTT (Dithiothreitol), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,01 mM GTP, 3 mg/ml BSA, 0,1 mM Carrier cAMP, 0,25 mM ATP, 0,1 mM  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP (0,2 bis 0,4  $\mu\text{Ci}$  pro Test) und ein ATP-regenerierendes System, bestehend aus 5 mM Kreatin-Phosphat und 0,4 mg/ml Kreatin-Kinase.



Die Tests wurden 3fach ausgeführt. Nachdem das Reaktionsgemisch 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert worden war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Zellhomogenat gestartet. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 0,4 ml 125 mM Zinkacetat und 0,5 ml 120 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Cyclisches AMP wurde durch Kopräzipitation anderer Nukleotide mit ZnCO<sub>3</sub> (37), welches sich beim Abstoppen bildet, abgetrennt und chromatographisch über Aluminiumoxid neutral (38) gereinigt. Hierzu wurde ZnCO<sub>3</sub> 5 Minuten bei 1000 UpM abzentrifugiert und 0,8 ml Überstand auf Aluminiumoxid-Säulen (0,8 x 2 cm) aufgetragen, die mit 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 equilibriert worden waren. Eluiert wurde mit 2 x 2 ml desselben Puffers. In 10 ml H<sub>2</sub>O wurde das Eluat aufgefangen und die Menge an synthetisiertem [<sup>32</sup>P] cAMP durch Messung der Čerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Die Säulen ließen sich mit 10 ml Tris-HCl-Puffer wieder regenerieren.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (39). Die Adenylat-Cyclase-Aktivität wurde nach Abzug von Leerwerten in pmol cAMP/mg Protein/10 Minuten angegeben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Veränderungen im Zellzyklusverlauf nach Bestrahlung

Um die Kontakt-Resistenz der B14-Sphäroide klar gegen andere Arten von Strahlenresistenz, wie z.B. gegen Resistenzphänomene, die durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) oder Plateauphase-Wachstum kontaktinhibierter Zellen (40) hervorgerufen werden, abzugrenzen, ist es notwendig, ihr Vorkommen auch in einer gut mit Sauerstoff versorgten, aktiv proliferierenden Subpopulation der Sphäroide, nämlich den äußeren Zellen, nachzuweisen. Mittels FMF-Technik (18) wurde gezeigt, daß sich diese Zellen in der gleichen Weise über den Zellzyklus verteilen wie exponentiell wachsende Monolayerzellen (siehe 2.2. Abb. 3 und Abb. 9 für  $t = 0$ ). Ferner ging aus kinetischen Untersuchungen hervor, daß der Mitoseindex für die äußeren Sphäroidzellen zwischen 3 und 5 % und ihre Verdopplungszeit zwischen 12 und 14 Stunden liegt, was auch für exponentiell wachsende Monolayer zutrifft. Es wurde nun untersucht, ob sich die Kontakt-Resistenz außer in einem besseren Überleben im Koloniebildungstest auch bei Funktionen bemerkbar macht, die für aktiv proliferierende Zellen typisch sind. Bei der Zellzykluskinetik nach Bestrahlung handelt es sich um eine solche Eigenschaft.

Aus Abbildung 9 werden die kinetischen Änderungen, wie sie in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung mit 10 Gy  $^{60}\text{Co-}\gamma$  bei exponentiell wachsenden Monolayerzellen und äußeren Sphäroidzellen auftreten, ersichtlich. Unmittelbar nach Bestrahlung ( $t = 0$ ) zeigen naturgemäß alle Zellen Phasenverteilungen, die denen unbestrahlter Kontrollen entsprechen, wobei kein Unterschied zwischen Monolayern und äußeren Sphäroidzellen besteht. Nach Bestrahlung verlangsamt sich die Passage durch die S-Phase, was sich in einer 3 - 6 Stunden dauernden Akkumulation in dieser Phase äußert; daran anschließend werden die Zellen in  $G_2 + M$  blockiert. Wie aus Abbildung 9 klar hervorgeht, dauert dieser  $G_2$ -Block bei den Monolayern erheblich länger als bei den äußeren

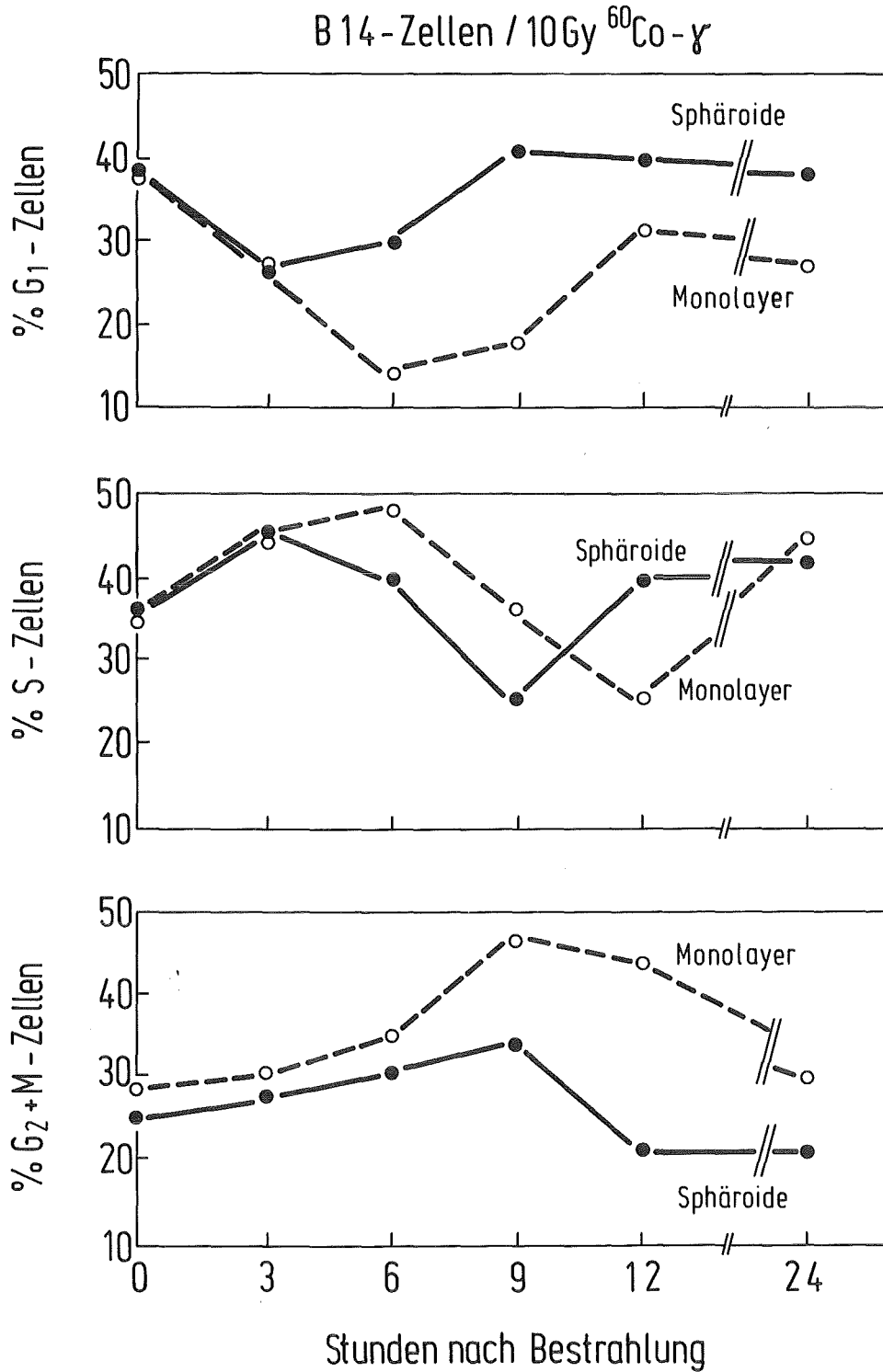


Abb. 9: Zellzykluskinetik bei B14-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy  $^{60}\text{Co}-\gamma$ ; zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung wurde mittels FMF-Technik der Prozentsatz an Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus ermittelt.

----- exponentiell wachsende Monolayerzellen  
———— äußere proliferierende Sphäroidzellen

Sphäroidzellen, und auch der Prozentsatz blockierter Zellen liegt bei den Monolayern höher. 9 Stunden nach Bestrahlung befinden sich 46 % Monolayer-, aber nur 34 % Sphäroidzellen in  $G_2 + M$ . 3 Stunden später (12 Stunden nach Bestrahlung) verringerte sich der Anteil an Monolayerzellen in  $G_2 + M$  kaum (44 %), während die Sphäroidzellen nicht mehr blockiert sind (21 %). Für die in den anderen Phasen des Zellzyklus zu beobachtenden Strahleneffekte gilt das Gleiche.

Die kinetischen Untersuchungen zeigen also, daß auch die aktiv proliferierende Zellpopulation der Sphäroide Kontakt-Resistenz erwerben kann, die sie wirksam vor Änderungen im Verlauf des Zellzyklus, wie sie nach Bestrahlung auftreten, schützt.

#### 4.2. Chromosomenaberrationen

Bei diesen Untersuchungen sollte getestet werden, ob sich die Kontakt-Resistenz auch auf die Schädigung der Chromosomen auswirkt. Wie schon bei der Zellzykluspassage handelt es sich hier um eine Reaktion auf Strahlung, die für aktiv proliferierende Zellpopulationen typisch ist, und die zusätzlich noch eine Information über das Ausmaß der molekularen DNA-Schädigung ergibt.

Sowohl bei Monolayerzellen als auch bei den äußeren Sphäroidzellen lag die Spontanrate der Aberrationen bei weniger als einer pro 100 Zellen. In Abbildung 10 sind Chromosomenbilder unserer B14-Zelllinie des chinesischen Hamsters zu sehen. Abb. 10a zeigt die 22 Chromosomen einer unbestrahlten Zelle; in 10b hat ein Chromosom einen Schaden vom Chromosomentyp, nämlich ein dizentrisches Chromosom, und in 10c ist, in Form eines Bruchs, eine Aberration vom Chromatidtyp zu sehen.

Wie nun aus Tabelle 4 hervorgeht, werden die Chromosomen der äußeren Sphäroidzellen durch die gleiche Strahlendosis weniger stark geschädigt als die der Monolayerzellen. Von je 100 betrachteten Zellen fanden sich bei den Monolayern

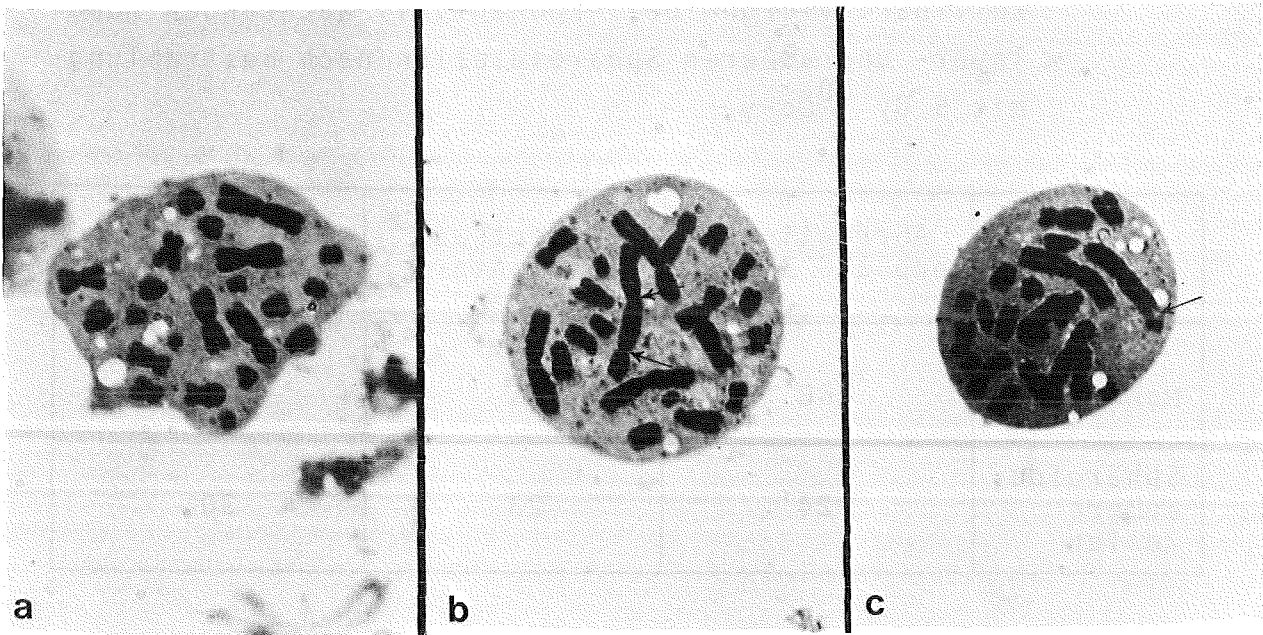


Abb. 10: Chromosomen der B14-Zelllinie des chinesischen Hamsters; Präparation erfolgte mit der Zytozentrifuge  
a: 22 Chromosomen einer unbestrahlten Zelle  
b: nach Bestrahlung mit 5 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ ; 1 dizentrisches Chromosom (Aberration vom Chromosomentyp)  
c: nach Bestrahlung mit 5 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ ; 1 Bruch (Aberration vom Chromatidtyp)

68 Chromosomenschäden, bei den äußeren Sphäroidzellen dagegen nur rund 1/3, nämlich 24. Ferner kamen bei den Sphäroiden nur halb so viele Zellen mit Aberrationen vor wie bei den Monolayern (Sphäroide: 23 %, Monolayer: 45 %). Dieses Ergebnis korreliert gut mit dem Zellinaktivierungsergebnis, wonach bei einer Strahlendosis von 5 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  halb so viele Sphäroid- wie Monolayerzellen abgetötet werden (Sphäroide: 30 %, Monolayer: 67 %).

Tab. 4: Zusammenhang zwischen Chromosomenaberrationen und Zellinaktivierung bei exponentiell wachsenden Monolayer- und äußeren Sphäroidzellen nach Bestrahlung mit 5 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ .

	Aberrationen pro 100 Zellen	Prozentsatz aberranter Zellen	Prozent tote Zellen
Monolayer	68	45	67
Sphäroide; äußere Zellen	24	23	30

Diese Ergebnisse bestätigen klar die vorausgegangenen zellkinetischen Befunde. Insgesamt läßt sich folgern, daß die Kontakt-Resistenz Zellen in 3-dimensionaler Aggregation, unabhängig von ihrem proliferativen Status, gegen verschiedene Arten strahleninduzierter zytogenetischer Schädigungen (Zellzyklusänderungen, Chromosomenaberrationen) einschließlich der Inaktivierung (13) schützt. Die Kontakt-Resistenz unterscheidet sich damit grundlegend von anderen Resistenzphänomenen

#### 4.3. Reparatur von DNA-Strangbrüchen bei Monolayern und Sphäroiden

Aus klassischer strahlenbiologischer Sicht ist zu erwarten, daß die Kontakt-Resistenz die Folge einer verbesserten DNA-Reparatur ist. Ob dies zutrifft, wurde anhand der DNA-Bruchreparatur getestet. In Ermangelung einer ausreichenden radioaktiven Markierbarkeit der DNA (siehe hierzu 4.4) wurde hierfür allerdings die in 3.5.3. beschriebene, empfindliche fluorimetrische Nachweismethode herangezogen. Ein Vorzug dieser Fluoreszenzmarkierung liegt darin, daß sie, im

Gegensatz zur radioaktiven Markierung mit [ $^{14}\text{C}$ ] Thymidin, nicht auf proliferierende Zellen beschränkt ist, sondern auch auf ruhende Zellen angewendet werden kann, was gerade bei den Sphäroiden vorteilhaft ist. Allerdings mußten die Reparaturuntersuchungen auf die DNA-Strangtrennung in alkalischer Lösung mit anschließender Hydroxylapatitchromatographie (22, 23) beschränkt bleiben, da die bei anderen Methoden, wie z.B. bei der neutralen Filterelutionstechnik (41) zur Bestimmung von Doppelstrangbrüchen, anfallenden DNA-Mengen für die fluorimetrische Auswertung nicht ausreichten. Mittels dieser Technik konnte die Bildung und die Reparatur von DNA-Strangbrüchen untersucht, und die nach der Chromatographie vorhandenen DNA-Mengen durch Fluoreszenzmarkierung ausreichend quantifiziert werden.

Von den auf die Hydroxylapatitsäulen aufgetragenen DNA-Mengen tauchten 80 - 100 % wieder in den eluierten Fraktionen auf.

Die Kinetik der DNA-Strangbruchreparatur bei Monolayern und Sphäroiden wurde in Abbildung 11 dargestellt. Nach Bestrahlung mit 10 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  bei 37 °C wurden die Zellen 15, 30 und 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, wobei die Inkubationszeit von Beginn der Bestrahlung an gerechnet wurde. Der 7-Minuten-Wert entspricht der Bestrahlungsdauer bei 10 Gy. Ob die Sphäroide nach Bestrahlung und Inkubation total trypsinisiert und somit das Reparaturverhalten aller Zellen untersucht wurde, oder ob nur die äußeren Sphäroidzellen verwendet wurden, änderte nichts an dem gezeigten Reparaturverlauf. Der Prozentsatz reparierter DNA wurde nach der in 3.5.3. vorgestellten Formel berechnet. Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, verläuft die Strangbruchreparatur sehr schnell und effektiv; nach 15 Minuten waren bereits 85 % aller erzeugten Brüche verschwunden. Im Gegensatz zur Erwartung ließ sich zwischen dem Reparaturverlauf von Monolayern und Sphäroiden kein Unterschied feststellen. Auch in der Bruchausbeute unmittelbar nach Bestrahlung war kein Unterschied zu verzeichnen.

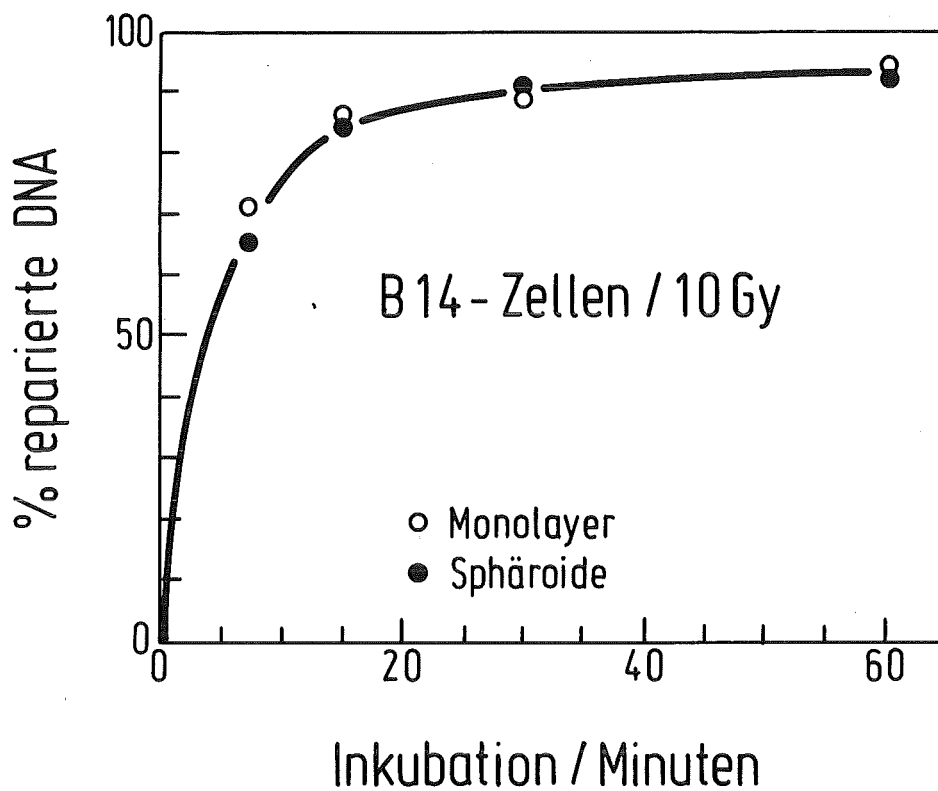


Abb. 11: Kinetik der DNA-Strangbruchreparatur bei B14-Monolayern und Sphäroiden nach Bestrahlung mit 10 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ ; Bestrahlung und Reparatur bei 37 °C; zur Bestimmung der Gesamtbrüche wurde die DNA-Strangtrennung in alkalischer Lösung mit anschließender Hydroxylapatitchromatographie angewendet; die Auswertung erfolgte nach der in 3.5.3. beschriebenen fluorimetrischen Methode



#### 4.4. Zellkontakt und radioaktive Markierbarkeit von B14-Zellen

Veranlassung für die folgende Untersuchung war die Beobachtung, daß sich die DNA in Monolayern und äußeren Sphäroidzellen der B14-Zelllinie nur schwach bzw. überhaupt nicht mit [ $^{14}\text{C}$ ] Thymidin markieren ließ. Da die V79-Linie des chinesischen Hamsters diese bemerkenswerte Eigenschaft nicht zeigte, fiel der Verdacht auf Zell-Zell-Kontakte (Gap Junctions) als mögliche Ursache, zumal V79 als nur sehr schwach gekoppelte Zelllinie identifiziert wurde (13).

Tatsächlich ergaben Versuche, bei denen B14-Monolayer verschiedener Zelldichte mit [ $^{14}\text{C}$ ] Thymidin inkubiert wurden, daß die Aufnahme und der Einbau von Thymidin in die DNA von der Zelldichte abhängt. Aus Abbildung 12 geht hervor, daß die Radioaktivität pro Zelle oberhalb einer kritischen Zelldichte von  $4 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$  drastisch abfällt. Wie die mikroskopische Beobachtung zeigte, nimmt ab dieser Zelldichte die Häufigkeit für Kontakte zwischen 2 und mehr Zellen schnell zu.

Ferner wiesen in diesem Labor durchgeführte Mikro-Elektrodenmessungen auf eine Zunahme der Kopplungsfrequenz hin, so daß die absinkende Thymidinaufnahme als Zellkommunikationseffekt interpretiert werden muß.

Dagegen waren Zellen, die noch keinen oder nur wenig Kontakt miteinander hatten (Zelldichte  $< 4 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$ ), und die daher auch noch keine Gap Junctions ausbilden konnten, ohne Schwierigkeiten mit [ $^{14}\text{C}$ ] Thymidin markierbar.

Für die V79 chinesischen Hamsterzellen konnte keine Abhängigkeit von der Zelldichte festgestellt werden. Im Mittel betrug die Aktivität an [ $^{14}\text{C}$ ] Thymidin immer 0.25 cpm pro Zelle, was ziemlich genau dem "Einzelzellwert" von B14 entspricht.

Die Unmöglichkeit, die DNA von B14-Zellen bei höheren Zelldichten, bei denen die Zellen aber immer noch mehrere Generationen lang aktiv proliferieren, zu markieren, hängt wahrscheinlich damit zusammen, daß infolge einer Veränderung der Zellmembran kein Thymidin mehr in die Zellen aufgenommen werden kann. Hierfür spricht die Beobachtung, daß die in Abbildung 12 gezeigten Werte auch gelten, wenn die Zellen mit

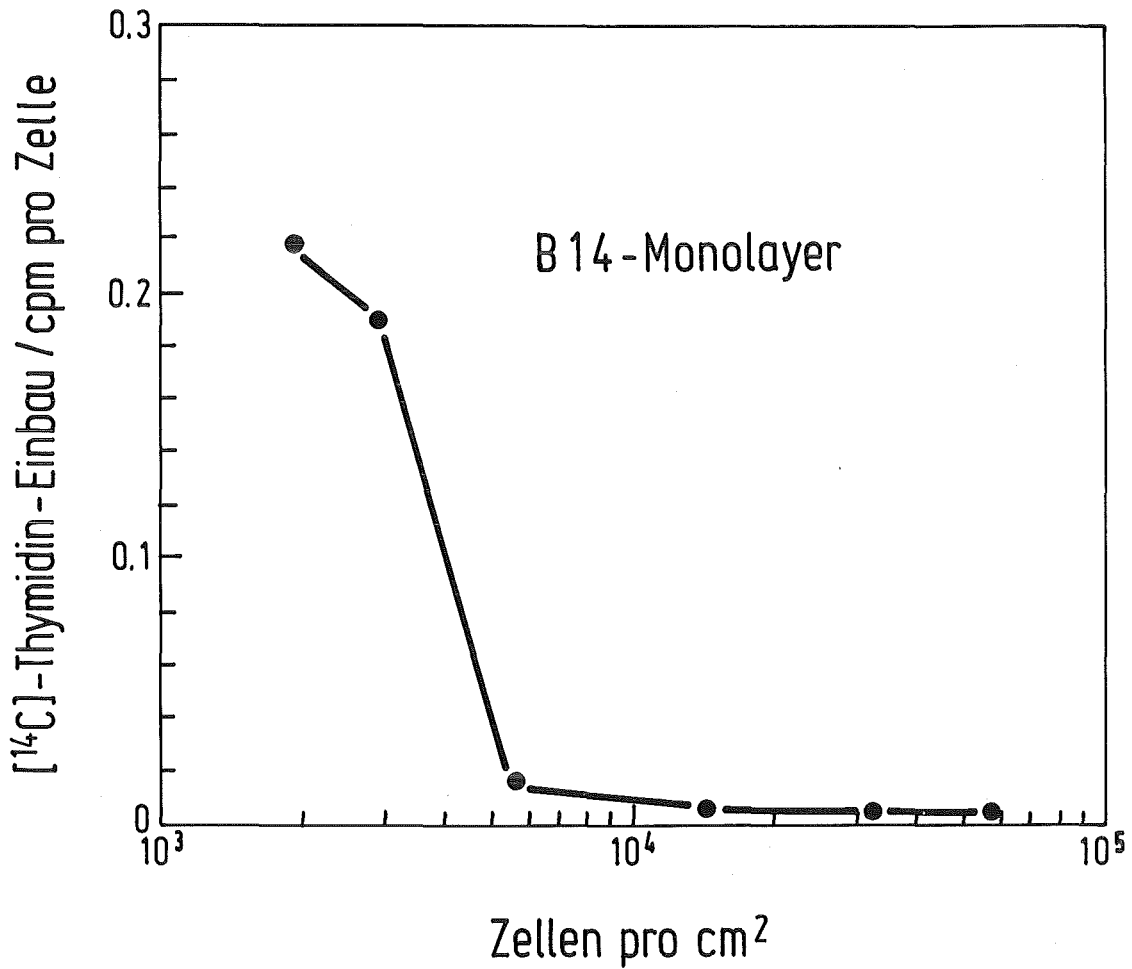


Abb. 12: [<sup>14</sup>C]-Thymidineinbau in die DNA von B14-Monolayern in Abhängigkeit von der Zelldichte, Monolayer verschiedener Zelldichten wurden für 2 Generationszeiten mit 0.04 µCi/ml [<sup>2-<sup>14</sup>C</sup>] Thymidin inkubiert; die TCA fällbare Aktivität wurde gemessen

SDS lysiert wurden und ohne TCA-Fällung die insgesamt vorhandene Aktivität an [<sup>14</sup>C] Thymidin gemessen wurde (siehe 3.5.4. Methode 1). Für eine Regulation membrangebundener (Transport-) Enzyme über Gap Junctions sprechen auch die in 4.8. erhobenen Adenylat-Cyclase-Befunde.

Um völlig auszuschließen, daß diese Ergebnisse durch ein defektes Thymidinkinase-Gen der B14-Zellen zustande kommen, wurden Überlebenstests von B14-Monolayern verschiedener Dichte in HAT-Medium (siehe 3.6.) durchgeführt. Da durch Aminopterin die interne Thyminsynthese gehemmt wird, müssen die Zellen das exogen angebotene Thymidin mit Hilfe der Thymidinkinase in das entsprechende Monophosphat umwandeln. Ein 50 x HAT-Konzentrat (750 µg/ml Hypoxanthin, 50 µg/ml Aminopterin, 250 µg/ml Thymidin) wurde mit 250 ml MEM-Medium verdünnt. Es zeigte sich, daß in diesem Selektionsmedium nur dünn ausgesäte Einzelzellen überleben konnten, d.h. in der Lage waren, das angebotene Thymidin aufzunehmen. Damit ist erhärtet, daß das Unvermögen zur Thymidinaufnahme nicht genetisch bedingt ist, sondern die Folge einer kontaktregulierten Membranfunktion ist.

Im Gegensatz hierzu ließen sich die V79-Zellen ohne Probleme in HAT-Medium kultivieren.

#### 4.5. Induktion der TG-Resistenz

Die Empfindlichkeit von B14-Monolayern und Sphäroiden gegenüber strahleninduzierter Mutation zur TG-Resistenz ist aus Abbildung 13 ersichtlich. Gezeigt wird hier die Abhängigkeit der Mutationsrate von der Expressionszeit. Für  $t = 0$  wurde die spontane Mutationsrate (Mittelwert über den Versuchszeitraum von 8 Tagen) aufgetragen, die selbstverständlich unabhängig von der Expressionszeit ist. Die spontane Mutationsrate war für beide Kulturen ungefähr gleich groß und lag für Sphäroide bei  $(1.40 \pm 0.09) \times 10^{-4}$  und für Monolayer bei  $(1.48 \pm 0.18) \times 10^{-4}$ . Dieser Wert liegt höher als die in der Literatur für andere Linien angegebenen Raten. Hier werden je nach Zelldichte und Konzentration des Purinanalogs Werte von  $3 \times 10^{-5}$  (26), aber auch optimistisch erscheinende  $1 \times 10^{-6}$  (42) gefunden. In der Regel erniedrigt sich bei Verwendung von dialysiertem Serum die Spontanrate (30), jedoch wurde hiervon aus den in 3.6 genannten Gründen Abstand genommen.

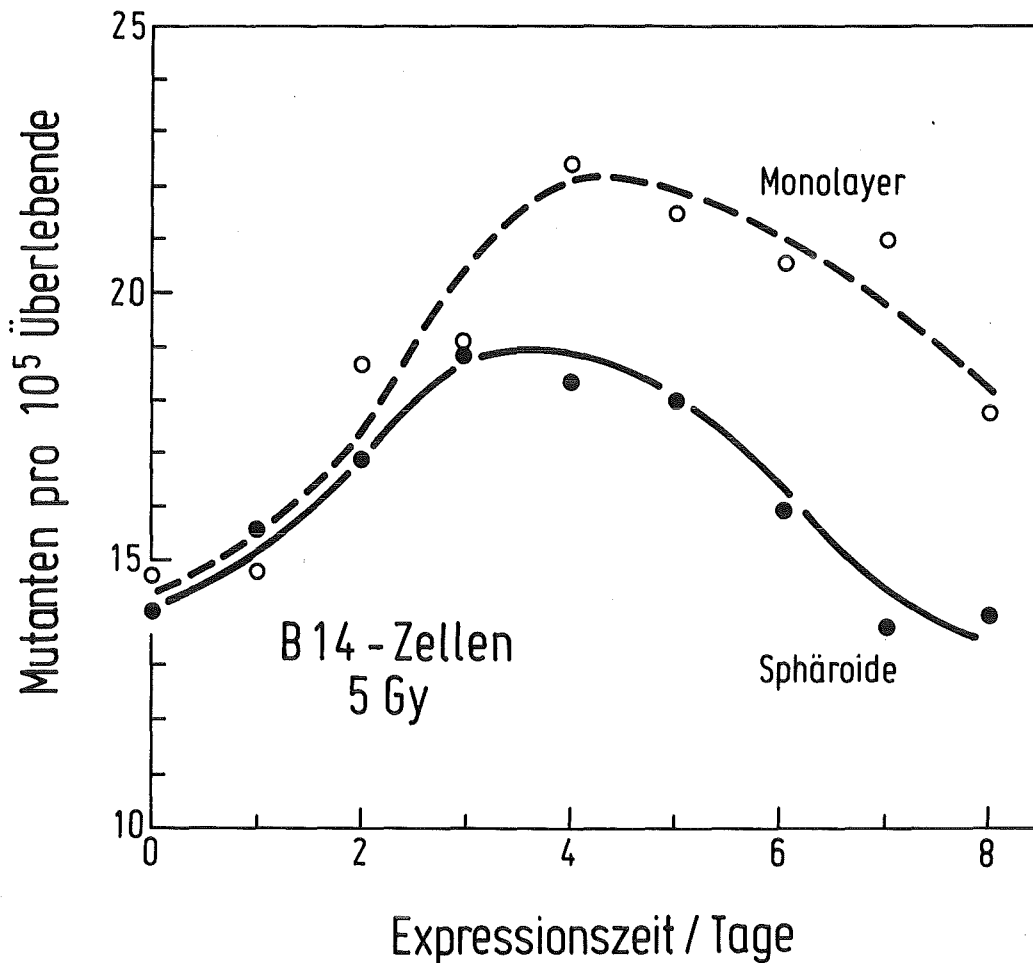


Abb. 13: Anzahl an TG<sup>r</sup>-Mutanten pro 10<sup>5</sup> überlebende Zellen bei B14-Monolayern und Sphäroiden als Funktion der Expressionszeit nach Bestrahlung mit 5 Gy <sup>60</sup>Co-γ

Wie aus Abbildung 13 hervorgeht, erreicht die Zahl der Mutanten pro 10<sup>5</sup> überlebende Zellen zwischen dem 3. und dem 5. Expressionstag sowohl für die Monolayer als auch für die Sphäroide ein Maximum. Danach sinkt die Mutationsrate wieder ab.

Unabhängig von diesem ungewöhnlichen Verlauf der Expressionskurven zeigt Abbildung 13 deutlich, daß bei gleicher Dosis (5 Gy <sup>60</sup>Co-γ) in den Monolayern mehr TG<sup>r</sup>-Mutanten induziert

wurden als in den Sphäroiden. Dabei machte es keinen Unterschied, ob nach Bestrahlung alle Sphäroidzellen oder nur die äußeren Zellen eingesetzt wurden. In beiden Fällen folgte die Induktion der Mutanten in Abhängigkeit von der Expressionszeit dem gezeigten Verlauf. Sphäroide sind also bei gleicher Dosis auch gegen diese Art von zytogenetischem Schaden besser geschützt als die entsprechenden Monolayer.

#### 4.6. Kinetik der Entstehung der Kontakt-Resistenz

Um mehr Einzelheiten über die Kontakt-Resistenz zu erfahren und im Hinblick auf ihre biochemische Manipulierbarkeit, wurde ihre Abhängigkeit von der Sphäroidgröße untersucht. Zu diesem Zweck wurden täglich Sphäroide aus einer Spinnerkultur einer Bestrahlung mit 10 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  unterworfen und auf ihre Überlebensfähigkeit getestet. In Abbildung 14 wurde die Überlebensrate gegen den Sphäroiddurchmesser aufgetragen. Wie man sieht, entwickelt sich die Kontakt-Resistenz erst bei einer kritischen Größe von ca 220  $\mu\text{m}$ , hängt dann jedoch nicht weiter von der Sphäroidgröße ab. Für kleine Sphäroide mit einem Durchmesser von ca 100 - 140  $\mu\text{m}$  lag die Überlebensrate bei 0.07 - 0.1. Dieser Wert entspricht in etwa der Überlebensrate eines exponentiell wachsenden Monolayers nach Bestrahlung mit 10 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  (siehe 2.4. Abb.5).

#### 4.7. Induktion der Kontakt-Resistenz in kleinen Sphäroiden

##### 4.7.1. Stimulierung mit $\text{PGE}_1$

Durch Prostaglandin  $\text{E}_1$ , einem Stimulator der Adenylat-Cyclase, gelang es, in kleinen Sphäroiden (Durchmesser 150  $\mu\text{m}$ ), die ihre Kontakt-Resistenz noch nicht entwickelt hatten (siehe 4.6. Abb. 14), Kontakt-Resistenz zu induzieren. Hierzu wurden Sphäroide und Monolayer vor Bestrahlung mit 10 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  unterschiedlich lange mit  $\text{PGE}_1$  (10  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 5 und in Abbildung 15 zusammengefaßt.

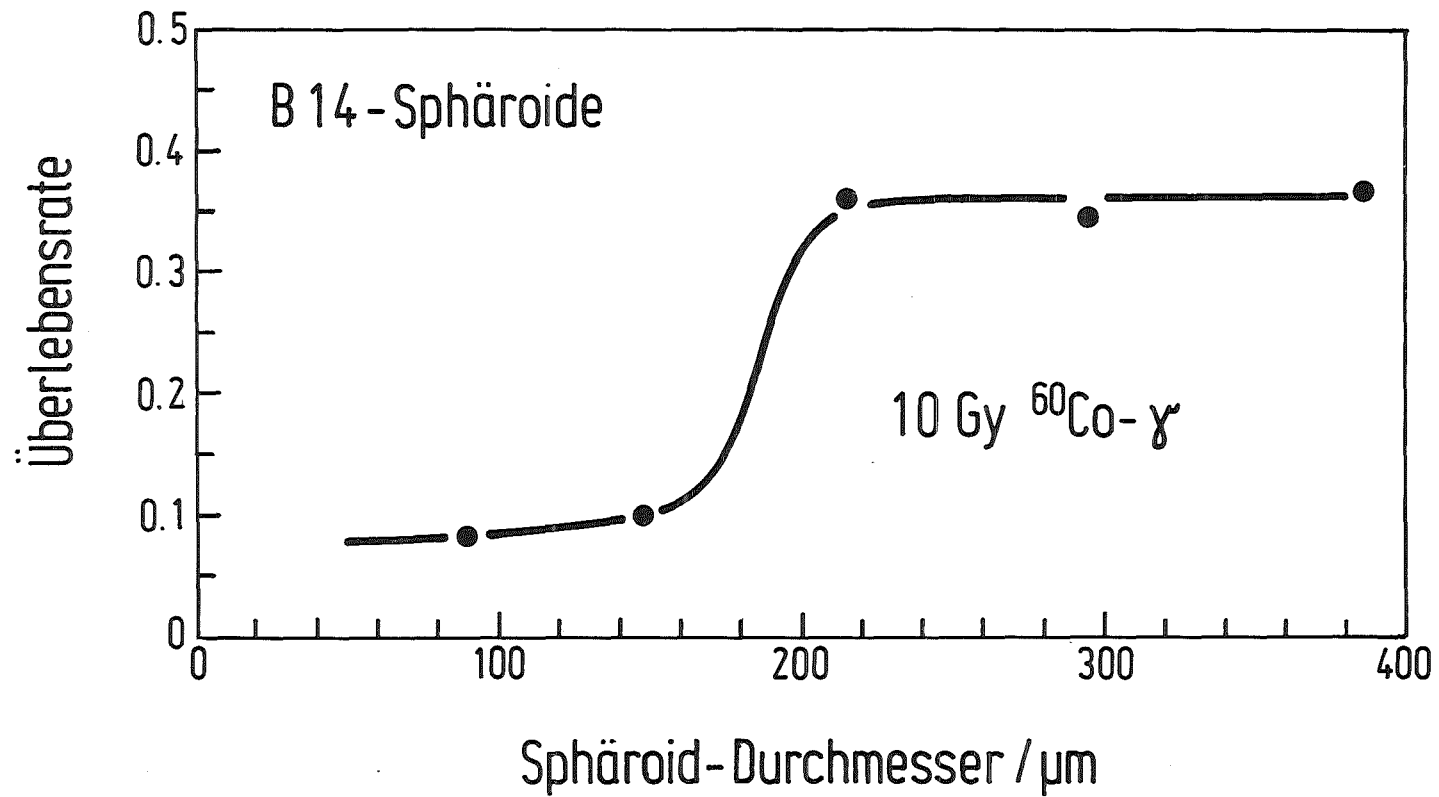


Abb. 14: Kinetik der Entstehung der Kontakt-Resistenz bei B14-Sphäroiden; Überlebensrate nach Bestrahlung mit 10 Gy  $^{60}\text{Co-}\gamma$  als Funktion des Durchmessers

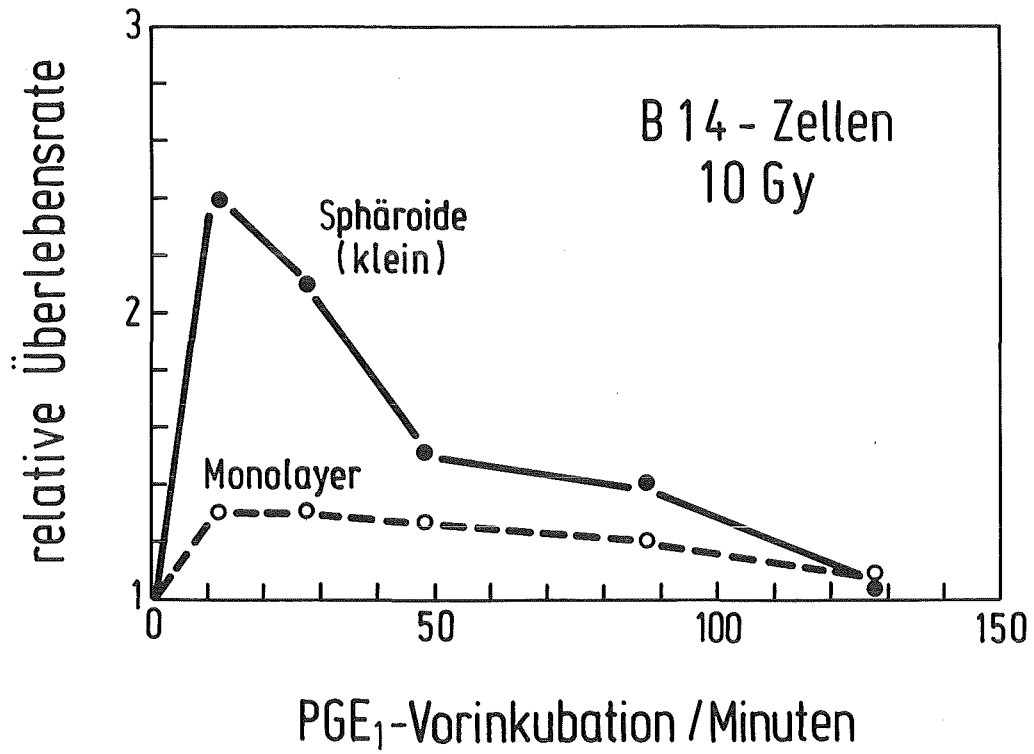


Abb. 15: Relative Überlebensrate von B14-Monolayern und kleinen Sphäroiden (Durchmesser 150  $\mu$ m) in Abhängigkeit von einer Vorinkubation mit PGE<sub>1</sub> (10  $\mu$ M); Bestrahlung bei 37 °C mit 10 Gy <sup>60</sup>Co- $\gamma$

Tabelle 5: PGE<sub>1</sub> stimulierte Erhöhung der Überlebensrate  
nach 10 Gy <sup>60</sup>Co-γ  
10 μM PGE<sub>1</sub> + 50 μM MIX

PGE <sub>1</sub> -Vorinkubation (Minuten)	Monolayer Überlebens- rate	Sphäroide Überlebens- rate
0	0.086 ± 0.002	0.078 ± 0.016
12	0.115 ± 0.009	0.19 ± 0.076
27	0.115 ± 0.018	0.165 ± 0.045
47	0.11 ± 0.020	0.12 ± 0.038
87	0.11 ± 0.036	0.11 ± 0.023
127	0.10 ± 0.026	0.081 ± 0.019

Bezieht man die Überlebensraten jeweils auf die nichtstimulierten Werte (t = 0), so ergibt sich der in Abbildung 15 zu sehende zeitliche Verlauf der Induktion der Kontakt-Resistenz in kleinen Sphäroiden. Bei kurzen Vorinkubationszeiten (12 - 27 Minuten) stieg das Überleben drastisch an, sank aber bei längeren PGE<sub>1</sub>-Inkubationszeiten wieder ab. Die maximale Stimulierung des Überlebens war bereits nach 12 Minuten Inkubation in Gegenwart von PGE<sub>1</sub> erreicht, nach ca 100 Minuten Inkubation dagegen lag das Überleben wieder auf dem Kontrollniveau. Das Überleben von Monolayern ließ sich mit Hilfe von PGE<sub>1</sub> nur schwach erhöhen. Wurden die Sphäroide aber bei sonst gleichen Versuchsbedingungen statt bei 37 °C bei Raumtemperatur bestrahlt, so konnte diese PGE<sub>1</sub> induzierte Erhöhung der Strahlenresistenz nicht beobachtet werden. Da ein wichtiges Charakteristikum der Kontakt-Resistenz ihre Temperaturabhängigkeit ist (16) (siehe 2.4.), läßt dieses Ergebnis darauf schließen, daß es sich bei der PGE<sub>1</sub> induzierten Resistenz um die Kontakt-Resistenz handelt.



Eine Vorinkubation großer Sphäroide (Durchmesser 270  $\mu\text{m}$ ), die ihre Kontakt-Resistenz bereits voll ausgebildet haben, mit  $\text{PGE}_1$ , brachte keine zusätzliche Erhöhung ihrer Überlebensfähigkeit, sondern hatte, im Gegenteil, leicht zytotoxische Auswirkungen.

#### 4.7.2. Stimulierung mit Forskolin

Mit einem weiteren Aktivator der Adenylat-Cyclase, nämlich mit Forskolin (34, 35), ließ sich die Überlebensrate kleiner Sphäroide ebenfalls steigern. Wie im Falle des  $\text{PGE}_1$  erfolgte keine nennenswerte Stimulation beim Monolayer. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: Erhöhung der Überlebensrate nach Bestrahlung mit 10 Gy  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  durch 5 Minuten Vorinkubation mit Forskolin (3  $\mu\text{M}$ ) und MIX (50  $\mu\text{M}$ )

	Monolayer		Sphäroide	
	Überlebensrate	relatives Überleben	Überlebensrate	relatives Überleben
Kontrolle	0.076	1	0.065	1
Forskolin	0.090	1.18	0.13	2.0

#### 4.8. Messung der basalen Adenylat-Cyclase-Aktivität bei verschiedenen Zelllinien

Bereits die Einschränkung der Thymidinaufnahme in proliferierende B14-Zellen bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (siehe 4.4) gab einen ersten Hinweis auf eine eventuelle Regulation membrangebundener Prozesse durch Gap Junctions. Ein Enzym, das bei der Ausprägung der Kontakt-Resistenz sicher eine wichtige Rolle spielt, ist die Adenylat-Cyclase (siehe die Stimulierungsversuche in 4.7.). Es lag daher nahe, die Aktivität dieses membrangebundenen Enzyms und seine mögliche Regulation durch Gap Junctions zu untersuchen.

Die basale Aktivität der Adenylat-Cyclase wurde für Sphäroide und Monolayer verschiedener Zelldichten von B14-, V79-, 3T3-

und L-Zellen ermittelt. Nach der Methode von Schultz und Jakobs (36) wurde die Enzymaktivität über die Menge an gebildetem cAMP bestimmt (siehe 3.8.). Die Ergebnisse dieser Versuche wurden in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Basale Aktivität der Adenylat-Cyclase gemessen an 4 Zelllinien und bei verschiedenen Zelldichten; angegeben als pmol cAMP/mg Protein/10 Min. Für Einzelheiten zum Test siehe Kap. 3.8.

Zelllinie	3T3	L	B14	V79
Einzelzellen	15.8	34.1	143.4	197.6
exponentielle Monolayer	9.0	38.9	69.4	132.2
Plateau-Monolayer	10.0	51.2	82.1	183.2
Sphäroide ( $\phi 270 \mu\text{m}$ )	6.9	53.4	44.3	91.1

Was beim Betrachten dieser Tabelle als erstes auffällt, sind die relativ hohen Werte bei den beiden chinesischen Hamsterzelllinien B14 und V79. Im Vergleich dazu liegen die Werte für die Mäusezelllinien 3T3 und L immer tiefer.

Bei den ungekoppelten L-Zellen, deren Sphäroide keine Kontakt-Resistenz ausbilden (13), stieg die Aktivität der Adenylat-Cyclase mit zunehmender Zelldichte ständig und erreichte bei den Sphäroiden ein Maximum. Der Unterschied zwischen Zellen mit engem 2-dimensionalem Kontakt (Plateau) und Sphäroiden war allerdings nicht sehr bedeutend.

Ganz anders verhielt es sich dagegen bei den gut gekoppelten Zelllinien 3T3 und B14 (13). In beiden Fällen war die Adenylat-Cyclase-Aktivität bei Zellen, die überhaupt nicht miteinander in Kontakt stehen, nämlich den Einzelzellen, am

höchsten und bei dem engen 3-dimensionalen Kontakt der Sphäroidzellen am niedrigsten. Besonders interessant war dabei auch der drastische Sprung in der Enzymaktivität von Einzelzellen zu exponentiell wachsenden Monolayern. Sobald die Zellen miteinander in Kontakt traten, sank die basale Adenylat-Cyclase-Aktivität stark ab. Ein weiterer Rückgang in der Enzymaktivität machte sich beim Übergang vom 2-dimensionalen zum 3-dimensionalen Verband (Monolayer  $\longrightarrow$  Sphäroid) bemerkbar.

Die V79-Zellen, die nach den Messungen von Dertinger und Hülser (13) nur schwach gekoppelt sind, nahmen zwischen den Zelllinien mit ausgeprägter Kontakt-Resistenz (3T3, B14) und den L-Zellen eine mittlere Stellung ein. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei 3T3- und B14-Zellen besaßen Einzelzellen die höchste und Sphäroide die niedrigste Enzymaktivität. Exponentielle Monolayer und Plateauphase-Monolayer verhielten sich dagegen wie die L-Zellen: mit zunehmender Zelldichte nahm auch die Adenylat-Cyclase-Aktivität zu.

Setzt man als Maß für die Aktivität der Gap Junctions für jede Zelllinie die relative elektrische Zelleitfähigkeit  $g$  in Beziehung zur jeweiligen relativen Adenylat-Cyclase-Aktivität, so ergibt sich der in Abbildung 16 gezeigte Zusammenhang. Die Werte für die relativen elektrischen Leitfähigkeiten stammen aus den Widerstandsmessungen von Dertinger und Hülser (13).

Definitionen:

1) relative elektrische Leitfähigkeit:  $g(EZ)/g(ML) = \frac{R'}{R''}$

mit  $R'$ : Input-Widerstand einer Zelle innerhalb eines Monolayers

$R''$ : Input-Widerstand einer einzelnen, isolierten Zelle

$g$  : Leitfähigkeit

2) relative Adenylat-Cyclase-Aktivität  $r$ :

$$r = \frac{\text{Aktivität Einzelzelle}}{\text{Aktivität Monolayer}}$$

Um zu berücksichtigen, daß die Kopplungsmessungen in "halbdichten" Monolayern durchgeführt worden waren, wurde, um der Korrektheit willen, für die Monolayeraktivität das arithmetische Mittel aus exponentiellem und Plateau-Monolayer eingesetzt..

Trägt man die relativen elektrischen Zelleitfähigkeiten gegen die relativen Adenylat-Cyclase-Aktivitäten auf, so ergibt sich die in Abbildung 16 gezeigte Gerade. Aus diesen Ergebnissen folgt also eine eindrucksvolle Korrelation zwischen der Zellkopplung und der Adenylat-Cyclase-Aktivität. Dies bedeutet, daß mit zunehmender Kopplung (abnehmender relativer elektrischer Leitfähigkeit) der Zellen die basale Enzymaktivität der Monolayerzellen im Verhältnis zu den Einzelzellen absinkt.

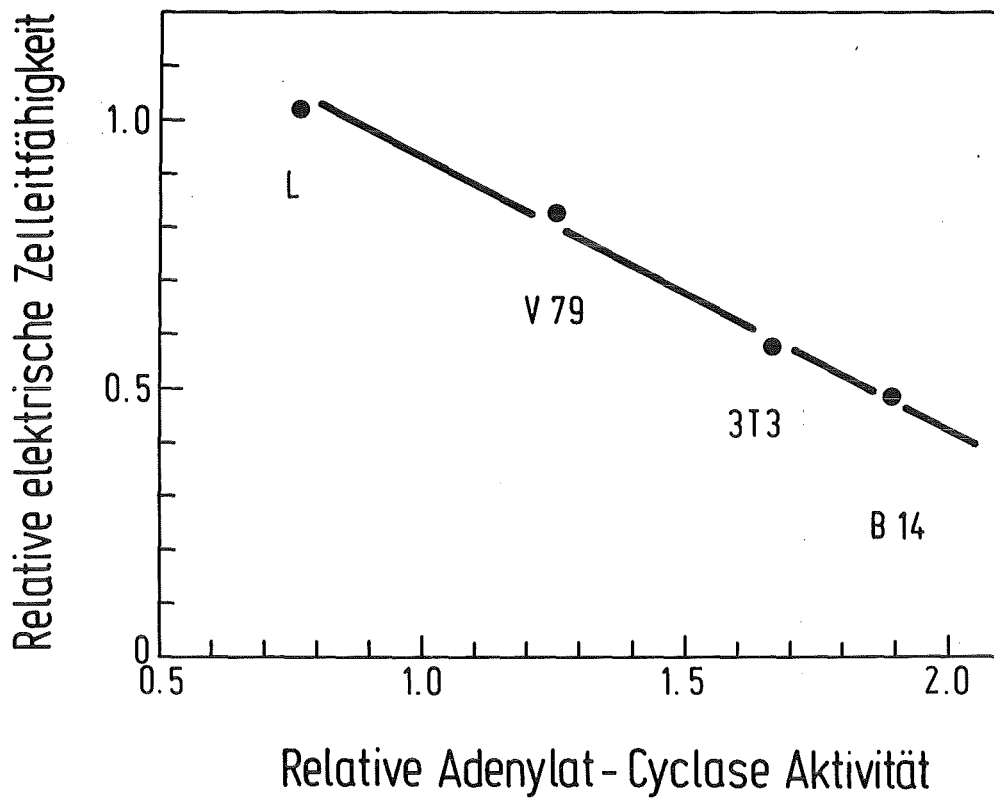


Abb. 16: Zusammenhang zwischen der relativen elektrischen Zelleitfähigkeit und der relativen Adenylat-Cyclase-Aktivität; bestimmt für 4 verschiedene Zelllinien: L, V79, 3T3, B14; Messung der Adenylat-Cyclase-Aktivität wie unter 3.8. beschrieben; die relative elektrische Leitfähigkeit wurde aus Widerstandsmessungen von Dertinger und Hülser (13) berechnet; weitere Details siehe Text

## 5. Diskussion

### 5.1. Kontakt-Resistenz als Eigenschaft einer Einzelzelle

Aus den zytogenetischen Untersuchungen geht hervor, daß die Kontakt-Resistenz eine Eigenschaft ist, die die Zellen unter den Bedingungen des 3-dimensionalen Wachstums in Gegenwart von Gap Junctions erlangen. Hierbei handelt es sich nicht allein um eine Eigenschaft der inneren ruhenden Sphäroidzellen, sondern sie umfaßt auch die äußeren proliferierenden Zellen, wie Messungen von Zykluseffekten und Chromosomenaberrationen zeigten. Dabei "schützt" die Kontakt-Resistenz die Zellen im Sphäroid gegen verschiedene Arten DNA-bezogener Strahlenschäden wie Änderungen im Zellzyklusverlauf, Chromosomenschädigungen und Vorwärtsmutation zur Resistenz gegen Purinanaloga.

Darüberhinaus unterstützen die hier gewonnenen Ergebnisse die von Dertinger und Hülser (13) aufgestellte Hypothese, nach der die Kontakt-Resistenz eine Eigenschaft der Einzelzelle sein soll. Hierfür spricht die Beobachtung, daß kleine Sphäroide trotz 3-dimensionalen Wachstums und bereits bestehender, interzellulärer Kommunikation noch keine Kontakt-Resistenz besitzen, sondern erst im Verlauf eines Reifungsprozesses erwerben. (siehe 4.6. Abb. 14).

Zusätzlich wiesen Durand (43) für die V79-Sphäroide und Dertinger (44) für B14- und 3T3-Sphäroide eine ausgeprägte "Abklingkinetik" der Kontakt-Resistenz nach. Wurden nämlich Sphäroide zu verschiedenen Zeiten vor der Bestrahlung trypsinisiert, d.h. als Einzelzellen bestrahlt, so nahm die Kontakt-Resistenz nicht schlagartig ab, sondern verringerte sich langsam als Funktion der Zeit zwischen Trypsinierung und Bestrahlung. Bei den B14-Sphäroiden ließ sie sich noch 3 Stunden nach Bestrahlung nachweisen, bei den V79- und 3T3-Sphäroiden verlief dieser "Abklingprozeß" sogar noch langsamer (6-8 Stunden). Diese Befunde sprechen dafür, daß es sich bei der Kontakt-Resistenz um eine Einzelzeleigenschaft handelt. Es gibt keine Unterstützung für die auf den ersten Blick sehr attraktive Hypothese, nach der die Kontakt-

Resistenz durch einen interzellulären Austausch von (Reparatur-bezogenen) Substanzen im Augenblick der Bestrahlung oder kurz danach, z.B. während der Bruchreparatur, zustande käme (Helferfunktion). Ausgeprägte Austauschprozesse finden nämlich ebenso in Monolayerkulturen statt (45,46); Kontakt-Resistenz dagegen wurde hier nie beobachtet.

## 5.2. Gap Junctions und die Regulation membrangebundener Enzyme

Die Diskussion des Problems, wie ausgerechnet eine interzelluläre Funktionseinheit, nämlich die Gap Junctions, zur Ausbildung einer Einzelzellfunktion führen kann, wird dadurch erschwert, daß derzeit keine über die Beschreibung des Stoffaustausches und seiner Mechanismen, sowie über die Identifizierung der Gap Junction-Proteine hinausgehenden Erkenntnisse über die Funktion der Gap Junctions vorliegen (47). Die in dieser Arbeit beobachtete mittelbare oder unmittelbare Korrelation zwischen der Ausbildung von Gap Junctions und der Aktivität gewisser membrangebundener Proteine, wie der Adenylat-Cyclase (siehe Abb. 16 und Tab. 7) oder des für den Thymidintransport in die B14-Zellen zuständigen Transportsystems (siehe Abb. 12), läßt auf eine Regulation solcher Proteine durch die Gap Junctions schließen. Dies ist ein in dieser Form noch nicht erzieltetes Ergebnis und wirft ein neues Licht auf die Rolle der Gap Junctions. Die Mechanismen einer solchen Regulation liegen zweifellos in einer lokalen Konformationsänderung der Membran begründet, die durch die hochspezifische reguläre Struktur der Gap Junctions (48) bedingt wird. Herausragendes Beispiel für die Struktursensitivität gerade der Adenylat-Cyclase ist ihre Stimulation durch lokale Konformationsänderungen der Membran, wie sie etwa durch  $PGE_1$ -Bindung induziert werden. Wie effizient und "scharf" eine solche Regulation sein kann, zeigt Abb. 12. Oberhalb einer kritischen Zelldichte erscheint kein markiertes Thymidin mehr in der Zelle.

### 5.3. Die Rolle des dreidimensionalen Kontaktes

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, ist die Kontakt-Resistenz ein komplexes Problem, an dessen Ausprägung mehrere Faktoren beteiligt sind. Einer davon ist der 3-dimensionale Zellkontakt. Die überragende Bedeutung des 3-dimensionalen Kontaktes für die Ausprägung von Zytodifferenzierungsvorgängen ist in einigen Arbeiten gut dokumentiert, aber mechanistisch noch unverstanden. Interessant hierbei ist, daß stets auch Zell-Zell-Verbindungen involviert sind. So ist z.B. bei dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* der 3-dimensionale Kontakt mit der Synthese neuer Proteine verbunden und hierfür sogar unbedingt erforderlich (49,50). Interessanterweise ändern *Dictyostelium discoideum* Mutanten ohne bestimmte "EDTA-resistent Junctions" ihr Proteinmuster nach Aggregation nicht (51). An einem ganz anderen System erhoben Amsterdam et. al. (52) kürzlich ähnliche Befunde. Sie zeigten, daß Granulosa-Zellen aus Ratten nach 3-dimensionaler Aggregation Gap Junctions ausbildeten. Gleichzeitig entwickelten sich Merkmale, die für die Differenzierung dieser Zellen typisch sind, einschließlich der Bildung des LH-Rezeptors (LH = Luteinisierendes Hormon). Auch in diesem Fall war der 3-dimensionale Kontakt unabdingbare Voraussetzung für die beobachteten Effekte. Die Autoren folgerten hieraus, daß es unter dem Einfluß der Gap Junctions und des 3-dimensionalen Kontaktes zu einem "Zellreifungsprozeß" kommt.

Eine Art Zellreifung vollzieht sich offenkundig auch in den B14-Sphäroiden: Kontakt-Resistenz ist nur in kleinen Aggregaten, nicht aber im Monolayer durch Hormone stimulierbar (siehe 4.7.1. Abb. 15) und entwickelt sich bei weiterer Reifung der Sphäroidzellen sogar schließlich ohne äußere Stimulierung.

Unter Zugrundelegung dieser Befunde schlagen wir folgende Hypothese für die Ausbildung der Kontakt-Resistenz vor: unter dem Einfluß der Gap Junctions vollzieht sich in Sphäroidzellen eine physiologische Umstimmung (Reifung), die eine veränderte Zellfunktion nach sich zieht, unter anderem



die hier untersuchte Kontakt-Resistenz. Mechanistische Basis für diesen Prozeß ist die Regulation membrangebundener Enzyme über die Gap Junctions, wobei unsere Ergebnisse nicht ausschließen, daß auch die Gap Junctions selbst in diesen Regulationsprozeß einbezogen sind. In diesem Modell ist die Kontakt-Resistenz "automatisch" eine Einzelzellfunktion.

#### 5.4. Ist cAMP für die Kontakt-Resistenz von Bedeutung?

Cyclisches AMP, der "second messenger" der Zelle, kommt in fast allen Säugerzellkulturen vor und wirkt wahrscheinlich regulierend auf so bedeutende Prozesse wie Zellproliferation, Reifung und Differenzierung (52-56).

Die unter 4.7 und 4.8 geschilderten Ergebnisse deuten darauf hin, daß auch bei den B14-Zellen ein Zusammenhang zwischen der Adenylat-Cyclase, dem hormonsensitiven Enzym, das ausschließlich für die Bildung des cAMP's verantwortlich ist, und der Kontakt-Resistenz denkbar wäre. So gelang es, mit Stimulatoren der Adenylat-Cyclase wie  $PGE_1$  und Forskolin die Kontakt-Resistenz in kleinen Sphäroiden, die diese noch nicht entwickelt hatten, zu induzieren. Auch mit Choleratoxin, einem Protein, das ebenfalls spezifisch die Adenylat-Cyclase stimuliert (57,58), konnte dieser Effekt hervorgerufen werden (44). Da die  $PGE_1$ -Induktion der Kontakt-Resistenz (siehe Abb. 15) den typischen zeitlichen Ablauf der  $PGE_1$ -stimulierten cAMP-Synthese zeigt (59), läßt dies vermuten, daß cAMP auch für die Expression der Kontakt-Resistenz benötigt wird.

Auch eine Behandlung der Sphäroide mit dem Tumorpromotor TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) läßt auf einen möglichen Zusammenhang zwischen cAMP, Gap Junctions und Kontakt-Resistenz schließen. Es ist bekannt, daß TPA den zellulären Gehalt an cAMP drastisch senkt (60). Dertinger (44) gelang der Nachweis, daß TPA in großen Sphäroiden, deren Kontakt-Resistenz bereits voll entwickelt ist, diese inhibieren kann. Interessanterweise eliminiert TPA gleichzeitig auch die elektrische Kopplung (44), was inzwischen auch von

einer anderen Arbeitsgruppe (61) bestätigt wurde.

Aber auch bei den unter 5.3. zitierten Arbeiten wurde eine Abhängigkeit vom cAMP gefunden. So stieg z.B. der cAMP-Gehalt als Folge der 3-dimensionalen Aggregation der Granulosa-Zellen an (52). Die in *Dictyostelium discoideum* Aggregaten beobachtete Differenzierung konnte nach Disaggregation durch cAMP für eine gewisse Zeit aufrecht erhalten werden. Dies gelang jedoch niemals mit Zellen, die zuvor nie aggregiert waren (62).

Diese Befunde führen zu dem Schluß, daß neben 3-dimensionaler Aggregation und Gap Junctions auch cAMP an der Ausprägung der Kontakt-Resistenz beteiligt ist. Damit erfüllt dieses Phänomen die Kriterien für einen Differenzierungsprozeß.

Eine abschließende Bemerkung betrifft einen möglichen Widerspruch: Wenn die Kontakt-Resistenz tatsächlich ein "Hoch-cAMP"-Effekt ist, warum sinkt dann in Sphäroiden von gekoppelten Zelllinien die Aktivität der Adenylat-Cyclase gegenüber dem Monolayer?

Für Monolayer von 3T3-Zellen verschiedener Zelldichte wurde von Bannai und Sheppard (63) folgendes beobachtet: Oberhalb einer kritischen Zelldichte von ca  $4 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$  (vergleiche auch Abb. 12) erhöhte sich der cAMP-Gehalt der Zelle "schlagartig" um mehr als das Doppelte. Dieser Wert änderte sich bei weiterer Zunahme der Zelldichte nicht mehr, auch nicht unter Bedingungen der Konfluenz. An der gleichen Zelllinie finden wir bereits im exponentiellen Monolayer eine Abnahme der Adenylat-Cyclase-Aktivität gegenüber der Einzelzelle, (ebenfalls ohne weitere Änderung im Plateau (siehe Tab. 7)). Die einzige Erläuterung für das gegenläufige Verhalten von Adenylat-Cyclase-Aktivität und cAMP-Gehalt liegt in der Annahme eines verringerten cAMP-Verlustes bei Anwesenheit von Gap Junctions, etwa durch Verringerung der cAMP-Phosphodiesterase-Aktivität. Diesbezügliche Untersuchungen lagen jedoch außerhalb des Zieles dieser Arbeit.

### 5.5. Ist die Kontakt-Resistenz die Folge einer verbesserten DNA-Reparatur?

Chromosomenschäden gelten allgemein als zytologischer Ausdruck von DNA-Läsionen, obwohl bisher niemand schlüssig nachweisen konnte, wie DNA-Schäden in Chromosomenaberrationen umgewandelt werden. Da die Chromosomen von B14-Sphäroiden erheblich weniger durch  $\gamma$ -Strahlung geschädigt wurden als die von Monolayern (siehe 4.2. Tab.4), lag es nahe, eine verbesserte DNA-Reparatur der Sphäroide hierfür verantwortlich zu machen.

Messungen der DNA-Strangbruchreparatur bei B14-Monolayern und Sphäroiden bestätigten diese Vermutung nicht. Monolayer- und Sphäroidzellen reparieren DNA-Strangbrüche gleich schnell und gleich effektiv (siehe 4.3. Abb. 11). Obwohl die verwendete Methode nicht zwischen Einzel- und Doppelstrangbrüchen unterscheidet, sollten große Unterschiede im Hinblick auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen, die nach  $\gamma$ -Bestrahlung nur rund 10 % aller DNA-Brüche ausmachen (64), klar auflösbar sein. Da dies nicht zutrifft, kann als sicher gelten, daß beide Arten von Strangbrüchen von Monolayern und Sphäroiden mit annähernd gleicher Effektivität repariert werden.

Ein Vergleich mit ähnlichen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bringt deutliche Unterschiede zum Vorschein. So wurden V79-Zellen von 2 Arbeitsgruppen (43, 65) im Hinblick auf die Reparatur von DNA-Strangbrüchen in Monolayer- und Sphäroidzellen untersucht. Durand (43) fand ebenfalls keinen Unterschied, während Körner (65) zu dem Ergebnis kam, daß Sphäroide besser reparieren.

Die Tatsache, daß die DNA-Strangbruchreparatur bei B14-Monolayern und Sphäroiden gleich effektiv verläuft, schließt natürlich nicht aus, daß eventuell andere Arten von DNA-Reparaturfunktionen bei der Kontakt-Resistenz beteiligt sind. Da die DNA von exponentiellen Monolayern und von Sphäroiden nicht mit [ $^{14}\text{C}$ ] Thymidin markierbar ist, mußten Reparaturmessungen aus technischen Gründen auf die Bestimmung der Gesamtbrüche beschränkt bleiben. Doch auch andere Autoren,

die Zellen unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit auf ihr Reparaturverhalten hin untersuchten, fanden keine Unterschiede. Nach Rahmsdorf et al. (66) verläuft z.B. bei Zellen verschiedener Strahlenempfindlichkeit und unterschiedlichen Differenzierungsgrades die Reparatur von Einzel- und Doppelstrangbrüchen und die unscheduled DNA-Synthese gleich effektiv. Sie vermuten, daß die zelluläre Strahlenempfindlichkeit und die wichtigen Reparaturenzyme mit dem Differenzierungsgrad der Zelle zusammenhängen.

Macht man für die Entwicklung der Kontakt-Resistenz, wie in 5.4. ausgeführt, eine Art Differenzierungsvorgang, induziert durch den 3-dimensionalen Kontakt, verantwortlich, so unterstützen die Ergebnisse bei den B14-Zellen diese Vermutungen.

Ein möglicher Grund dafür, warum in beiden Fällen keine Unterschiede im Reparaturverhalten nachweisbar sind, könnte auch von ganz anderer Art sein. Mit allen bis heute zur Verfügung stehenden Methoden wird vorwiegend die Wiederherstellung der Primärstruktur der DNA ermittelt (quantitative Reparatur). Es gibt keinen Beweis, daß die DNA dabei wieder ihre ursprüngliche Funktion erlangt (qualitative Reparatur). Eventuelle diesbezügliche Unterschiede zwischen Monolayern und Sphäroiden könnten mit den heutigen Methoden nicht erfaßt werden.

#### 5.6. Kommt die Kontakt-Resistenz durch SOS-Reparatur der DNA zustande?

Die Behandlung von Bakterien mit UV-Licht oder chemischen Agentien, die die DNA schädigen, führt zur Induktion eines Reparaturweges, den Radman (67) SOS-Reparatur nannte. Im Gegensatz zu anderen Reparaturmechanismen arbeitet er fehlerhaft (error-prone), d.h. er führt in erhöhtem Maße zur Induktion von Mutationen. Laval (68) beobachtete kürzlich, daß Säugerzellen, die kurz vor oder im Augenblick der Bestrahlung mit Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung behandelt wurden, gegenüber ionisierender Strahlung resistenter wurden. Diese erhöhte Strahlenresistenz erklärt sie mit der Existenz eines fehlerhaften Reparatursystems. Nach ihren

Ergebnissen erhöht sich in so behandelten Zellen sowohl die DNA-Reparatur als auch die Mutationshäufigkeit zur AG-Resistenz.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die Kontakt-Resistenz der B14-Sphäroide ebenfalls durch eine SOS-Reparatur der DNA zustandekommt. Die Antwort hierauf lautet eindeutig "nein". Eine bisher nicht meßbare, mögliche funktionelle "Kontakt-Resistenz-Reparatur" wäre auf jeden Fall "error-free", da die Mutationsrate bei den Sphäroiden gegenüber Monolayern nicht erhöht, sondern sogar reduziert ist (siehe 4.5. Abb. 13).

Der hier gezeigte Verlauf der Mutationskurven für Monolayer und für Sphäroide ist zwar recht ungewöhnlich, wurde aber auch von anderen Arbeitsgruppen gefunden (69-71). Die Mutationsrate bleibt nach Erreichen eines Maximalwertes nicht konstant, sondern sinkt wieder ab. Es müssen also durch einen unbekanntem Prozeß Mutanten verloren gegangen sein. Häufig wird hierfür eine zu hohe Zelldichte, die Angaben schwanken zwischen 1400 Zellen  $\text{cm}^{-2}$  (72) und 16 000 Zellen  $\text{cm}^{-2}$  (73), verantwortlich gemacht. Auf Grund des dichten Zell-Zell-Kontaktes von Mutanten mit Wildtypzellen sollten, so wird vermutet, Enzymprodukte ausgetauscht werden, die die Mutanten wieder sensitiv gegenüber dem Selektionsagens machen.

Diese Erklärung allein reicht aber nicht aus, denn Mäuse-Lymphomazellen z.B., gezüchtet in Suspensionskultur, also unter Bedingungen, die keinen Austausch von Stoffwechselprodukten gestatten, zeigen ebenfalls ein Maximum der Mutationsrate (71). Eine einfache Erklärung könnte folgendermaßen aussehen: nach Shaw und Hsie (28) proliferieren einige  $\text{TG}^r$ -Mutanten etwas langsamer als Wildtypzellen. Mit zunehmender Expressionszeit könnte dies zu einer "Ausdünnung" der Mutanten innerhalb der Zellpopulation führen. Tatsächlich macht eine einfache Rechnung deutlich, daß bereits eine Zunahme der Verdopplungszeit der Mutanten um nur ca 15 % ausreicht, um den Verlust an Mutanten nach dem 3. bzw. 4. Tag zu erklären:

Vernachlässigt man die mathematisch unbekannte Kinetik der Mutantenausdünnung, so ist in grober Näherung die Mutantenausdünnung durch das Verhältnis der Wachstumsfaktoren von Mutanten und Nicht-Mutanten gegeben:

$$\frac{\Delta m(t)}{\Delta m(0)} = e^{-\frac{t \cdot \ln 2}{t_m}} / e^{-\frac{t \cdot \ln 2}{t_c}}$$

Dabei ist  $\Delta m(t)$  die induzierte Mutationsrate (= Differenz zur Spontanrate); Zeitnullpunkt ist Tag 4 für Monolayer bzw. Tag 3 für Sphäroide (Abb. 13);  $t_c$ ,  $t_m$  sind die Verdopplungszeiten für die Wildtyp- bzw. Mutantenzellen. Setzt man typische Werte ein ( $t_c = 11$  h;  $t_m = 13$  h), so ergibt sich nach Umformung:

$$\Delta m(t) = \Delta m(0) e^{-\frac{t \ln 2}{71,5}}$$

d.h. ca 3 Tage nach maximaler Expression ( $t = 0$ ) ist die induzierte Mutationsrate etwa auf die Hälfte abgefallen, was Abb. 13 recht gut bestätigt.

Die für die B14-Zellen geltenden Ergebnisse stimmen übrigens nicht mit denen für V79-Zellen überein (69). In den Mutationsraten von V79-Monolayern und Sphäroiden konnte Durand keinen Unterschied feststellen. Ein Grund hierfür könnte in der schwachen Kontakt-Resistenz der V79-Sphäroide (13) liegen. Es ist durchaus denkbar, daß daher geringe Unterschiede in der Mutagenität von V79-Monolayern und Sphäroiden im  $TG^R$ -Test unentdeckt bleiben. Ebenso könnten unterschiedliche Versuchsprotokolle von Bedeutung sein. Während die V79-Zellen nach Bestrahlung für die Dauer der Expressionszeit in ihrem ursprünglichen Kulturzustand (also als Monolayer und als Sphäroide) belassen wurden, fand bei den B14-Zellen die Mutantenausdünnung immer in Monolayerkultur statt. Dies hat gegenüber dem Versuchsprotokoll von Durand zwei entscheidende Vor-

teile:

1. Expression der Mutanten von Monolayern und Sphäroiden erfolgt unter identischen Kulturbedingungen.
2. Bedingt durch den engen Zell-Zell-Kontakt im Sphäroid könnten durch Austauschprozesse während der Expressionszeit Mutanten verlorengelassen. Die  $TG^r$ -Mutationsrate würde dann für die Sphäroide niedriger ausfallen als der Wirklichkeit entspricht.

### 5.7. Schlußbemerkungen

Diese Arbeit hat gezeigt, daß Kontakt-Resistenz ein komplexes Phänomen ist, welches sich in einem noch nicht voll verstandenen Wechselspiel zwischen 3-dimensionalem Zellkontakt, Gap Junctions und cAMP ähnlich einem Differenzierungsprozeß entwickelt. Unter Anwendung der gegenwärtigen Methodologie der DNA-Reparatur treten keine Unterschiede in der DNA-Bruchreparatur zwischen Sphäroiden und Monolayern zutage. Neben dem bereits diskutierten kann dies auch bedeuten, daß die Kontakt-Resistenz kein Reparatureffekt und möglicherweise nicht einmal DNA-bezogen ist. Eine Zelle kann Strahlenresistenz auch dadurch erwerben, daß sie die Fähigkeit zur Eliminierung toxischer Strahlenprodukte, die nicht primär auf die DNA-Primärstruktur wirken, wie z.B. der Peroxidradikale, entwickelt. In diesem Zusammenhang gewinnt derzeit das System der Superoxid-Dismutasen zunehmend an Interesse (74). Da davon ausgegangen werden muß, daß die Kontakt-Resistenz eine universelle Eigenschaft kommunizierender Gewebe darstellt, und somit bei der unbeabsichtigten Bestrahlung (Strahlenrisiko) und der therapeutischen Bestrahlung berücksichtigt werden muß, kommt der zukünftigen vertiefenden Untersuchung dieses Phänomens große Bedeutung zu.

## 6. Zusammenfassung

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war die Beobachtung, daß Zellen, die als Sphäroide, also in 3-dimensionaler gewebeartiger Organisation wachsen, im Überlebenstest resistenter gegenüber Strahlung sind als die entsprechenden Monolayer. Diese Strahlenresistenz wurde als Kontakt-Resistenz bezeichnet und tritt nur bei Sphäroiden solcher Zelllinien auf, die über Gap Junctions ionisch gekoppelt sind (gekoppelte Zellen).

Nach Untersuchungen an der gut gekoppelten B14 FAF 28/B7 Zelllinie des chinesischen Hamsters muß die Kontakt-Resistenz als Eigenschaft der Einzelzelle angesehen werden. Sie erlangt sie nur unter den Bedingungen des 3-dimensionalen Wachstums in Gegenwart von Gap Junctions. Die Kontakt-Resistenz ist keine Eigenschaft, die gleichzeitig mit der Bildung des 3-dimensionalen Zellverbandes auftritt, sondern sie entwickelt sich bei B14 erst als Folge eines "Reifungsprozesses" nach Erreichen einer kritischen Sphäroidgröße von 220 µm.

Aus Messungen von Zellzykluseffekten und Chromosomenaberrationen geht hervor, daß es sich hierbei nicht allein um eine Eigenschaft der inneren ruhenden Sphäroidzellen handelt. Auch die äußeren proliferierenden Zellen zeigen Kontakt-Resistenz. Ferner zeigen die Untersuchungen, daß die Kontakt-Resistenz die Zellen gegen unterschiedliche zytogenetische Schädigungen wie Änderungen im Verlauf des Zellzyklus, Chromosomenaberrationen und Mutation zur Thioguaninresistenz schützt. Bei gleicher Strahlendosis erwiesen sich die Sphäroide in allen diesen Tests als weniger empfindlich als die entsprechenden Monolayer.

Für die Ansicht, die Kontakt-Resistenz rühre von einer verbesserten DNA-Reparatur der Sphäroidzellen her, ließen sich keine Beweise erbringen. Im Gegenteil, DNA-Strangbrüche werden von Monolayern und Sphäroiden gleich schnell und gleich effektiv repariert. Dies schließt aber nicht aus, daß andere Arten von DNA-Reparatur für die Kontakt-Resistenz von Bedeutung sein könnten. Sicher kommt die Kontakt-Resistenz aber



nicht durch eine SOS-Reparatur der DNA zustande. In diesem Fall müßte die strahleninduzierte Mutationsrate in Sphäroiden höher liegen als im Monolayer, aber genau das Gegenteil trifft zu.

Diese Untersuchungen wurden durch Experimente ergänzt, die einen Hinweis auf die die Kontakt-Resistenz hervorrufenden Prozesse geben könnten. Ausgangspunkt hierfür war die Beobachtung, daß bei den B14-Zellen, im Gegensatz zu den ungekoppelten V79-Zellen, oberhalb einer kritischen Zelldichte von  $4 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$  kein Thymidin mehr von der Zelle aufgenommen wurde, was eine Regulation membrangebundener Funktionen vermuten ließ.

Messungen der Aktivität der membrangebundenen Adenylat-Cyclase bei verschiedenen Zelllinien und Kulturbedingungen, woraus zugleich auch Folgerungen über die Rolle des cAMP's bei der Ausprägung der Kontakt-Resistenz gezogen werden konnten, bestätigten die regulatorische Funktion der Gap Junctions. Es wurde eine Korrelation gefunden zwischen der Aktivität der Adenylat-Cyclase und dem Ausmaß der ionischen Kopplung. Ferner konnte in kleinen Sphäroiden durch Stimulation der Adenylat-Cyclase mit Prostaglandin  $E_1$  oder Forskolin Kontakt-Resistenz induziert werden, nicht aber in Monolayern.

Die über die Kontakt-Resistenz erzielten Ergebnisse stimmen in fast allen wichtigen Details mit Literaturbefunden überein, wonach durch das Zusammenspiel zwischen 3-dimensionalem Kontakt, Gap Junctions und cAMP Zytodifferenzierungsvorgänge ausgelöst werden, obgleich die Mechanismen dieses Wechselspiels - hier wie dort - noch nicht verstanden sind. Somit ist Kontakt-Resistenz wahrscheinlich die Folge eines in gekoppelten Sphäroiden ablaufenden, differenzierungsähnlichen Prozesses.

7. Literaturverzeichnis

1. GILULA, N.B., REEVES, O.R., STEINBACH, A. (1972)  
Nature (London) 235, 262 - 265
2. PEDERSON, D.C., SHERIDAN, J.D., JOHNSON, R.G. (1980)  
Exp. Cell Res. 127, 159 - 177
3. HÜLSER, D.F., WEBB, D.J. (1973)  
Exp. Cell Res. 80, 210 - 222
4. LO, C.W., GILULA, N.B. (1979)  
Cell 18, 399 - 409
5. LO, C.W., GILULA, N.B. (1979)  
Cell 18, 411 - 422
6. LO, C.W., GILULA, N.B. (1980)  
Develop. Biol. 75, 93 - 111
7. LO, C.W., GILULA, N.B. (1980)  
Develop. Biol. 75, 112 - 120
8. SUTHERLAND, R.M., INCH, W.R., MC CREDIE, J.A. (1970)  
Int. J. Radiat. Biol. 18, 491 - 495
9. SUTHERLAND, R.M., MC CREDIE, J.A., INCH, W.R. (1971)  
J. Nat. Cancer Inst. 46, 113 - 116
10. SUTHERLAND, R.M., DURAND, R.E. (1973)  
Int. J. Radiat. Biol. 23, 235 - 246
11. YUHAS, J.M., LI, A.P., MARTINEZ, A.O. LADMAN, A.J. (1977)  
Cancer Res. 37, 3639 - 3643
12. DURAND, R.E., SUTHERLAND, R.M. (1972)  
Exp. Cell Res. 71, 75 - 80
13. DERTINGER, H., Hülser, D. (1981)  
Rad. and Environm. Biophys. 19, 101 - 107
14. DERTINGER, H., LÜCKE-HÜHLE, C. (1975)  
Int. J. Radiat. Biol. 28, 255 - 265
15. GOODENOUGH, D.A. (1975) in  
"Methods in Membrane Biology", Band III, 51 - 80  
ed. by Korn, E.D., Plenum Press, N.Y.

16. DURAND, R.E., SUTHERLAND, R.M (1975) in  
Cell Survival after Low Doses of Radiation,  
237 - 247  
ed. by Alper, T., The Institute of Physics and  
Wiley, London
17. DERTINGER, H., JUNG, H. (1969) in  
Molekulare Strahlenbiologie, 40  
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
18. VINDELOV, L. (1977)  
Virchows Arch. B.Cell Path. 24, 227 - 242
19. BAISCH, H., GÖHDE, W., LINDEN, W.A. (1975)  
Rad. and Environm. Biophys. 12, 31 - 39
20. SCOTT, D., EVANS, H.J. (1967)  
Mut. Res. 4, 579 - 599
21. RYDBERG, B. (1975)  
Rad. Res. 61, 274 - 287
22. AHNSTRÖM, G., ERIXON, K. (1973)  
Int. J. Radiat. Biol. 23, 285 - 289
23. AHNSTRÖM, G., EDVARDSSON, K.-A. (1974)  
Int. J. Radiat. Biol. 26, 493 - 497
24. BRITTEN, R.J., KOHNE, D.E. (1968)  
Science 161, 529 - 540
- 25 MELAMED, M.R., MULLANEY, P.F., MENDELSON, M.L. (1979)  
in: Flow Cytometry and Sorting, 243 - 261  
A Wiley Medical Publication, J. Wiley & Son  
New York, Chishester, Brisbane, Toronto
26. VAN ZEELAND, A.A., SIMONS, J.W.J.M. (1976)  
Mut. Res. 35, 129 - 138
27. THACKER, J., STRETCH, A., STEPHENS, M.A. (1977)  
Mut. Res. 42, 313 - 326
28. SHAW, E.J., HSIE, A.W. (1978)  
Mut. Res. 51, 237 - 254

29. SZYBALSKI, W., SZYBALSKI, E.H. (1962)  
U. Mich. Med. Bull. 28, 277 - 293
30. O'NEILL, J.P., BRIMER, P.A., MACHANOFF, R., HIRSCH, G.P.,  
HSIE, A.W. (1977)  
Mut. Res. 45, 91 - 101
31. MAKMAN, M.H. (1971)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2127 - 2130
32. KAKIUCHI, S., YAMAZAKI, R., TESHIMA, Y., UENISHI, K.,  
MIYAMOTO, E. (1975)  
Biochem. J. 146, 109 - 120
33. BHAT, S.V., BAJAWA, B.S., DORNAUER, H., DE SOUZA, N.J.  
(1977)  
Tetrahedron Lett. 19, 1669 - 1672
34. SEAMON, K.B., PADGETT, W., DALY, J.W. (1981)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3363 - 3367
35. SEAMON, K.B., DALY, J.W. (1981)  
J. Biol. Chem. 256, 9799 - 9801
36. JAKOBS, K.H., SAUR, W. SCHULTZ, G. (1976)  
J. Cyclic Nucleotide Res. 2, 381 - 392
37. CHAN, P.S., BLACK, C.T., WILLIAMS, B.J. (1970)  
Fed. Proc. 29, 616
38. WHITE, A.A., ZENSER, T.V. (1971)  
Anal. Biochem. 41, 372 - 396
39. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.C. (1951)  
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275
40. KIM, J.H., KIM, S.H., PEREZ, A.G., FRIED, J. (1973)  
Radiology 106, 447 - 449
41. BRADLEY, M.O., KOHN, K.W. (1979)  
Nucleic acids res. 7, 793 - 804
42. HSIE, A.W., O'NEILL, J.P., COUCH, D.B., SAN SEBASTIAN,  
J.R., BRIMER, P.A., MACHANOFF, R., FUSCOE, J.C.,  
RIDDLE, J.C., LI, A.P., FORBES, N.L., HSIE, M.H.,  
(1978)  
Rad. Res. 76, 471 - 492

43. DURAND, R.E., OLIVE, P.L. (1979)  
Rad. Res. 78, 50 - 60
44. DERTINGER: unveröffentlichte Ergebnisse
45. CORSARO, C.M., MIGEON, B.R. (1977)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4476 - 4480
46. PITTS, J.D., SIMONS, J.W. (1977)  
Exp. Cell Res. 104, 153 - 163
47. DE MELLO, W.C. (1977)  
Intercellular Communication, ed. De Mello  
Plenum Press; New York, London
48. UNWIN, P.N.T., ZAMPIGHI, G. (1980)  
Nature (London) 283, 545 - 549
49. ALTON, T.H., LODISH, H.F. (1977)  
Dev. Biol. 60, 180 - 206
50. ALTON, T.H., LODISH, H.F. (1977)  
Dev. Biol. 60, 207 - 216
51. CHUNG, St., LANDFEAR, S.H., BLUMBERG, D.D., COHEN, N.S.,  
LODISH, H.F. (1981)  
Cell 24, 785 - 797
52. AMSTERDAM, A., KNECHT, M., CATT, K.J. (1981)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3000 - 3004
53. PASTAN, J., JOHNSON, G.S., ANDERSON, W.B. (1975)  
Annu. Rev. Biochem. 44, 491 - 522
54. FRIEDMAN, D.C., JOHNSON, R.A., ZEILIG, C.E. (1976)  
in: Advances in Cyclic Nucleotides Research 7,  
69 - 114, eds. Greengard, R., Robinson, G.A.  
Raven Press New York
55. MANDATO, E., CATAPANO, R., AMBESI-IMPIOMBATO, F.S.,  
MACCHIA, V. (1981)  
Biochem. Biophys. Acta 676, 91 - 100
56. LAI, E., ROSEN, O.M., RUBIN, Ch.S. (1981)  
J. Biol. Chem. 256, 12866 - 12874
57. O'KEEFE, E., CUATRECASAS, P. (1974)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2500 - 2504

58. PROPOT, F., HAMPRECHT, B. (1981)  
J. Neurochem. 36, 580 - 588
59. BARBER, R., RAY, K.P., BUTCHER, R.W. (1980)  
J. Cyclic Nucl. Res. 6, 15 - 24
60. BELMAN, S., TROLL, W. (1974)  
Cancer Res. 34, 3446 - 3455
61. ENOMOTO, T., SASAKI, Y., SHIBA, Y., KANNO, Y., YAMASAKI  
H. (1981)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5628 - 5632
62. CHUNG, S., LANDFEAR, S.H., BLUMBERG, D.D., COHEN, N.S.,  
LODISH, H.F. (1981)  
Cell 24, 785 - 797
63. BANNAI, S., SHEPPARD, J.R. (1974)  
Nature (London) 250, 62 - 64
64. COQUERELLE, T., BOPP, A., KESSLER, B., HAGEN, U. (1973)  
Int. J. Radiat. Biol. 24, 397 - 404
65. KÖRNER, J.J., KOPP, J., MALZ, W. (1978)  
studia biophysica 68, 161 - 162
66. RAHMSDORF, H.J., PONTA, H., BÄCHLE, M., MALLICK, U.,  
WEIBEZAHN, K.F., HERRLICH, P. (1981)  
Exp. Cell Res. 136, 111 - 117
67. RADMAN, M. (1974) in:  
Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis  
128 - 142  
eds. Prokash, L., Sherman, F., Miller, M.,  
Lawrence, C., Tabor, H.W.  
Thomas Springfield Il.
68. LAVAL, F. (1980)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2702 - 2705
69. DURAND, R.E., OLIVE, P.L. (1979)  
Influence of Cell-Cell Interactions in Multi-  
cell V79 Spheroids on Cell Survival, DNA Repair,  
and Mutagenesis after Ionizing Radiation:  
Vortrag anlässlich II. Neubrandenburger Symposium:  
Zellschädigung und DNA-Reparatur 22.-26.10.1979

70. SIMONS, J.W.J.M. (1974)  
Mut. Res. 25, 219 - 227
71. KNAAP, A.G.A.G, SIMONS, J.W.J.M. (1975)  
Mut. Res. 30, 97 - 110
72. ZEELAND, A.A., SIMONS, J.W.J.M. (1976)  
Mut. Res. 34, 149 - 158
73. FOX , M. (1975)  
Mut. Res. 29, 449 - 466
74. OBERLEY, L.W., BUETTNER, G.R. (1979)  
Cancer Res. 39, 1141 - 1149

## 8. Anhang

### Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Adenylat-Cyclase:	ATP Pyrophosphat-Lyase (zyklisierend)
AG	: 8-Azaguanin
ATP	: Adenosintriphosphat
BSA	: Rinderserumalbumin
cpm	: counts per minute
cAMP	: Adenosin-3': 5'monophosphat
DMSO	: Dimethylsulfoxid
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylendiaminetetraacetat
EGTA	: Ethylenglykol-bis ( $\beta$ -Aminoethylether) N,N'-tetraacetat
FCS	: fötales Kälberserum
FMF	: Durchflußmikrofluorimetrie
GMP	: Guanosinmonophosphat
Gy	: Gray
HAT	: Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HPRT	: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Trans- ferase
IMP	: Inosinmonophosphat
LH	: Luteinisierendes Hormon
MEM	: Minimum Essential Medium
MI	: Mithramycin
MIX	: 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin
PE	: plating efficiency
PGE <sub>1</sub>	: Prostaglandin E <sub>1</sub>
PJ	: Propidiumjodid
SDS	: Natriumdodecylsulfat
TAA	: Triethanolamin
TCA	: Trichloressigsäure
TG	: 6-Thioguanin
TPA	: 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
Iris	: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	: Umdrehungen pro Minute