



Bundesministerium  
für Umwelt, Naturschutz  
und Reaktorsicherheit

# SCHRIFTENREIHE REAKTORSICHERHEIT UND STRAHLENSCHUTZ

**ANALYSE RÄUMLICH KORRELIERTER DNA-SCHÄDEN  
ZUR BESTIMMUNG DER RELATIVEN BIOLOGISCHEN  
WIRKSAMKEIT DICHT-IONISIERENDER STRAHLUNG**

**BMU - 2003-616**



WIR STEUERN UM AUF ERNEUERBARE ENERGIEN.

**BMU – 2003-616**

**Analyse räumlich korrelierter DNA-Schäden zur  
Bestimmung der relativen biologischen Wirksamkeit  
dicht-ionisierender Strahlung**

Dr. A. A. Friedl

P. Quicken

Prof. Dr. A. M. Kellerer

## **IMPRESSUM**

Dieser Band enthält einen Arbeitsbericht über ein vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit gefördertes Vorhaben. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Anhaben sowie der Beachtung privater Rechte Dritter. Der Eigentümer behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit Zustimmung des Bundesumweltministeriums zitiert, ganz oder teilweise vervielfältigt bzw. Dritten zugänglich gemacht werden.

Der Bericht wurde durch das Strahlenbiologische Institut der Ludwig-Maximilian-Universität, München, erstellt.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muß nicht mit der des Bundesumweltministeriums übereinstimmen.

### **Herausgeber:**

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit  
Arbeitsgruppe RS I 1

Postfach 12 06 29  
53048 Bonn

Erscheinungsjahr: 2003

## **Zusammenfassung**

Zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) nach dicht-ionisierender Strahlung wurde, basierend auf einem gemischten Poissonprozess, ein Simulationsansatz entwickelt. Ausgehend von verschiedenen Modellen zur Chromatinanordnung im Säuger-Zellkern und zur radialen Dosisverteilung wurde die lokale Dosis an einzelnen DNA-Segmenten gegebener Länge und die daraus resultierende DSB-Verteilung simuliert. Die nach Simulation an 10000 Zellkernen resultierende DNA-Mengenverteilung wurde durch Variation der angenommenen DSB-Häufigkeit pro DNA-Längeneinheit an experimentell bestimmte DNA-Mengenverteilungen angeglichen, was eine Bestimmung der jeweiligen DSB-Rate (pro Gy und pro DNA-Längeneinheit) ermöglichte. Somit konnten RBE-Werte für die DSB-Induktion nach Bestrahlungen mit Ionen im LET-Bereich von 2.1 – 14000 keV/μm bestimmt werden.

## **Abstract**

We developed a simulation method based on a mixed Poisson process to quantify DNA double-strand breaks induced by densely ionizing radiation. Assuming various models for the chromatin configuration in mammalian nuclei and for the radial distribution of dose, the local dose at given DNA-segments and the resulting distribution of DSB was simulated in each 10000 nuclei. By varying the DSB frequency (per DNA length unit) assumed in the simulations, the DNA mass distributions thus obtained were adjusted to experimentally determined distributions, thus allowing to determine DSB induction rates and RBEs for DSB induction after irradiations with ions in the LET range 2.1 – 14000 keV/μm

## **1 Übergeordnete Zielsetzung**

Die relative biologische Wirksamkeit dicht ionisierender Strahlung für Endpunkte wie Zellinaktivierung, Induktion von Chromosomenaberrationen etc. ist gegenüber der von locker ionisierender Strahlung deutlich erhöht. Als Ursache für diesen Effekt wird angenommen, dass durch dicht ionisierende Strahlung induzierte DNA-Schäden oft räumlich korreliert vorliegen und dass die Reparatur solcher korrelierten Schäden mit verringerter Effizienz erfolgt als die Reparatur nicht-korrelierter Schäden.

Der für die zellulären Auswirkungen der ionisierenden Strahlung hauptsächlich verantwortliche DNA-Schadenstypus ist der DNA-Doppelstrangbruch (DSB).

Überraschenderweise wurde bei den meisten der bisher durchgeführten Messungen eine geringere Häufigkeit induzierter DSB nach dicht ionisierender Bestrahlung als nach locker ionisierender Bestrahlung beobachtet. Ursache für diesen scheinbaren Widerspruch ist vermutlich, dass bei den bisher verwendeten Methoden zur DSB-Messung die Anzahl vorhandener Brüche unterschätzt wird, wenn, aufgrund der räumlichen Korrelation, sehr kleine DNA-Fragmente entstehen.

Ziel unseres Forschungsvorhabens ist die Entwicklung von Methoden zur DSB-Messung, die eine genauere Bestimmung der durch dicht ionisierende Strahlung verursachte DSB-Häufigkeit erlauben. Durch eine Kombination von experimenteller Bestimmung der Fragmentlängenverteilung und Modellierung erwarteter Verteilungen in Abhängigkeit von verschiedenen Modellen zur Trackstruktur und zur DNA-Konformation im Zellkern erhoffen wir zudem, die Validität der verschiedenen Modelle überprüfen zu können.

## **2 Einzelzielsetzungen**

### ***2.1 Experimentelle Methodik***

Um eine Analyse von DNA-Fragmentverteilungen über einen möglichst breiten Fragmentlängenbereich zu ermöglichen, soll eine Methodik etabliert werden, die auf Kombination verschiedener elektrophoretischer Verfahren beruht.

## **2.2 Bestrahlungen von menschlichen Zellen mit verschiedenen Strahlenarten und Messung der resultierenden DNA-Fragmentverteilungen**

Durch Bestrahlung mit Schwerionen unterschiedlicher Ionisationsdichte soll systematisch die Abhängigkeit vom LET untersucht werden. Die Bestrahlungen sollen hauptsächlich am senkrechten Strahlrohr des Physikdepartments, Garching, durchgeführt werden (für Ionen bis zur Ordnungszahl 8). Bestrahlungen mit extrem hohen LET-Werten sollen am Unilac der GSI, Darmstadt, durchgeführt werden, zudem soll der Forschungsreaktor Garching für Neutronenbestrahlungen genutzt werden.

## **2.3 Modellierung von DNA-Mengenverteilungen**

Eine Modellierung der erwarteten Verteilung der relativen DNA-Menge in Abhängigkeit von der Fragmentlänge unter Anwendung verschiedener Modelle zur räumlichen Verteilung von Ionisationsereignissen und nachfolgenden DSB, zur Häufigkeit der DSB, und zur Anordnung der DNA im Zellkern und ein Vergleich zwischen simulierten und experimentell erzeugten DNA-Verteilungen ermöglicht die Überprüfung der Validität der zugrundeliegenden Modelle.

## **3 Bisheriger Wissensstand und Notwendigkeit der durchgeführten Untersuchungen**

Dicht-ionisierende Strahlung ist deutlich effizienter in der Induktion von Zellabtötung, Mutationen und Zelltransformation als locker-ionisierende Strahlung, wobei die ermittelten RBE-Werte, abhängig vom Endpunkt und von der Strahlenqualität, im Bereich von 3 – 12 liegen. Eine mögliche Erklärung für diese erhöhte Wirksamkeit liegt in der verminderten Reparierbarkeit von DNA-Schäden, die durch dicht-ionisierende Strahlung induziert wurden, aufgrund einer erhöhten räumlichen Korrelation. So ist zu erwarten, dass dicht-ionisierende Strahlung vermehrt sogenannte lokal multipel geschädigte Regionen in der DNA verursacht, wobei nahe zueinander liegende DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) vermutlich besonders häufig nicht oder fehlerhaft repariert werden. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass dicht-ionisierende Strahlung auch effizienter in der Induktion von DSB ist als locker-ionisierende Strahlung. Allerdings ergaben die meisten der bisher zur Induktion von DSB durchgeführten Arbeiten RBE-Werte um oder unter 1 für diesen Endpunkt (Übersicht bei Prise et al. 1998). Eine Erklärung für diese Diskrepanz liegt darin, dass eine mögliche räumliche Korrelation von DSB nach dicht-ionisierender Bestrahlung nicht berücksichtigt wurde. So wurde bei den

meisten Untersuchungen nur für relative große ( $> 1$  Mbp) strahleninduzierte Fragmente eine Abschätzung ihrer relativen Anzahl oder ihrer mittleren Länge vorgenommen, wodurch kleine Fragmente, die durch räumlich korrelierte DSB entstehen, unberücksichtigt blieben. Die auf Grund dieser messbaren Parametern vorgenommene Bestimmung der DSB-Rate (pro Gy und pro bp) für das Gesamtgenom beruhte zudem meistens auf der Annahme einer zufälligen räumlichen Verteilung der DSB im Genom.

Mehrere Arbeiten der letzten Jahre zeigten deutlich, dass DSB nach dicht-ionisierender Bestrahlung nicht zufällig im Genom verteilt sind (Löbrich et al. 1996, Newmann et al. 1997, Kraxenberger et al. 1998). Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurde in neueren Arbeiten (Löbrich et al. 1996, Höglund et al. 2000, Höglund und Stenerlöw 2001, Belli et al. 2001) eine Methodik zur DSB-Messung verwendet, die darauf beruht, nach elektrophoretischer Auftrennung der genomischen DNA aus bestrahlten Zellen den relativen Anteil der Gesamt-DNA zu bestimmen, der innerhalb bestimmter Fragmentlängenbereichen vorliegt. Aus dem Anteil der DNA in jedem Größenfenster wurde dann die Häufigkeit von Fragmenten für jeden Größenbereich abgeschätzt und durch Summation über alle Größenfenster die DSB-Häufigkeit ermittelt. Mit dieser Methodik wurden nach Bestrahlungen mit Ionen (LET-Werte bis zu  $225 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) RBE-Werte für die DSB-Induktion größer 1 bestimmt, und es zeigte sich gegenüber der Referenzstrahlung eine deutliche Zunahme von kleineren Fragmenten (bis zu 1 Mbp). Ein Nachteil dieser Methodik liegt darin, dass die einzelnen Größenfenster recht groß gewählt werden müssen, wodurch sich nur eine recht geringe Auflösung ergibt.

Wir haben einen alternativen Ansatz gewählt, bei dem an experimentell ermittelte DNA-Fragmentverteilungen modellierte Verteilungen angepasst werden. Da davon ausgegangen werden kann, dass die durch korrelierte DSB induzierten Fragmentlängen von der strukturellen Organisation der Chromatinfasern im Interphasekern, z.B. in Schleifen oder Rosetten, beeinflusst werden, gehen in die Modellierung verschiedene Zellkern-Modelle ein. Zudem gehen in die Modellierung verschiedene Modelle zur radialen Dosisverteilung ein, mit deren Hilfe die an spezifischen Chromatinsegmenten herrschende lokale Dosis bestimmt wird. Die Anpassung der modellierten DNA-Fragmentverteilungen an die experimentellen Verteilungen beruht auf der Variation eines freien Parameters, nämlich der globalen DSB-Häufigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst getestet, welchen Einfluss die verschiedenen Modelle für Trackstruktur und Chromatinstruktur auf das

Modellierungsergebnis haben, um dann mittels der bestgeeigneten Modelle die DSB-Häufigkeit nach Bestrahlung und somit den RBE-Wert zu bestimmen.

#### 4 Voraussetzungen für die Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden am senkrechten Strahlrohr der TU München in Garching Bestrahlungsexperimente mit Ionen bis zu Sauerstoff durchgeführt (sh. Tabelle 1). Für jede Strahlenqualität wurden mindestens zwei unabhängige Bestrahlungsexperimente mit jeweils mehreren Dosen durchgeführt. Bestrahlt wurden V79-Hamsterfibroblasten und menschliche VH25-Fibroblasten. Kontrollbestrahlungen mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung erfolgten im GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit. Ursprünglich geplante Bestrahlungen mit Schwerionen konnten wegen ungenügender Strahlzeit am Unilac der GSI-Gesellschaft für Schwerionenforschung nicht durchgeführt werden; stattdessen wurden experimentell ermittelte DNA-Fragmentverteilungen aus früheren Bestrahlungen von V79-Zellen mit Ca- und U-Ionen (Kraxenberger et al. 1998) in die Analysen mitaufgenommen (Tabelle 2).

Teilchenart	LET in keV/ $\mu\text{m}$	kin. Energie in MeV/u	V 79	VH 25
Protonen ( $^1\text{H}^{1+}$ )	2.1	20.9	X	X
Helium ( $^4\text{He}^{2+}$ )	21	8.375	X	X
Kohlenstoff ( $^{12}\text{C}^{6+}$ )	251	5.9	X	X
Sauerstoff ( $^{16}\text{O}^{8+}$ )	520	4.1	X	X

Tabelle 1: Verwendete Ionensorten am senkrechten Strahlrohr des Tandembeschleunigers der TU/LMU München

Teilchenart	LET in keV/ $\mu\text{m}$	kin. Energie in MeV/u
Calcium	2100	6.9
Uran	14000	9

Tabelle 2: Verwendete Ionensorten am Unilac der GSI

Für die Zellkern-Modellierungen wurden entsprechende Daten von G. Kreth, Arbeitsgruppe C. Cremer, Kirchhoff-Institut für Physik der Universität Heidelberg, T. Knoch, Arbeitsgruppe J. Langowski, DKFZ, Heidelberg und W. Friedland, GSF-Institut für Strahlenphysik,

Neuherberg, zur Verfügung gestellt. Die sehr rechenintensiven Simulationen erfolgten auf verschiedenen Rechnern der Sektion Physik der LMU München.

## **5 Methoden**

### **5.1 Zellkultivierung und Bestrahlungsbedingungen**

Im Rahmen des vorgestellten Projektes wurden menschliche VH25-Hautfibroblasten und V79-Fibroblasten des Chinesischen Hamsters verwendet. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und für die Bestrahlungsexperimente in speziellen Petrischalen ausgesät, die aus einem Glasring und einem Boden aus 2 µm dickem Hostafan bestehen. Während der Bestrahlung lagen die adhärent wachsenden Fibroblasten als subkonfluentes Monolayer auf der Hostafan-Folie vor. Der Durchmesser dieser Schalen wurde an die Verhältnisse am senkrechten Strahlrohr des Tandembeschleunigers der TU/LMU München angepasst, um größtmögliche Homogenität des Bestrahlungsfeldes zu gewährleisten. Kontrollmessungen ergaben eine maximale Inhomogenität des Bestrahlungsfeldes von 4 %. Nach der Bestrahlung und bis zur Isolierung der genomischen DNA wurden die Zellen auf Eis gehalten, um Reparaturvorgänge zu inhibieren.

Ionisierende Strahlung induziert Doppelstrangbrüche (DSB) und somit eine Fragmentierung der genomischen DNA der bestrahlten Zellen. Die daraus resultierende Verteilung der DNA-Menge in Fragmenten bestimmter Länge wird DNA-Mengenverteilung genannt. Sie hängt von der Häufigkeit und Lokalisierung der DSB auf den chromosomalen Molekülen ab. Voraussetzung für eine experimentelle Bestimmung der DNA-Mengenverteilung ist eine Auftrennung der DNA-Fragmente nach Moleküllänge. Hierzu kann man gelelektrophoretische Methoden benutzen.

### **5.2 Analyse hochmolekularer DNA im ZIFE-Gel**

Die ZIFE (zero integrated field)-Elektrophorese ist ein Subtypus der „field inversion“ Gelelektrophorese (FIGE), bei der die alternierenden elektrischen Felder im 180° Winkel zueinander stehen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein ZIFE-System der Firma Q-Life Systems (Ontario, Kanada) eingesetzt, wobei die Laufbedingungen für eine optimale Auftrennung im Moleküllängenbereich zwischen 50 kbp und 8 Mbp durch eine ROM-Karte

festgelegt sind, die vom Hersteller zur Verfügung gestellt wurde. Die Gesamtlaufzeit für diese Auftrennung beträgt 127 Stunden.

Damit bestrahlungsbedingte DNA-Fragmente im Größenbereich bis 8 Mbp verlässlich detektiert werden können, ist eine schonende DNA-Isolierung nötig, die die Gefahr präparationsbedingter Brüche minimiert. Dies lässt sich erreichen, indem die Zellen vor der DNA-Präparation in LMP-Agarose eingebettet werden. Zelllyse und Degradierung zellulärer Proteine finden dann innerhalb von Agaroseblöckchen statt, wodurch Scherkräfte vermieden werden (Friedl et al. 1995). Nach der Präparation werden die Blöckchen, die hochmolekulare DNA enthalten, direkt in die Taschen eines Agarosegels eingesetzt und der Elektrophorese unterworfen. Abbildung 1 zeigt ein ZIFE-Gel, in dem Proben von gamma- und protonenbestrahlten V79-Zellen aufgetrennt wurden. In Proben unbestrahlter Zellen (Spur 15 in Abbildung 1) zeigt sich nach Färbung der DNA mit Ethidiumbromid kein Signal, was zeigt, dass der Einfluss spontaner und präparationsbedingter Fragmentierung im untersuchten Moleküllängenbereich vernachlässigbar ist.

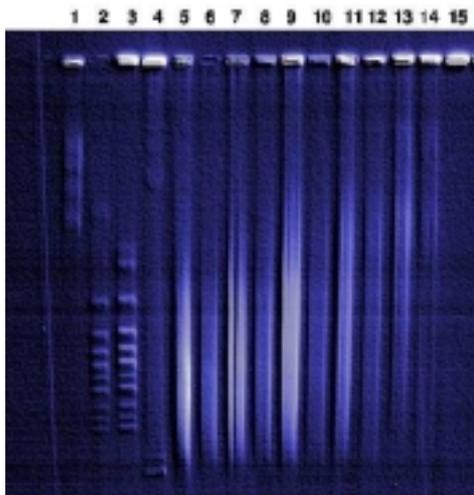


Abbildung 1: ZIFE-Gel von Gamma- und Protonen-bestrahlten V79 Zellen Die Protonenbestrahlung wurde mit 21 MeV/u und einem LET von 2.1 MeV/ $\mu$ m durchgeführt. Die Dosen wurden zwischen 500 Gy und 0 Gy in 100 Gy Schritten variiert. Die Proben der Protonenbestrahlung befinden sich auf den Spuren 5 (500 Gy), 7 (400 Gy), 9 (300 Gy), 11 (200 Gy), 13 (100 Gy) und 15 (0 Gy). Die Proben der gammabestrahlten Zellen liegen auf Spuren 6 (500 Gy), 8 (400 Gy), 10 (300 Gy), 12 (200 Gy) und 14 (100 Gy). In den Spuren 1 (*S. pombe*), 2 (*S. cerevisiae*), 3 (*S. cerevisiae*), und 4 ( $\lambda$ -Concatemere) sind DNA-Längenstandards aufgetragen.

Für beide Strahlenqualitäten ist deutlich die Abnahme der mittleren Länge der DNA-Fragmente mit der applizierten Dosis zu erkennen. Um eine spätere Kalibrierung des Verhältnisses zwischen Moleküllänge und Migrationsdistanz im Gel zu ermöglichen (sh.

Abschnitt 5.4), wurden bei allen ZIFE-Auftrennungen auch Moleküllängenstandards aufgetragen (sh. Spuren 1-4 in Abbildung 1). Zur Anwendung kamen Multimere der DNA des  $\lambda$ -Phagen, die durch Anlagerung der kohäsiven Termini der Phagen-DNA aneinander entstanden sind. Dabei entsteht eine Leiter aus Vielfachen der Einheitslänge der Phagen-DNA (48.5 kbp; sh. Spur 4). Ebenfalls verwendet wurde chromosomale DNA der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, mit der sich der Längenbereich zwischen 230 kbp und 2.2 Mbp abdecken lässt (sh. Spuren 2 und 3). Zur Kalibrierung größerer Moleküle wurde schließlich chromosomale DNA der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* eingesetzt, deren Chromosomenlängen etwa 3.5, 4.6 und 5.7 Mbp betragen (sh. Spur 1).

Wie in Abbildung 1 ersichtlich, sind in den Proben bestrahlter V79-Zellen selbst nach sehr hohen Dosen kaum DNA-Moleküle einer Länge kleiner als 48.5 kbp sichtbar (z.B. Spuren 5 und 6, 500 Gy). Ursache hierfür ist vermutlich, dass kleine DNA-Fragmente während der Präparation im Agaroseblöckchen durch Diffusionsprozesse verloren werden. Es musste daher nach einer Möglichkeit gesucht werden, auch kürzere DNA-Fragmente in die Analyse aufzunehmen.

### **5.3 Analyse niedermolekularer DNA im CHEF Gel**

Durch Präparation genomischer DNA mittels Phenolextraktion und anschließender Ethanol-fällung sind auch Fragmente einer Länge kleiner als 48.5 kbp isolierbar, was eine Analyse strahleninduzierter Fragmente in diesem Größenbereich ermöglichen sollte. Allerdings besteht bei dieser Methode die Gefahr einer präparationsbedingten Fragmentierung der DNA infolge auftretender Scherkräfte. Um das Ausmaß der präparationsbedingten Fragmentierung zu testen, wurde DNA aus unbestrahlten und bestrahlten V79-Zellen durch Phenolextraktion gewonnen und mittels CHEF (contour clamped homogeneous field)-Elektrophorese aufgetrennt. Dabei wurden Bedingungen gewählt, die zu einer optimalen Auftrennung im Größenbereich zwischen 5 und 75 kbp führen. Spur 10 in Abbildung 2 zeigt, dass nach Auftrennung von genomischer DNA aus unbestrahlten Zellen nur Fragmente in der sogenannten Kompressionszone des Gels nachweisbar sind, die oberhalb der Bande von 48.5 kbp langen Standardmolekülen lokalisiert ist. Der Einfluss präparationsbedingter Fragmentierung im untersuchten Größenbereich (5 – 48.5 kbp) wird daher als vernachlässigbar angesehen.

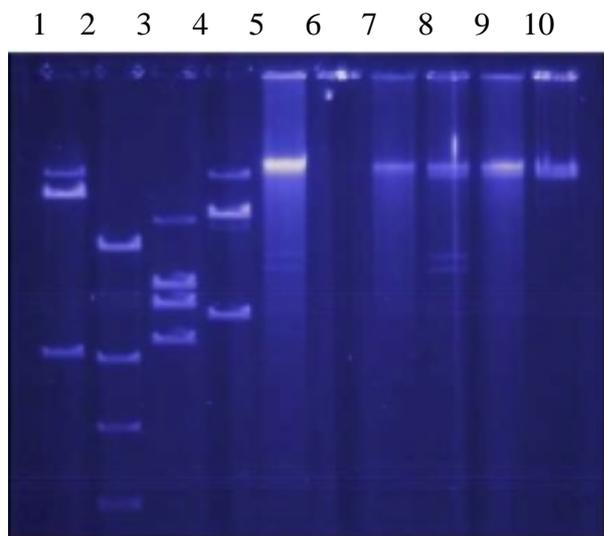


Abbildung 2: CHEF-Gel von V79 Zellen, die mit 21 MeV/u Protonen (LET 2.1 MeV/ $\mu\text{m}$ ) bestrahlt wurden. Die Dosen variieren in 100 Gy-Schritten zwischen 500 Gy (Spur 5) und 0 Gy (Spur 10). Spur 6 (400 Gy Protonen) zeigt aufgrund eines Fehlers bei der Präparation kein Signal; Spur 8 enthält einen DNA-Mengenstandard (sh. Abschnitt 5.5). Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Größenstandards diente kommerziell erhältliche DNA des  $\lambda$ -Phagen. Durch Auffüllen der kohäsiven Termini und nachfolgendem Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen war es möglich, Standards der folgenden Längen herzustellen: *ApaI*-Verdau: 10.1 kb und 38.4 kb (Spur 1); *MluI*-Verdau: 2.2/2.4 kb Doppelbande, 5.1 kb, 9.8 kb, 26.3 kb (Spur 2); *Eco52I*-Verdau: 11.8, 16.7 und 19.9 kb (Spur 3); *SalI*-Verdau: 15.3 und 33.0 kb (Spur 4). Die oberste Bande in Spuren 1 und 4 entspricht unverdauter Phagen-DNA (48.5 kb).

Um auch nach Auftrennung im CHEF-Gel eine Kalibrierung zwischen Moleküllänge und Migrationsdistanz zu ermöglichen, mussten durch Restriktionsverdau von  $\lambda$ -Phagen-DNA und Ligation von Restriktionsfragmenten spezielle DNA-Längenstandards hergestellt werden. Diese Längenstandards umfassen einen Bereich von 0.5 bis 48.5 kbp; ihre Herstellung ist in der Legende zu Abbildung 2 beschrieben.

#### **5.4 Färbung der Gele, Datenerfassung und Transformation der gemessenen Fluoreszenzspektren**

Die Gele wurden nach der Elektrophorese unter standardisierten Bedingungen (Kraxenberger et al. 1994) mit Ethidiumbromid gefärbt und die Fluoreszenzintensität,  $f$ , an jeder Pixelposition  $x$  (für  $x_{\min} \leq x \leq x_{\max}$ ) entlang der Migrationsstrecke in den einzelnen Spuren wurde unter UV-Anregung mittels einer CCD-Kamera vermessen. Unter diesen Bedingungen ist die Fluoreszenzverteilung,  $f(x)$ , proportional zur Verteilung der relativen DNA-Menge,  $m(x)$ .

Die aus  $m(x)$  resultierende Summenverteilung,  $M(x)$ , berechnet sich aus

$$M(x) = \sum_{x_{\min}}^x m(x) = k \sum_{x_{\min}}^x f(x) \quad (1)$$

wobei die Normierungskonstante  $k$  so gewählt ist, dass  $M(x_{\max}) = 1$ .

Die Einführung der Summenverteilung erleichtert die Transformation der beobachteten Verteilung der relativen DNA-Menge gegen Migrationsdistanz in eine Verteilung der relativen DNA-Menge gegen Fragmentlänge,  $l$ , da gilt:

$$M(x) = M(x(l)) = M(l) \quad (2)$$

Dabei spiegelt die Funktion  $x(l)$  die Beziehung zwischen Moleküllänge und Migrationsdistanz wider. Diese hängt von einer Vielzahl von Parametern ab, die zum Teil experimentellen Variationen unterliegen können. Daher muss die Funktion  $x(l)$  für jedes analysierte Gel individuell bestimmt werden, indem mit Hilfe der Moleküllängenstandards Kalibrierungskurven erstellt werden. Als Stützstellen dienten die bekannten Längen der Moleküle in den Banden der DNA-Längenstandards und die jeweiligen Migrationsdistanzen dieser Banden. Zwischen diesen Stützstellen wurde mittels exponentieller Splines interpoliert (Kraxenberger et al. 1994).

Um die Übereinstimmung von gemessenen und anhand von Modellierungen berechneten DNA-Mengenverteilungen zu bestimmen, wurde im allgemeinen nach numerischer Differenzierung von  $M(l)$  die differentielle DNA-Mengenverteilung,  $m(l)$ , aufgetragen. Für einige Analysemethoden ist aber eine Darstellung der Profile in Einheiten von DNA-Menge pro logarithmischem Einheitsintervall von Vorteil. Die Darstellung der Dichteverteilung der DNA-Menge in Bezug auf den Logarithmus der Fragmentlänge entspricht einer Transformation der Funktion  $m(l)$  auf eine neue Funktion  $\mu(\lambda)$ , wobei  $\lambda = \ln(l)$ . Damit erhält man

$$\mu(\lambda) = \mu(\lambda(l)) = \frac{d(M(\lambda(l)))}{d\lambda(l)} = \frac{d(M(l))}{d(\ln(l))} = l \times m(l) \quad (4)$$

## **5.5 Kombination von ZIFE- und CHEF-Auftrennung zur Erweiterung des Messbereiches**

In dieser Arbeit sollten die nach Bestrahlung erhaltenen Verteilungen der DNA-Menge in Fragmenten der Längen 5 kbp-5 Mbp analysiert werden. Dieser Längenbereich lässt sich wegen experimenteller Limitierungen nicht durch einen einzigen Gellauf abdecken. Es sollte daher versucht werden, durch Kombination der Ergebnisse aus der ZIFE- und der CHEF-Auftrennung ein Gesamtspektrum im genannten Größenbereich zu erstellen. Dabei sind die jeweiligen Auftrennungsbereiche so gewählt, dass sie sich überlappen. Voraussetzung für die Kombination ist die Kenntnis der jeweils vorhandenen DNA-Mengen. Um diese zu gewährleisten, wurde experimentell wie folgt vorgegangen: Die als Monolayer bestrahlten Zellen wurden geerntet und in zwei Portionen mit gleichem Zelltitert geteilt. Jeder Portion wurde eine bekannte Menge an DNA-Mengenstandard zugefügt, bevor die genomische DNA präpariert wurde. Eine Hälfte der Probe wurde für die spätere Auftrennung durch CHEF-Elektrophorese einer Phenolextraktion unterzogen. Als Mengenstandard diente hier  $\lambda$ -Phagen-DNA, die mit *XhoI* verdaut wurde, wodurch zwei Fragmente der Längen 24,0 und 24,5 kbp entstehen (sh. Abb. 2, Spur 8). Die zweite Hälfte der Probe wurde für die Isolierung der hochmolekularen DNA mit LMP-Agaroselösung vermischt, wobei intakte  $\lambda$ -Phagen-DNA (nach Auffüllen der Enden zur Vermeidung von Multimere-Bildung) zugegeben wurde. Im späteren ZIFE-Gel führt dies zu einer distinkten Bande mit einer Moleküllänge von 48.5 kbp.

Die vor der Präparation zugegebene Fremd-DNA führt zu künstlichen Peaks in den jeweiligen Fluoreszenzintensitätsspektren nach elektrophoretischer Auftrennung. Der Flächeninhalt dieser Peaks dient zur Normierung der mit unterschiedlichen Gelsystemen erhaltenen Fluoreszenzverteilungen und damit zur Kopplung dieser Verteilungen. Abbildung 3 zeigt, dass sich der angenommene Kurvenverlauf im Bereich der künstlichen Peaks durch Interpolation mit einem Polynom annähern lässt. Die Fläche des Peaks oberhalb der Interpolationskurve wurde als Maß für die absolute Normierung der Menge an genomischer DNA in der entsprechenden Gelspur verwendet.

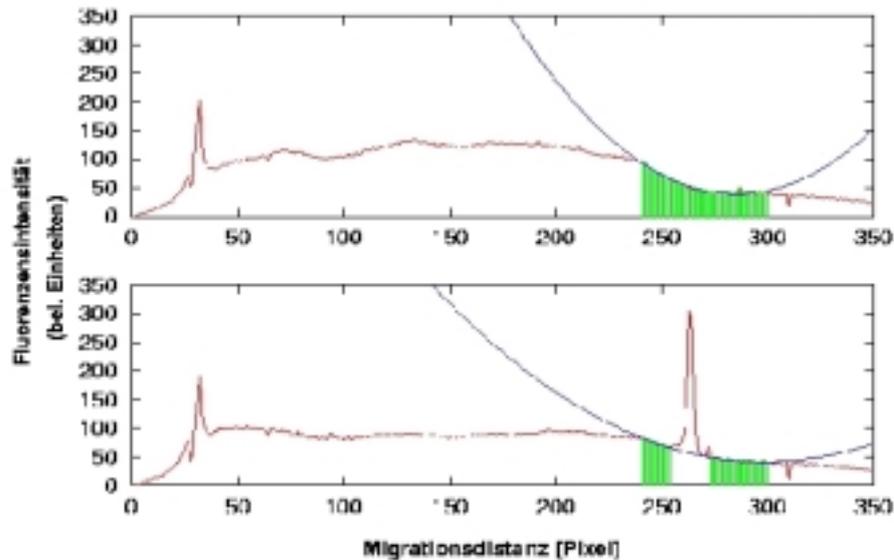


Abbildung 3: Gemessene Profile (rot) zweier unabhängiger Bestrahlungen von VH25 Zellen mit 400 Gy Kohlenstoff. Der grün unterlegte Bereich wurde zur Interpolation der Verlaufes der Spur verwendet; er läßt sich durch ein Polynom 4. Grades (blau) nähern. Im oberen Teil des Diagramms wurde eine Probe vermessen, der keine Fremd-DNA zur Kalibrierung hinzugefügt wurde, im unteren Teil eine Probe mit einer definierten Menge an  $\lambda$ -Phagen-DNA.

Vor der weitergehenden Analyse der Fluoreszenzverteilungen müssen diese künstlichen Peaks wieder aus den Profilen entfernt werden. Die resultierenden Fluoreszenzverteilungen wurden dann, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, in Verteilungen von DNA-Menge gegen Moleküllänge transformiert. Dann wurden, nach entsprechender Normierung der jeweiligen DNA-Mengen, zusammengehörige DNA-Mengenverteilungen, wie sie nach Auftrennung im CHEF bzw. ZIFE-Gel erhalten wurden, kombiniert. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 4 gezeigt. Um keine Artefakte einzuführen, wurde darauf verzichtet, die nach Entfernung der Peaks vorhandene Lücke in der Verteilung  $m(l)$  für  $5 \text{ kbp} < l < 5 \text{ Mbp}$  durch Interpolationen zu schließen.

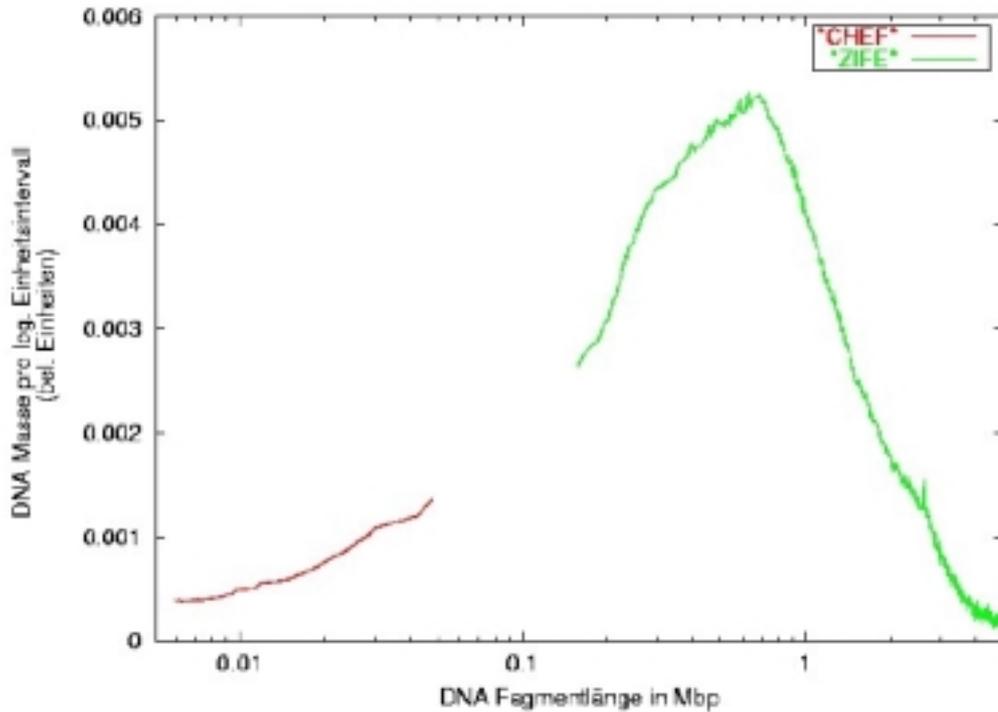


Abbildung 4: Kombination der Messergebnisse einer Bestrahlung von VH25 Zellen mit 5.9 MeV/u Kohlenstoffionen mit einem LET von 251 KeV/μm. Die Messbereiche aus CHEF und ZIFE-Gelen wurden über den im Text beschriebenen Algorithmus zusammengefügt. Die Lücken in dem Profil erklären sich aus den Bereichen, in die zusätzliche DNA als Mengenstandard eingefügt wurden; diese Bereiche werden bei der Auswertung der experimentellen Ergebnisse nicht in Betracht gezogen.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Nachweis der Nichtzufälligkeit der DSB-Verteilung nach Ionenbestrahlung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Häufigkeit von DSB und deren räumliche Verteilung durch eine Analyse der nach Bestrahlung beobachteten DNA-Mengenverteilung zu ermitteln. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde versucht, verschiedene theoretische Modelle den experimentellen Daten anzupassen. Ein bisher von verschiedenen Autoren genutztes theoretisches Modell zur Beschreibung strahleninduzierter DSB ist das Random Breakage Modell (RBM). Innerhalb des RBM wird jedes DNA-Molekül als Kette definierter Länge betrachtet. Die Wahrscheinlichkeit  $\alpha$  für einen Bruch zwischen zwei Kettengliedern wird als konstant innerhalb des gesamten Genoms angenommen. Die Wahrscheinlichkeit für einen Bruch ist daher unabhängig vom Ort des Bruches und vom Ort vorangegangener oder folgender Brüche. Für ein chromosomales Molekül der Länge  $L$  ergibt sich der relative Anteil der DNA-Menge, der in Fragmenten mit einer Länge kleiner  $l$  enthalten ist, aus

$$\tilde{M}(l) = 1 - e^{-\alpha l} \left(1 + \alpha l \left(1 - \frac{l}{L}\right)\right) \quad (5)$$

Wenn die Länge  $L$  der intakten chromosomalen Moleküle sehr viel größer ist als die zu analysierenden Fragmente, ist es nicht nötig, die einzelnen Chromosomen mit ihren unterschiedlichen Längen einzeln zu betrachten. Zur Bestimmung von  $\tilde{M}(l)$  kann stattdessen die durchschnittliche Chromosomenlänge herangezogen werden (Friedl 1994). Diese beträgt bei den menschliche VH25-Zellen 130 Mbp und bei V79-Hamsterzellen 240 Mbp.

Das RBM ist für eine Beschreibung der DNA-Mengenverteilung nach Bestrahlung mit locker ionisierender Strahlung gut geeignet (Kraxenberger et al. 1994, Friedl et al. 1995). Das heisst, durch Variation der angenommenen Bruchhäufigkeit,  $\alpha$ , läßt sich eine Verteilung  $\tilde{M}(l)$  (bzw. die daraus resultierende differentielle Verteilung  $\tilde{m}(l)$ ) bestimmen, die gut mit der experimentell beobachteten DNA-Mengenverteilung  $M(l)$  (bzw.  $m(l)$ ), übereinstimmt. Die Güte der Übereinstimmung wird dabei durch eine *Least Square*-Prozedur ermittelt.

Wird nun die Voraussetzung einer konstanten Bruchwahrscheinlichkeit  $\alpha$  für jeden Ort des Genoms verletzt, wie es nach Bestrahlung mit dicht ionisierender Strahlung zu erwarten ist, lassen sich die experimentell ermittelten DNA-Mengenverteilungen nicht mehr durch das RBM beschreiben. So konnten z.B. Kraxenberger und Mitautoren (1998) zeigen, dass DNA-Mengenverteilungen nach Bestrahlung mit beschleunigten Schwerionen (Ca, U) mit extrem hohem LET nicht mit den Vorhersagen des RBM vereinbar sind. Ursache hierfür ist die mit zunehmendem LET zunehmende Ungleichverteilung der Energiedeposition im Zellkern, die zu räumlich korrelierten DSB führt. Ein erster Schritt bei der Analyse von DNA-Mengenprofilen nach Bestrahlung mit Hoch-LET-Strahlung ist es, die Abweichungen von den Vorhersagen des RBM zu bestimmen.

Für eine Analyse der Abweichung experimenteller Daten von den Vorhersagen des RBM ist eine Darstellung der DNA-Menge pro logarithmischen Einheitsintervall (sh. Abschnitt 5.4) besonders geeignet, da bei einer Zufallsverteilung der Brüche Breite und Form der Funktion  $\mu(\lambda)$  unabhängig von der Bruchhäufigkeit sind. Abbildung 5 zeigt Beispiele für experimentell beobachtete DNA-Mengenverteilungen pro logarithmischem Einheitsintervall nach Bestrahlung von V79-Zellen mit Protonen, Heliumkernen, Kohlenstoff- und Sauerstoffionen bei einer Dosis von jeweils 400 Gy. Um Interpolationsartefakte zu vermeiden, wurde der

Auswertebereich auf maximal 3 Mbp festgelegt, da die Anzahl von Stützstellen für die Erstellung der Kalibrierungskurven im Längenbereich über 2 Mbp sehr beschränkt ist.

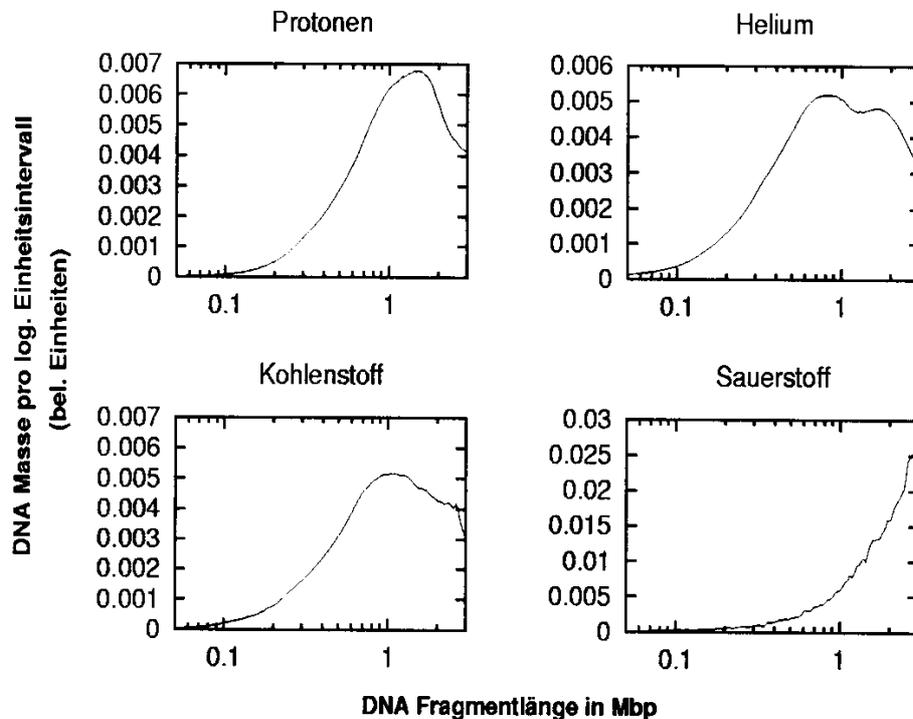


Abbildung 5: Gemessene DNA-Mengenverteilungen nach Bestrahlung mit 400 Gy (Protonen, Kohlenstoff, Helium, Sauerstoff), aufgetragen als DNA-Menge pro logarithmischem Einheitsintervall.

Abbildung 5 zeigt, dass bei den gewählten Bestrahlungsdosen nicht die gesamte DNA innerhalb des Auswertebereichs liegt. Nach Bestrahlung mit Sauerstoffionen liegt auch das Verteilungsmaximum außerhalb des Auswertebereichs. Dies weist darauf hin, dass nach Sauerstoffbestrahlung ein großer Teil der DNA-Moleküle in der Probe nur gering fragmentiert ist. Ursache hierfür ist vermutlich die geringe Eindringtiefe von 90  $\mu\text{m}$  in Wasser bei der verwendeten Strahlenqualität (4.1 MeV/u Sauerstoff und LET von 518 keV/ $\mu\text{m}$ ). Durch das Energiestraggeling der Ionen kann es bei einer solchen kurzen Reichweite zu größeren Abweichungen kommen, und die Voraussetzung, dass die Zellkerne innerhalb der Plateuregion des *Bragg Peaks* liegen sollen, wird verletzt. Dies führt zu Variationen im LET beim Durchgang durch die Zellen um den Faktor 2, während bei den anderen hier verwendeten Strahlenarten der LET beim Zelldurchgang nur um einige Prozent variiert.

Generell kann man folgern, dass am senkrechten Strahlrohr Bestrahlungen von Zellen mit LET-Werten größer als etwa 500 keV/μm aufgrund der zu geringen Eindringtiefen in das zu bestrahlende Medium nicht sinnvoll sind.

Die in Abbildung 5 gezeigten experimentell beobachteten Verteilungen  $\mu(\lambda)$  der einzelnen Bestrahlungsexperimente wurden mit den Vorhersagen, wie sie sich aus dem RBM ergeben, verglichen. Dazu wurde, für verschiedene Werte für die genomische Bruchhäufigkeit  $\alpha$ , die Funktion  $\tilde{M}(l)$  (Gleichung 5) durch numerische Differenzierung in  $\tilde{m}(l)$  überführt und sodann auf  $\tilde{\mu}(\lambda)$  transformiert. Diese berechneten Verteilungen wurden mittels einer *Least Square*-Prozedur unter der Nebenbedingung, dass beide Flächen gleich normiert sind, an die beobachteten DNA-Mengenverteilungen durch Variation von  $\alpha$  angepasst, bis die optimale Übereinstimmung erreicht war. In Abbildung 6 sind die entsprechenden Profile gezeigt.

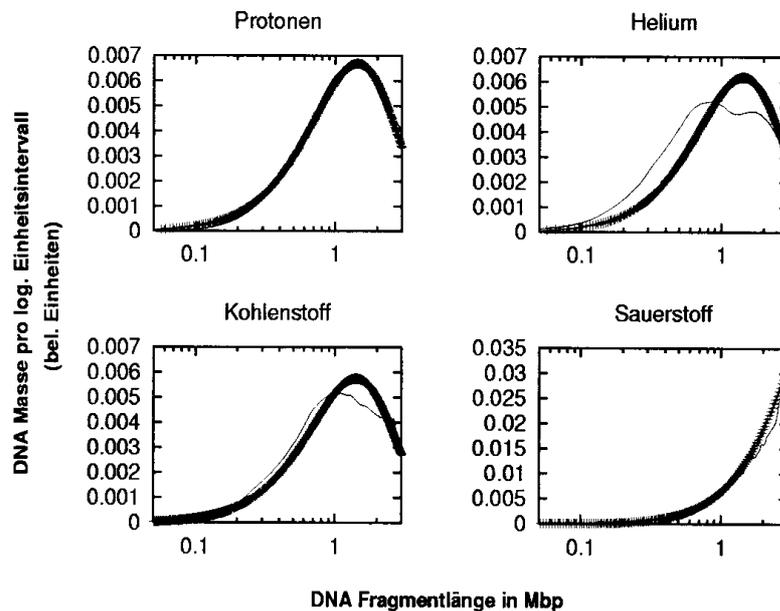


Abbildung 6: Vergleich der in Abb. 5 gezeigten gemessenen Profilen (dünne Linie) mit den bestangepassten berechneten DNA-Mengenverteilungen pro logarithmischem Einheitsintervall bei Verwendung des RBM (dick).

Während die Übereinstimmung nach Protonenbestrahlung recht gut ist, ergeben sich nach Bestrahlung mit Helium-, Kohlenstoff- und Sauerstoffionen deutliche Abweichungen, die bei

anderen Bestrahlungsdosen und in unabhängigen Bestrahlungsexperimenten reproduzierbar sind.

Man kann folgern, dass die DNA-Mengenverteilung, wie sie aus Bestrahlung mit 2.1 keV/μm Protonen resultiert, in ähnlich guter Weise mit dem RBM beschreibbar ist wie die Verteilung nach <sup>60</sup>Co-gamma-Strahlung. Durch das niedrige LET und der relativ hohen kinetischen Energie der Protonen von 21 MeV/u ergeben sich bei Dosen von mehreren 100 Gy kaum Schwankungen der absorbierten Energie innerhalb eines Zellkerns. Im Gegensatz dazu führen Bestrahlungen mit höherem LET zu Abweichungen der gemessenen DNA-Mengenverteilungen von den Vorhersagen des RBM. Wie in Abbildung 6 zu erkennen, sind die gemessenen DNA-Mengenverteilungen im Vergleich zu den berechneten Verteilungen im Bereich der kleinen Fragmente (< etwa 200 kbp) und im Bereich großer Fragmente (> 2 Mbp) verbreitert. Aufgrund der Flächennormierung der Verteilungen ergibt sich daraus, dass die Menge von Fragmenten im Größenbereich von etwa 1 Mbp in den gemessenen Verteilungen niedriger ist, als bei den berechneten Verteilungen. Um die hier beschriebenen qualitativen Abweichungen zwischen gemessenen und auf der Grundlage des RBM modellierten Verteilungen zu quantifizieren, wurden für die in Abbildung 6 dargestellten Profile exemplarisch die Verteilungsmomente bestimmt.

Ion	LET (keV/μm)	$\sigma_{gemessen}^2$	$\sigma_{RBM}^2$	$\Delta\sigma^2$
Proton	2.1	0.552	0.562	-0.01
Helium	21	0.624	0.578	0.046
Kohlenstoff	251	0.664	0.617	0.047
Sauerstoff	518	0.943	0.646	0.297

Tabelle 3: Varianzen, ( $\sigma_{gemessen}^2$ ), der in Abbildung 5 dargestellten beobachteten DNA-Mengenverteilungen pro logarithmischem Einheitsintervall,  $\mu(\lambda)$ , und Varianzen, ( $\sigma_{RBM}^2$ ), der auf Basis des RBM bestangepassten berechneten Verteilung,  $\tilde{\mu}(\lambda)$ .  $\Delta\sigma^2 = \sigma_{gemessen}^2 - \sigma_{RBM}^2$ .

Tabelle 3 zeigt, wie erwartet, eine Zunahme der Varianz der gemessenen DNA-Mengenverteilungen in Abhängigkeit vom LET. Zum Vergleich sind die Varianzen der zugehörigen theoretischen Verteilungen auf Basis des RBM ebenfalls gezeigt. Diese sollte, wie oben erwähnt, unabhängig vom zugrundeliegenden Wert für die Bruchhäufigkeit  $\alpha$  konstant sein. Die dennoch zu beobachtende Streuung der Varianzen der theoretischen Verteilungen lassen sich dadurch erklären, dass die Verteilungen anhand unterschiedlicher

Anzahlen von Rasterpunkten berechnet wurden. Als Maß für die Abweichung zwischen gemessenen und berechneten Profilen wurde daher der Differenzbetrag  $\Delta\sigma^2$  gewählt. Es zeigt sich, dass die DNA-Mengenverteilung nach Protonenbestrahlung gut mit Hilfe des RBM beschreibbar ist, während sich für Helium-, Kohlenstoff- und Sauerstoffionen deutliche Abweichungen ergeben.

Im Falle einer guten Übereinstimmung zwischen gemessenen DNA-Mengenverteilungen und Modellierungen auf Grundlage des RBM kann durch Ermittlung desjenigen Wertes für  $\alpha$ , der zur besten Übereinstimmung führt, die Bruchhäufigkeit pro DNA-Längeneinheit bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der applizierten Dosis kann dann die Bruchrate pro Gy und pro DNA-Längeneinheit ermittelt werden. Für die Protonenstrahlung scheint eine solche Ermittlung der Bruchrate wegen der guten Übereinstimmung mit den Vorhersagen des RBM legitim. Durch Auswertung von 17 Gelen aus 4 unabhängigen Bestrahlungsversuchen, jeweils mit mehreren unterschiedlichen Dosen, wurde eine Bruchrate nach Protonenbestrahlung von  $5.0 \pm 1.0$  DSB Gbp<sup>-1</sup> Gy<sup>-1</sup> bestimmt. Im Vergleich dazu wurde nach <sup>60</sup>Co- $\gamma$ -Bestrahlung (4 Experimente, 19 Gele) eine Rate von  $4.0 \pm 1.0$  DSB Gbp<sup>-1</sup> Gy<sup>-1</sup> ermittelt.

## **6.2 Theoretische Modellierung durch einen gemischten Poissonprozess**

Die Modellierung der gemessenen DNA-Mengenverteilungen durch einen dosisabhängigen gemischten Poissonprozess kann als Erweiterung des RBM betrachtet werden, wobei die Voraussetzung einer konstanten DSB-Wahrscheinlichkeit  $\alpha$  innerhalb des gesamten Genoms fallen gelassen wird. Stattdessen skaliert die Bruchwahrscheinlichkeit mit der absorbierten Energie entlang des DNA-Fadens. Voraussetzung für ein solches Modell ist die Annahme, dass innerhalb kleiner DNA-Abschnitte, die die gleiche deponierte Energie in ihrer Umgebung sehen, eine gleiche Bruchwahrscheinlichkeit auftritt, und dass die jeweilige Bruchwahrscheinlichkeit innerhalb eines solchen DNA-Abschnittes konstant ist. Bei der Umsetzung des gemischten Poissonprozesses wird die innerhalb von Subarealen des Zellkernes deponierte Energie mit Hilfe von analytischen Trackstrukturmodellen berechnet. Durch den Einsatz von Zellkernmodellen, die die Lokalisation von DNA-Segmenten innerhalb des Interphase-Zellkerns beschreiben, wird dann für einzelne DNA-Segmente die dosisabhängige DSB-Häufigkeit berechnet, was schließlich zu einer Abschätzung der generierten DNA-Fragmentlängen führt.

### 6.2.1 Verwendete Trackstrukturmodelle

Zur Beschreibung der Trackstruktur wurde zum einen das Modell von Kraft/Scholz (Scholz et al. 1997), zum anderen das Modell von Chatterjee (beschrieben in Chen et al. 1994) verwendet. Bei beiden Ansätzen ergibt sich die radiale Dosisverteilung gemäß:

$$D(r) = \begin{cases} \kappa LET / r_{\min}^2 & r < r_{\min} \\ \kappa LET / r^2 & r_{\min} < r < r_{\max} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (6)$$

Dabei stellt  $\kappa$  eine Normalisierungskonstante dar, die  $D(r)$  auf  $LET_{\infty}$  normiert.

Nach Kraft/Scholz sind die Parameter  $r_{\min}$  und  $r_{\max}$  wie folgt festgelegt:

$$r_{\min} = 10 \text{ nm}$$

$$r_{\max} = \gamma E^{\delta},$$

wobei  $E$  die kinetische Energie der Ionen in MeV/u ist und  $\gamma = 0.05$ ,  $\delta = 1.7$ . Diese Koeffizienten für die Berechnung des maximalen Radius,  $r_{\max}$ , ergaben sich aus einem Fit dieser Funktion an Literaturdaten, während für den Track *Core* ein konstanter Radius  $r_{\min}$  angenommen wird. Der Gültigkeitsbereich dieses Modells wird von den Autoren für alle kinetischen Energien zwischen 1 und 20 MeV/u angegeben.

Nach dem Ansatz von Chatterjee bestimmen sich die Parameter  $r_{\min}$  und  $r_{\max}$  wie folgt:

$$r_{\min} = 0.0116 \beta$$

$$r_{\max} = 0.768 E - 1.925 \sqrt{E} + 1.257$$

wobei  $E$  die kinetische Energie in MeV/u ist und  $\beta = v/c$ . Laut Chatterjee gibt es keine Beschränkung des Gültigkeitsbereiches dieses Modells.

### 6.2.2 Verwendete Zellkernmodelle

Die Organisation von Interphase-Chromosomen im Zellkern ist bislang nur unzureichend verstanden. Man unterscheidet mehrere Hierarchiestufen (Übersicht bei Wodcock und

Dimitrov, 2001). Die gut untersuchten Primär- sowie Sekundärstruktur umfassen die Windung der DNA um Nukleosomen und die Ausbildung der sogenannten 30 nm Fiber durch Interaktionen zwischen den Nukleosomen. Weitgehend unklar ist die Tertiärstruktur, d.h. die Anordnung der 30 nm Fiber. Erste Versuche, diese zu modellieren, beruhten auf Messungen der physikalischen Abstände (in nm) in Interphase-Zellkernen zwischen genomischen loci, deren Abstand auf der Genomebene (in bp) bekannt war, durch Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH; van den Engh et al. 1992). Für Markersequenzen, die  $\leq 1.5$  Mbp voneinander entfernt liegen, ergab sich dabei eine lineare Abhängigkeit zwischen dem mittleren quadrierten physikalischen Abstand,  $\langle H_x^2 \rangle$ , und der genomischen Entfernung,  $M_x$ , und es wurde gefolgert, dass die Organisation der Chromatinfiber in diesem Abstandsbereich einem *Random Walk* folgt. Bei größeren genomischen Abständen zwischen den Markersequenzen ( $3 \text{ Mbp} \leq M_x \leq 200 \text{ Mbp}$ ) steigt  $\langle H_x^2 \rangle$  weniger stark mit zunehmendem  $M_x$  als bei kleineren genomischen Abständen (Yokota et al 1995, Sachs et al. 1995). Sachs und Mitarbeiter postulierten eine lineare Abhängigkeit zwischen  $\langle H_x^2 \rangle$  und  $M_x$  auch für diese größeren genomische Abstände, und folgerten, dass das Chromatin auch in diesem Bereich einem *Random Walk* folgt. Nach ihrem Modell, dem sogenannten Random Walk / Giant Loop (RWGL) Modell ist die 30 nm Fiber in Loops von etwa 1 – 3 Mbp gefaltet, wobei die Basispunkte der Loops auf einer Art Rückgrat verankert sind. Sowohl die Fiber innerhalb der Loops als auch die Basispunkte folgen in diesem Modell einem *Random Walk*.

Ein Haupteinwand gegen das RWGL-Modell ist, dass es keine experimentellen Hinweise auf das von Sachs postulierte Rückgrat gibt. Zudem basiert das RWGL-Modell auf der Annahme, dass die mittleren physikalischen Abstände zwischen 2 Regionen proportional zu  $M_x^{1/2}$  sind. Dieser Annahme widersprechen Münkel und Mitarbeiter (Münkel und Langowski 1998, Münkel et al. 1999), die, ebenfalls anhand der Abstandsmessungen von Yokota et al. (1995), für den Bereich genomischer Abstände größer 1.5 Mbp eine Proportionalität zwischen den mittleren physikalischen Abständen und  $M_x^{1/3}$  demonstrierten, woraus sie folgerten, dass größere Abschnitte der Chromatinfiber in globulären Subkompartimenten organisiert sind. In ihrer Modellierung nahmen sie an, dass Zahl und DNA-Gehalt dieser Subkompartimente denen der Minibanden in der Prophase entsprechen. Aufgrund von experimentellen Hinweisen auf das Vorhandensein von Chromatin-Loops in der Größenordnung von etwa 100 kb (nicht aber von Loops in der Größenordnung von 1 – 3 Mbp) sind in ihrem Modell, dem

sogenannten Multi Loop Subcompartment (MLS)-Modell, die Subkompartimente durch Rosetten-artige Anordnung von etwa 10 Loops mit einer Länge von etwa 120 kb gebildet. Bei allen der hier vorgestellten Modellen wird angenommen, dass die einzelnen Chromosomen innerhalb der Zellkerne distinkte Territorien einnehmen, wie es experimentell gut belegt ist (Cremer und Cremer 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl das RWGL- als auch das MLS-Modell getestet, indem mit den entsprechenden Modellen simulierte Zellkerne, die von T. Knoch (Arbeitsgruppe T. Langowski) und G. Kreth (Arbeitsgruppe C. Cremer) zur Verfügung gestellt wurden, in die Bestrahlungssimulation eingesetzt wurden. Systematische Vergleiche von Zellkernen, die mit diesen Modellen modelliert wurden, zeigten folgende grundlegende Unterschiede (Münkel und Langowski 1998, Münkel et al. 1999): Aufgrund von Ausschlussvolumina in der Modellierung führt das MLS-Modell zu geringeren Überlappungen zwischen benachbarten Chromosomenterritorien als das RWGL-Modell. Das gesamte Chromatin ist beim MLS-Modell auch gleichmäßiger innerhalb des Zellkerns verteilt als beim RWGL-Modell, wo sich eine relative Konzentration in der Kernmitte beobachten lässt. Das MLS-Modell führt zudem zu einer weitgehenden Trennung der von den einzelnen Chromosomenarmen innerhalb eines Chromosomenterritoriums eingenommenen Regionen, während es beim RWGL-Modell zu einer Durchdringung des Chromatins aus beiden Armen kommt.

Die mit dem MLS- bzw. RWGL-Modellen generierten Zellkernmodelle liegen dergestalt vor, dass die Gesamt-DNA der einzelnen Chromosomen in Segmente unterteilt ist, für die die kartesischen Koordinaten bekannt sind. Die Lokalisation,  $\bar{x}_i$ , der Segmente dient später zur Messung des Abstandes der Segmente von den Radii der Tracks und somit zur Abschätzung der Dosis innerhalb der Segmente (sh. Abschnitt 6.2.3). Für beide Modelle liegen modellierte Zellkerne mit unterschiedlichen Auflösungen von 5 kbp pro Segment und 30 kbp pro Segment vor.

Des Weiteren wurden Zellkernmodelle getestet, die von Friedland und Mitarbeitern generiert wurden (Friedland et al. 1999). In ihrem Modell liegt die 30 nm Fiber in offenen 100 kbp-Schleifen vor, und einzelne Schleifeneinheiten wurden unter *Random Walk*-Bedingungen aneinandergesetzt. Dieses Modell ist ebenfalls territorial, d.h. die einzelnen Chromosomen bilden Domänen. Im Vergleich zu den oben genannten Modellen ist aber eine deutlich

geringere Organisation höherer Ordnung vorhanden. In seiner ursprünglichen Fassung liegt das Friedland-Modell mit einer sehr großen Auflösung vor (d.h. die kartesischen Koordinaten sind für individuelle Atome bekannt). Um eine Vergleichbarkeit mit den anderen Modellen herzustellen, wurde daher eine modifizierte Fassung verwendet, bei der ebenfalls einzelne DNA-Segmente einer Länge von 5 kbp oder 30 kbp betrachtet werden.

### 6.2.3 Simulation von DNA-Mengenverteilungen

Für die Simulation von DNA-Mengenverteilungen wird die aus einer Bestrahlung resultierende Fragmentlängenverteilung für 10000 Zellkerne berechnet. Für jeden einzelnen Zellkern wird zunächst das Bestrahlungsfeld erzeugt. Dabei werden die Eintrittsorte  $\vec{X}_i$  der Ionen in einem xy-Gitter, das unterhalb des Zellkernes liegt, gewürfelt. In z-Richtung wird angenommen, dass der LET der Ionen innerhalb einer Distanz von 10  $\mu\text{m}$  als konstant angesehen werden kann. Aus der Vermessung des Bestrahlungsfeldes sind folgende Parameter bekannt:

- die kinetische Energie der Ionen in MeV/u
- der LET in keV/ $\mu\text{m}$
- die Fluenz in  $\mu\text{m}^{-2}$

Die Zellkerne werden durch Kugeln mit einem Radius von 5  $\mu\text{m}$  genähert. Der Radius der Fläche, auf der die Eintrittsorte gewürfelt werden, ergibt sich aus der Addition des Zellkernradius mit der maximalen Ausdehnung,  $r_{max}$ , der Ionentracks. Die Anzahl  $n$  der zu betrachtenden Ionen ergibt sich demnach aus:

$$n = (r_{max} + r_{Zellkern})^2 \times \pi \times \text{Fluenz} \quad (7)$$

Abbildung 7 zeigt eine typische lokale Dosisverteilung, wie sie sich nach dem Chatterjee-Modell am Äquator eines Zellkerns unter Annahme einer Bestrahlung mit Calcium-Ionen ergibt.

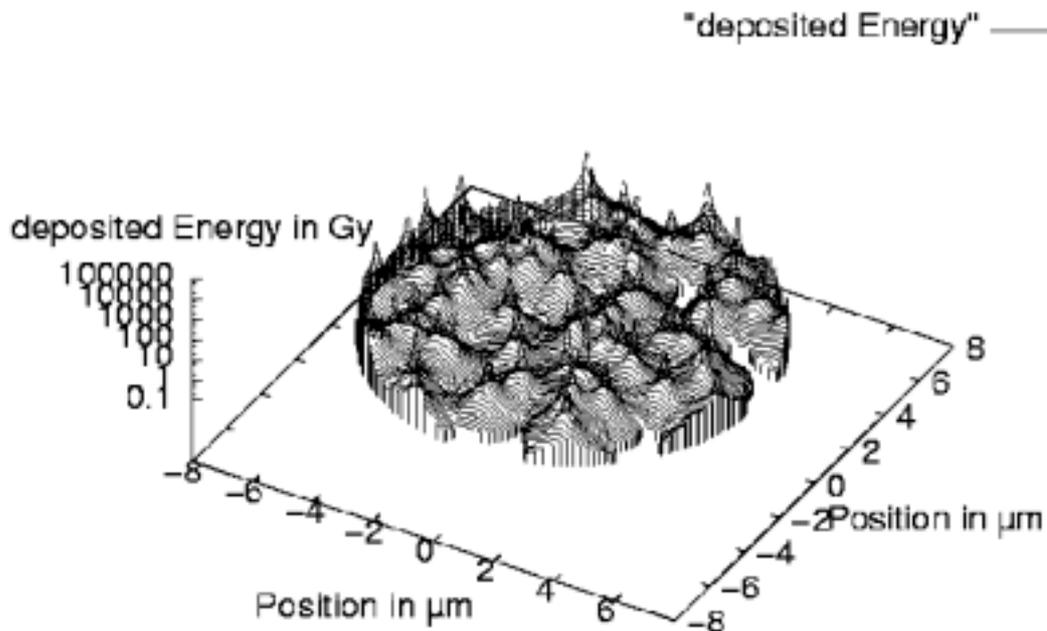


Abbildung 7: Simulierte Verteilung der lokalen Dosis am Äquator eines sphärischen Zellkerns unter Annahme einer Calcium-Bestrahlung (kinetische Energie 6.9 MeV/u, LET 2100 keV/μm, Fluenz 0.75 μm<sup>-2</sup>)

Im nächsten Schritt wird die lokale Dosis bestimmt, die an einzelnen DNA-Segmenten aufgrund ihrer Entfernung zu den Eintrittsorten der Ionen herrscht. Die hier verwendeten Zellkernmodelle liegen in zwei Auflösungsstufen vor, wobei jeweils 5 kbp beziehungsweise jeweils 31 kbp pro Ortspunkt im Zellkern zusammengefasst sind. Der Betrag,  $\lambda$ , dieser Segmentlängen beeinflusst die Auflösung in den berechneten Fragmentverteilungen, da nach dem Whittaker-Shannon-Kotelnikov-Abtasttheorem keine Strukturen aufgelöst werden können, die kleiner sind als die doppelte Segmentlänge.

Bei der Simulation wird für jedes DNA-Segment mit dem Ort  $\vec{x}_i$ , beginnend mit Chromosom 1, der Abstand zu den Eintrittsorten  $\vec{X}_i$  aller Ionen, die durch den Zellkern treten, bestimmt:

$$\Delta r_i = \left| \vec{X}_i - \vec{x}_i \right| \quad (8)$$

Mittels der analytischen Beziehungen für die radiale Dosisverteilung ergeben sich dann die Einzeldosisbeiträge  $D_i(\Delta r_i)$ , die über alle  $n$  Eintrittsorte summiert werden.

$$D_{gesamt}^{lokal}(\bar{x}_i) = \sum_{i=1}^n D_i(\Delta r_i) \quad (9)$$

Die lokale Gesamtdosis  $D_{gesamt}^{lokal}(\bar{x}_i)$  pro DNA-Segment geht nun in die Berechnung der lokalen Bruchhäufigkeit für das betrachtete Segment,  $\alpha_{lokal}(\bar{x}_i)$ , ein. Diese bestimmt sich aus der über die gesamte DNA gemittelten Bruchrate pro DNA-Einheitlänge und Doseinheit  $\bar{\alpha}$ :

$$\alpha_{lokal}(\bar{x}_i) = D_{gesamt}^{lokal}(\bar{x}_i) \times \bar{\alpha} \quad (10)$$

Bei der Simulation dient  $\bar{\alpha}$  als freier Parameter mit der Einheit  $(\text{Gbp} \times \text{Gy})^{-1}$ , dessen Wert so lange angepasst wird, bis sich zwischen der gemessenen DNA-Mengenverteilung und der berechneten DNA-Mengenverteilung der kleinste quadratische Fehler ergibt.

Da laut Grundannahme die Wahrscheinlichkeit für die Erzeugung eines DSB innerhalb eines DNA-Segmentes gleichverteilt ist, ergibt sich die mittlere lokal erwartete DNA-Fragmentlänge  $\bar{\sigma}_i^{lokal}$  dann als

$$\bar{\sigma}_i^{lokal} = \frac{1}{\alpha_{lokal}(\bar{x}_i)} \quad (11)$$

Mit Hilfe der mittleren lokalen Fragmentlänge  $\bar{\sigma}_1^{lokal}$  wird für das erste Segment die Entfernung  $\rho_{DSB}$  bis zum nächsten DSB mittels einer Zufallszahl  $v$  bestimmt. Es gilt

$$\rho_{DSB} = \bar{\sigma}_1^{lokal} \times (-\ln(v)) \leq \lambda, \quad (12)$$

wobei  $v$  eine Zufallszahl  $\in (0,1]$ .

Das so erzeugten Fragment mit der Länge  $l$  wird in einem Array vermerkt. Obige Bedingung wird auf die Restlänge  $l_{\text{Rest}}(\bar{x}_i) = \lambda - l$  des behandelten DNA-Segmentes mit einer neuen Zufallszahl  $v$  solange angewandt, bis der  $n$ -te Schritt ein  $l_{\text{Rest}}^n(\bar{x}_i) < 0$  ergeben würde. Der Ort  $\rho_{\text{Rest}}^{n-1}(\bar{x}_i)$  gibt dann den Startpunkt für ein neues DNA-Fragment, das von  $\rho_{\text{Rest}}^{n-1}(\bar{x}_i)$  bis  $\rho_{\text{Rest}}(\bar{x}_{i+m})$  des  $m$ -ten folgenden DNA-Segmentes gerechnet wird. Für jedes DNA-Segment wird also eine orts- und dosisabhängige Bruchrate berechnet. Man erhält schließlich eine Verteilung der durch die Brucherzeugung generierten DNA-Fragmentlängen, die durch Multiplikation mit der jeweiligen Fragmentlänge in eine DNA-Mengenverteilung transformiert wird.

#### 6.2.4 Der Einfluss des Trackstrukturmodells auf das Simulationsergebnis

Sowohl das zur Simulation verwendete Trackstrukturmodell als auch das verwendete Zellkernmodell beeinflussen die Form und Lage der resultierenden berechneten DNA-Mengenverteilungen und somit auch den Wert der globalen Bruchrate  $\bar{\alpha}$ , der zu einer optimalen Übereinstimmung zwischen Simulation und experimentell bestimmter DNA-Mengenverteilung führt. Um den Einfluss der verwendeten Modelle zu testen, wurden Gedankenexperimente durchgeführt. Abbildung 8 zeigt ein typisches Ergebnis eines solchen Gedankenexperimentes, bei dem der Einfluss des Trackstrukturmodells untersucht wurde. Hier wurde eine Calcium-Ionenbestrahlung ( $\text{LET} = 2100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ,  $E_{\text{kin}} = 6.9 \text{ MeV/u}$ , Fluenz =  $0.75 \mu\text{m}^{-2}$ ) angenommen. Unter Annahme eines MLS-Modells für die Zellkernarchitektur (Segmentlänge 5.1 kbp, Loopgröße 127 kbp) wurden bei einem konstanten Wert für die globale Bruchhäufigkeit  $\bar{\alpha}$  von  $20.3 (\text{Gbp} \times \text{Gy})^{-1}$  die Fragmentverteilungen in Abhängigkeit von den Trackstrukturmodellen bestimmt. Es zeigt sich, dass unter Verwendung des Trackstrukturmodells von Kraft/Scholz mehr Fragmente mit einer Länge  $<$  etwa 200 kbp und weniger Fragmente mit einer Länge  $>$  etwa 200 kbp erzeugt werden als unter Verwendung des Chatterjee-Modells. Dies begründet sich in der unterschiedlichen radialen Energiedeposition der beiden Trackstrukturmodelle. Im Modell von Chatterjee werden jeweils 50 % der Energie im *Track Core* und in der Penumbra deponiert. Aufgrund der Normierung der radialen Dosisverteilung auf das  $\text{LET}_\infty$  wird im Modell von Kraft/Scholz etwa 2 x mehr Energie in der Penumbra deponiert. Dies hat zur Folge, daß mehr DSB und damit auch mehr kleine DNA-Fragmente bei gleicher angenommener Bruchrate  $\bar{\alpha}$  erzeugt werden können.

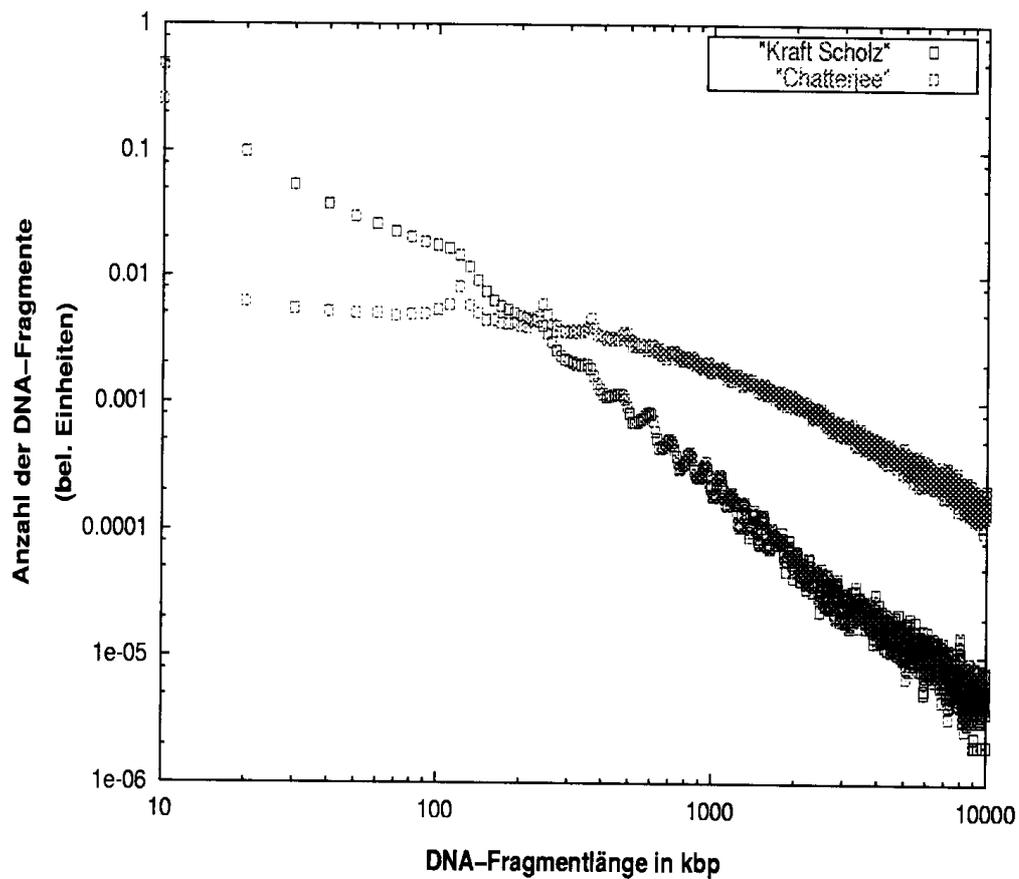


Abbildung 8: Anzahl der Fragmente gegen Fragmentlänge bei Simulation einer Bestrahlung mit Ca-Ionen mit dem Trackstrukturmodell von Chatterjee bzw. von Kraft/Scholz

Diese bei Verwendung des Kraft/Scholz-Modells erhöhte Erzeugung kleiner Fragmente hat natürlich Auswirkungen auf den durch Anpassung an experimentell bestimmte DNA-Mengenverteilungen ermittelten optimalen Wert von  $\bar{\alpha}$ . Generell liegen die ermittelten DSB-Wahrscheinlichkeiten bei Verwendung des Kraft/Scholz-Modells um den Faktor 2.5 bis 3.2 unter denen, die mittels des Chatterjee-Modells bestimmt werden, wobei das exakte Verhältnis von Parametern wie Fluenz und Überlappungsdichte der einzelnen Tracks beeinflusst ist. Durch Anpassen der Bruchrate  $\bar{\alpha}$  lassen sich die Maxima der DNA-Mengenverteilungen, die mit den verschiedenen Trackstrukturmodellen für die gleichen Strahlenqualität berechnet werden, zur Deckung bringen. Der Verlauf der berechneten DNA-Mengenverteilungen ist dann bei den verschiedenen Trackstrukturmodellen nicht signifikant unterschiedlich.

### 6.2.5 Einfluss des Zellkernmodells auf das Simulationsergebnis

Auch der Einfluss des verwendeten Zellkernmodells auf das Simulationsergebnis wurde in einem Gedankenexperiment getestet. Wie oben wurde eine Calcium-Ionenbestrahlung ( $LET = 2100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ,  $E_{kin} = 6.9 \text{ MeV/u}$ ,  $\text{Fluenz} = 0.75 \mu\text{m}^{-2}$ ) angenommen. Die aus Verwendung der verschiedenen Zellkernmodellen resultierenden DNA-Mengenverteilungen wurden für einen konstanten Wert von  $\bar{\alpha}$  ( $20.3 \text{ (Gbp} \times \text{Gy)}^{-1}$ ) mit dem Chatterjee-Modell für die Trackstruktur berechnet und auf die gleiche Fläche normiert. Bei den zugrundeliegenden Zellkernmodellen wurden DNA-Segmentgrößen von 5 kbp gewählt, so dass die Profile, aufgrund des Abtasttheorems, auf einem Raster von 10 kbp (= doppelte Segmentlänge) gerechnet wurden. Das Ergebnis dieser Berechnungen ist in Abbildung 9 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die verschiedenen Zellkernmodelle zu unterschiedlichen DNA-Mengenverteilungen führen, die sich in ihrer Breite und Lage des Maximums unterscheiden. In Tabelle 4 sind für die jeweiligen Verteilungen die Varianz und die Lage des Maximums angegeben.

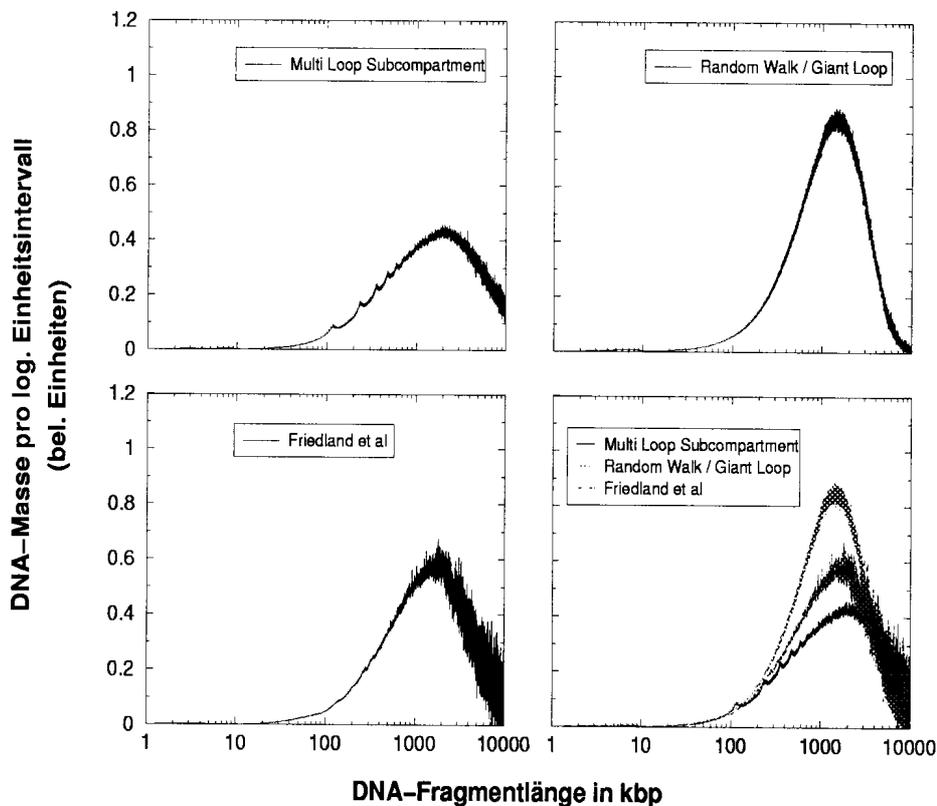


Abbildung 9: Simulierte DNA-Mengenverteilungen unter Annahme verschiedener Zellkern-Modelle

Zellkernmodell	Lage des Maximums in kbp	Breite der Verteilung kbp <sup>-2</sup>
MLS	1991	2611
Friedland	1750	2361
RWGL	1562	1728

Tabelle 4: Lage der Maxima und Verteilungsbreiten der in Abb. 9 gezeigten simulierten DNA-Mengenverteilungen

Beide Größen werden von der Packungsdichte der DNA pro Raumvolumeneinheit beeinflusst. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass sich die Lage der jeweiligen Maxima zur Deckung bringen lassen, wenn der angenommene Wert für  $\bar{\alpha}$  variiert wird, die Verteilungsbreiten lassen sich dadurch jedoch nicht zur Deckung bringen. Die Verteilungsbreiten spiegeln die Organisationsstrukturen der Zellkern-Modelle wider: Betrachtet man das MLS-Modell, gibt es Bereiche um das Zentrum der Rosetten, wo die DNA sehr dicht gepackt ist und Bereiche zwischen den einzelnen Rosetten, die eine geringe lokale Packungsdichte der DNA aufweisen. Beim Friedland – und beim RWGL-Modell sind die lokalen DNA-Konzentrationsunterschiede geringer. Je größer die lokalen DNA-Konzentrationsunterschiede sind, desto breiter werden die DNA-Mengenverteilungen, da beim Durchtritt eines Ions durch Bereiche hoher DNA-Dichte vermehrt kleine und beim Durchtritt durch Bereiche geringer DNA-Dichte vermehrt größere Fragmente gebildet werden.

Die jeweils angewendeten Zellkernmodelle beeinflussen nicht nur die Verteilungsbreite und Lage des Maximums, sondern auch den Verlauf der Profile. Alle der simulierten Profile sind von periodisch auftretenden Peaks überlagert, die bei der in Abbildung 9 gewählten Darstellungsform besonders beim MLS-Modell augenfällig sind. Diese periodischen Peaks spiegeln grundlegende Eigenschaften der einzelnen Zellkernmodelle wider, die aus sich periodisch wiederholenden Strukturelementen aufgebaut sind. Im Falle des MLS-Modells wird die gesamte DNA in Schleifen von 100 kbp (bzw., abhängig von der Modellkonfiguration, 130 kbp) gefaltet, wobei immer durchschnittlich 11 Schleifen in einer Rosette zusammengefasst sind. Tritt nun ein Ion durch eine solche Schleifenstruktur, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Zentrum einer solchen Rosette getroffen wird, und es ergibt sich in der Modellierung eine erhöhte Anzahl von Fragmenten, deren Länge ein Vielfaches der Schleifengröße ist. Im Falle des RWGL-Modells beträgt die Schleifengröße etwa 3 Mbp und die Wahrscheinlichkeit, dass die Basis einer Schleife beim Ionendurchtritt

getroffen ist, ist geringer als beim MLS-Modell. Die periodisch auftretenden Peaks sind daher beim RWGL-Modell weniger stark ausgeprägt als beim MLS-Modell, sie sind aber nachweisbar. Beim Zellkernmodell von Friedland ist die DNA in Schleifen mit der Größe von 127 kbp gelegt, die nicht in Rosetten zusammen gefasst sind. Der Verlauf der DNA-Mengenverteilung ist daher ähnlich dem eines RWGL Modells, aber insbesondere im Bereich  $< 200$  kbp aufgrund der geringen Schleifenlänge stark überhöht.

Es soll hier darauf hingewiesen werden, dass die artifiziellen Peaks in den simulierten DNA-Massenverteilungen zwar die Folge der aus periodisch wiederkehrenden Einheiten aufgebauten Zellkernmodellen sind, dass sie aber nur dann zustande kommen, wenn gleichzeitig eine inhomogene Energiedeposition im Zellkern simuliert wird. Im Spezialfall einer konstanten Dosis für alle betrachteten DNA-Segmente  $\bar{x}_i$  ergeben sich in der Simulation keine solchen überlagernden Peaks, wie Abbildung 10 zeigt. Vielmehr, und das ist als Kontrolle für die Gültigkeit des Simulationsansatzes zu werten, ergibt sich hier die selbe DNA-Mengenverteilung, wie sie durch Anwendung des RBM, d.h. ohne Zugrundelegung einer bestimmten räumlichen Anordnung der DNA im Zellkern, erzielt wird. Kleinere Abweichungen im Bereich hochmolekularer Fragmente lassen sich auf statistische Fluktuationen des Simulationsansatzes zurückführen.

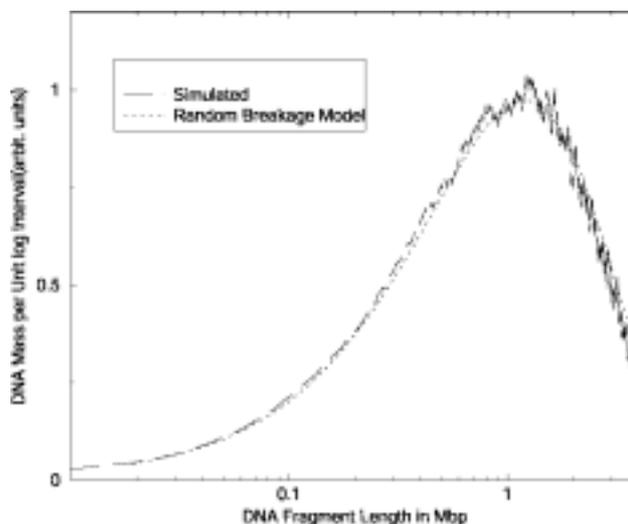


Abbildung 10: Vergleich der berechneten DNA-Mengenverteilung unter Anwendung des *Random Breakage* Modells und nach Simulation mit dem MLS-Zellkern-Modell und einer konstanten lokalen Dosis

### **6.3 Ermittlung der Modelle, die die beste Übereinstimmung von Simulation und Experiment erlauben**

Ziel des hier beschriebenen Projektes ist es, die Abhängigkeit der DSB-Rate vom LET zu ermitteln. Im Rahmen des vorgestellten gemischten, dosisabhängigen Poissonprozesses geschieht dies durch Optimierung des in der Simulation angenommenen Wertes für die globale Bruchrate  $\bar{\alpha}$ , wobei als Optimierungskriterium der kleinste quadratische Fehler zwischen den DNA-Mengenverteilungen, wie sie sich aus der Simulation ergeben, und den experimentell bestimmten DNA-Mengenverteilungen gilt. Wie die oben beschriebenen Gedankenexperimente gezeigt haben, wird die Form der berechneten DNA-Mengenverteilungen in ausgeprägter Art und Weise von den zugrundeliegenden Modellen zur Trackstruktur und zur Zellkernarchitektur beeinflusst. Dies führt in der Folge dazu, dass auch der als optimal ermittelte Wert für  $\bar{\alpha}$  von eben diesen Modellen abhängt. Da *a priori* nicht bekannt ist, welche der Modelle der Wirklichkeit am nächsten kommen, gilt es daher zu prüfen, welche Modellkombination am besten geeignet ist, die beobachteten DNA-Mengenverteilungen wiederzugeben. Als Kriterium für die Eignung einer Modellkombination gilt der Wert des kleinsten quadratischen Fehlers, der nach Anpassung von  $\bar{\alpha}$  erzielbar ist.

Die Ergebnisse aus Simulationsrechnungen mit allen der möglichen Kombinationen aus Trackstrukturmodell und Zellkernmodell wurden mit experimentell bestimmten DNA-Massenverteilungen verglichen. Die experimentell ermittelten Profile entstammten verschiedenen Bestrahlungsreihen (sh. Tabelle 1), die jeweils mit mehreren Dosen (0,100 200, 300, 400 und 500 Gy) durchgeführt wurden. Dabei wurden kombinierte Profile ausgewertet, wie in Abschnitt 5.5 beschrieben, so dass der Moleküllängenbereich von 5 kbp bis 3 Mbp abgedeckt ist.

Für jeden verwendeten Ionentyp wurden mehrere Bestrahlungsexperimente durchgeführt, wobei V79-Hamsterfibroblasten und primäre menschliche VH25-Fibroblasten bestrahlt wurden, um zu testen, ob der Zelltypus Auswirkungen auf die ermittelten DNA-Mengenverteilungen hat. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede zwischen beiden Zelltypen nachgewiesen werden; daher werden die für die einzelnen Zelltypen erzielten Ergebnisse im nachfolgenden gepoolt.

Zusätzlich wurden DNA-Mengenverteilungen analysiert, die von Kraxenberger et al (1998) nach Bestrahlung von V79-Hamsterfibroblasten an der GSI Darmstadt durch ZIFE-

Elektrophorese bestimmt wurden. Diese Verteilungen liegen nur für Moleküllängen ab 48.5 kbp vor.

Exemplarisch wird im folgenden gezeigt, welchen Einfluss die gewählten Modelle für Trackstruktur und Zellkern auf die Güte der Anpassung des erzielten simulierten Profils an ein experimentell bestimmtes Profil haben. Dabei wurden die in Tabelle 5 dargestellten Kombinationen getestet.

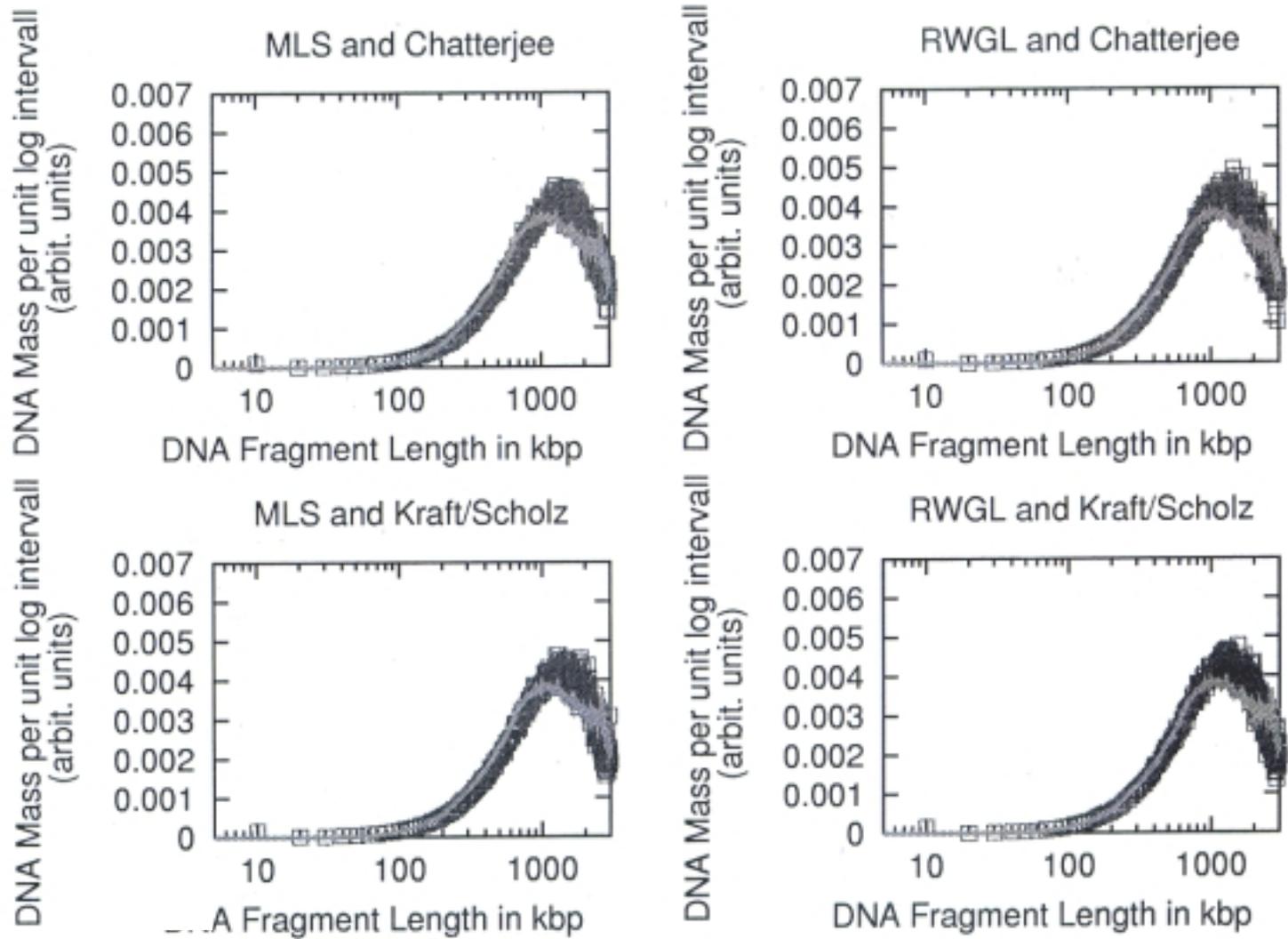
Kombination	Chatterjee	Kraft/Scholz
MLS	I	II
RWGL	III	IV

Tabelle 5: Bezeichnung der Kombinationen von Zellkern-Modellen und Trackstruktur-Modellen

Abbildung 11 zeigt ein gemessenes DNA-Profil nach Bestrahlung von V79 Zellen mit 5.9 MeV Kohlenstoff-Ionen bei einer Dosis von 400 Gy und die bestangepassten simulierten Profile, wie sie nach Variation der globalen Bruchrate,  $\bar{\alpha}$ , für die verschiedenen Modellkombinationen erzielt wurden. Die für die jeweilige Modellkombination ermittelte quadratische Abweichung zwischen Simulation und experimenteller Verteilung ist, ebenso wie die zugehörigen Werte für  $\bar{\alpha}$ , in Tabelle 6 angegeben. Weitere Beispiele finden sich im Anhang.

Modellkombination	I	II	III	IV
optimale Bruchrate (Gy x Gbp) <sup>-1</sup>	7.10	2.76	7.10	2.76
quadratischer Fehler	1.45 x 10 <sup>-4</sup>	2.32 x 10 <sup>-4</sup>	2.12 x 10 <sup>-4</sup>	2.04 x 10 <sup>-4</sup>

Tabelle 6: Ergebnisse der Anpassung der berechneten DNA-Mengenverteilung an die gemessenen DNA-Mengenverteilungen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen (400 Gy). Angegeben sind der quadratische Fehler zwischen den einzelnen Simulationen und der gemessenen DNA-Mengenverteilungen nach Optimierung der Bruchrate.



Vergleiche der Kombinationen I-IV wurden für 104 Datensätze aus den verschiedenen Bestrahlungsversuchen durchgeführt. Um zu testen, welche der Modell-Kombinationen am besten für die Beschreibung der gemessenen Profile geeignet ist, wurde mit den ermittelten quadratischen Fehlern eine Rankinganalyse durchgeführt, deren Ergebnis in Tabelle 7 dargestellt ist. Demnach werden mit der Kombination von Chatterjee-Modell für die Trackstruktur und MLS-Modell für die Chromatinanordnung im allgemeinen die besten Simulationsergebnisse erzielt. Die Differenzen zwischen den *Least Square* Werten waren jedoch bei den meisten der ausgewerteten Datensätze sehr gering, so dass das Ergebnis aus Tabelle 7 nur als Tendenz gewertet werden kann. Dennoch wurden aufgrund der vorliegenden Auswertung die DSB-Häufigkeiten mit Hilfe der Kombination MLS und Chatterjee Modell bestimmt.

Kombination	Chatterjee	Kraft/Scholz
MLS	0.214	0.228
RWGL	0.229	0.335

Tabelle 7: Ergebnis der Rankinganalyse. Die Angaben sind normiert und ergeben sich aus der Gesamtzahl der Summen aller Ränge.

#### **6.4 Ermittlung der relativen biologischen Wirksamkeit für die Induktion von DSB in Abhängigkeit von der Strahlenqualität**

Mittels des gemischten Poissonprozesses unter Verwendung des MLS-Modells für die Chromatinorganisation und des Chatterjee-Modells für die Trackstruktur wurde zuerst für jede Gelspur derjenige Wert für die Bruchrate  $\bar{\alpha}$  ermittelt, der zur besten Übereinstimmung zwischen simuliertem und gemessenem Profil führte. Sodann wurde  $\bar{\alpha}$  für die verschiedenen Spuren eines Gels (d.h. für verschiedene Bestrahlungsdosen) gemittelt; die Mittelwerte wurden dann über alle Gele und Experimente, die mit einer Ionensorte durchgeführt wurden, gemittelt. Für Gamma-Bestrahlung ergab sich nach Simulation (mit einer konstanten Dosis  $D_{gesamt}^{lokal}(\bar{x}_i)$  in Gleichung 10) eine Bruchrate von  $\bar{\alpha}_{gamma} = 4.0 \pm 0.3 \text{ (Gbp X Gy)}^{-1}$ ; dieser Wert stimmt gut mit dem mittels des RBM ermittelten Wert von  $4.0 \pm 1.0 \text{ (Gbp X Gy)}^{-1}$  (sh. Abschnitt 6.1) und in früheren Arbeiten (Friedl et al. 1995) ermittelten Werten überein.

Die nach Bestrahlung mit den verschiedenen Ionensorten ermittelten Bruchraten sind in Tabelle 8 dargestellt. Der sich daraus ergebende RBE-Wert wurde gemäß der folgenden Formel berechnet:

$$RBE_{Ion} = \frac{\bar{\alpha}_{Ion}}{\bar{\alpha}_{gamma}} \quad (13)$$

<b>Ion</b>	<b>LET (keV/μm)</b>	<b>kin. Energie (MeV/u)</b>	<b>Bruchrate (Gbp X Gy)<sup>-1</sup></b>	<b>RBE</b>
Proton	2.1	21	4.6 ± 0.3	1.15 ± 0.17
Helium	21	8.4	5.8 ± 0.7	1.45 ± 0.27
Kohlenstoff	251	5.9	7.1 ± 1.0	1.77 ± 0.42
Sauerstoff	518	4.1	11.0 ± 1.3	2.75 ± 0.57
Calcium	2100	6.9	20.3 ± 2.8	5.08 ± 1.16
Uran	14000	9	4.8 ± 1.2	1.20 ± 0.42

Tabelle 8: Aus Simulationen mittels MLS und Chatterjee-Modell ermittelte Bruchraten (Gbp X Gy)<sup>-1</sup> nach Ionenbestrahlung.

Bei einer Simulation mittels des RWGL-Modells und des Chatterjee-Modells ergeben sich ähnliche Daten; bei einer Simulation mit dem Kraft/Scholz-Modell für die Trackstruktur wären die für die Ionenbestrahlungen ermittelten Bruchraten um etwa den Faktor 2.5 geringer, die für die Gammabestrahlung ermittelten Raten blieben aber unbeeinflusst. Dies würde zu RBE-Werten unter 1 für Bestrahlungen mit Protonen, Helium-Ionen und Kohlenstoff-Ionen führen, was nahelegt, dass das Kraft/Scholz-Modell die radiale Dosisverteilung im Track unzureichend beschreibt.

Zum Vergleich zeigt Tabelle 9 Ergebnisse anderer Autoren, die mit der Fragmentsummation ermittelt wurden. In Abbildung 12 wurden die in dieser Arbeit erzielten sowie die in Tabelle 9 dargestellten RBE-Werte gegen den LET aufgetragen. Die von uns mittels Simulation im LET-Bereich von ca. 20 – 200 keV/μm bestimmten Werte sind mit denen der anderen Autoren vergleichbar, wenn auch in diesem Bereich keine einfache Abhängigkeit des RBE-Wertes vom LET ersichtlich ist. Dies zeigt die gute Eignung des Simulationsansatzes für die

Analyse der DNA-Fragmentierung durch dicht-ionisierende Strahlung. Für Bestrahlungen mit höheren LET-Werten liegen gegenwärtig keine Vergleichswerte vor, so dass abzuwarten bleibt, ob sich der von uns beobachtete deutliche Anstieg des RBE für LET-Werte von ca. 2000 keV/μm mit anderen Techniken bestätigen lässt.

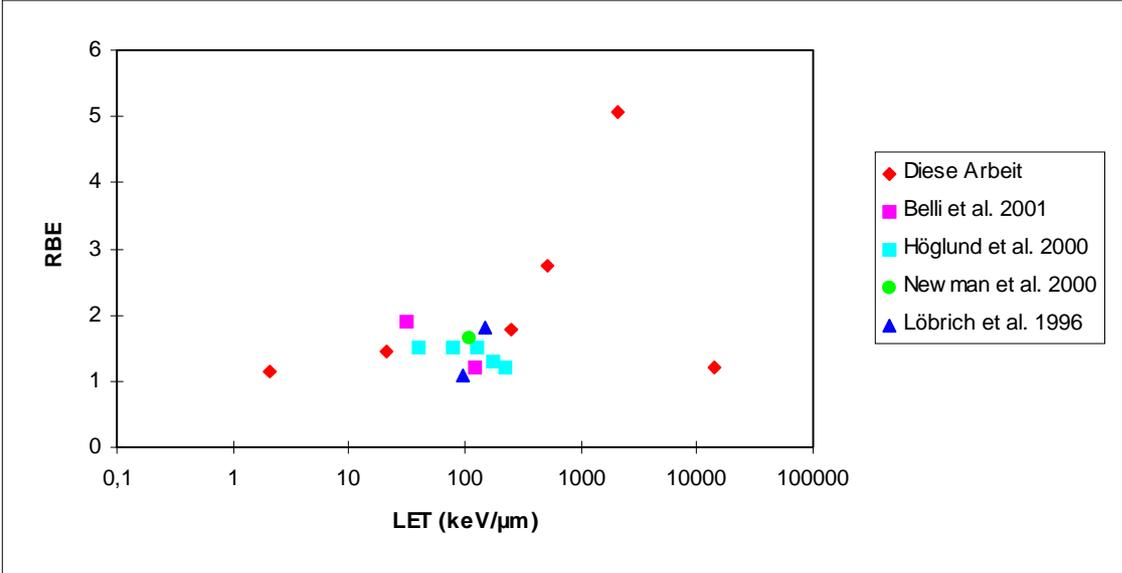
Ion	Energy (Mev/u)	LET (keV/μm)	DSB (Gy X Gpb) <sup>-1</sup>	RBE	Source
Co <sup>60</sup> gamma	-	-	7.0	1	Belli et al. 2001
Proton	0.7	31	13.3	1.9	"
He	2.9	123	8.3	1.2	"
Co <sup>60</sup> gamma	-	-	5.8	1	Höglund et al. 2000
He	0-22	40	8.8	1.5	"
N	36	80	8.6	1.5	"
N	16-25	125	8.6	1.5	"
N	14	175	7.6	1.3	"
N	10	225	6.9	1.2	"
250 kVp X-ray	-	-	7.3	1	Newman et al.2000
alpha	3.5	110	12.1	1.66	"
225 kVp X-ray	-	-	10.7	1	Löbrich et al.1996
N	29	97	12.0	1.1	"
F	900	150	18.9	1.8	"

Tabelle 9: Literaturwerte zur DSB-Rate (pro Gy and Gpb) nach Referenzbestrahlung und nach dicht-ionisierender Bestrahlung sowie zum RBE. In den hier aufgeführten Arbeiten wurde die Fragmentsumation zur DSB-Quantifizierung verwendet.

Neben der Eignung für die quantitative Analyse der DSB-Induktion sollte es der Simulationsansatz auch ermöglichen, verschiedene Modelle für die Chromatinstruktur und die radiale Dosisverteilung zu testen. In der vorliegenden Arbeit wurden erste Schritte in diese Richtung unternommen. Es muss jedoch festgestellt werden, dass die gegenwärtig vorhandenen Analysemethoden (Bestimmung des quadratischen Fehlers zwischen

experimenteller und simulierter DNA-Mengenverteilung) für eine abschließende Bewertung der Modelle nicht genügen, so dass hier nach besseren Bewertungskriterien gesucht werden muss.

Abbildung 12: Darstellung der RBE-Werte für DSB-Induktion aus den Tabellen 8 und 9



## 7 Referenzen

- Belli M, Cherubini R, Dalla Vecchia M, Dini V, Esposito G, Moschini G, Sapora O, Signoretti C, Simone G, Sorrentino E, Tabocchini MA (2001) DNA fragmentation in mammalian cells exposed to various light ions. *Adv. Space Res.* 27 : 393-399
- Chen J, Kellerer AM, Rossi HH. (1994) Radially restricted linear energy transfer for high-energy protons: a new analytical approach. *Radiat. Environ. Biophys.* 33: 181-187
- Cremer T, Cremer C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics* 2: 292-301
- Friedl AA. (1994) Entwicklung von Simulationsmethoden und deren Anwendung zur qualitativen und quantitativen Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen in niederen und höheren Eukaryonten. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Friedl AA, Kraxenberger A, Eckardt-Schupp F. (1995) An electrophoretic approach to the assessment of the spatial distribution of DNA double-strand breaks. *Electrophoresis* 16: 1865-1874.
- Friedland W, Jacob P, Paretzke HG, Merzagora M, Ottolenghi A. (1999) Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiat. Environ. Biophys.* 38: 39-47
- Höglund E, Blomquist E, Carlsson J, Stenerlöw B. (2000) DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial fragmentation. *Int. J. Radiat. Biol.* 76: 539-547
- Höglund E, Stenerlöw B. (2001) Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in normal human skin fibroblasts after exposure to radiation of different Linear Energy Transfer: possible roles of track structure and chromatin organization. *Radiat. Res.* 155: 818-825
- Kraxenberger, A, Friedl AA, Kellerer AM. (1994) Computer simulation of pulsed-field gel runs allows the quantitation of radiation-induced double-strand breaks in yeast . *Electrophoresis* 15: 128-136.

Kraxenberger F, Weber KJ, Friedl AA, Eckardt-Schupp F, Flentje M, Quicken P, Kellerer AM. (1998) DNA double-strand breaks in mammalian cells exposed to  $\gamma$ -rays and very heavy ions. *Radiat. Environ. Biophys.* 37: 107-115

Löbrich M, Cooper PK, Rydberg B. (1996) Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 70: 493-503

Münkel C, Langowski J (1998) Chromosome structure predicted by a polymer model. *Phys. Rev. E* 57: 5888-5896

Münkel C, Eils R, Dietzel S, Zink D, Mehring C, Wedemann G, Cremer T, Langowski J. (1999) Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment. *J. Mol. Biol.* 285: 1053-1065

Newman HC, Prise KM, Folkard M, Michael BD. (1997) DNA double-strand break distributions in X-ray and  $\alpha$ -particle irradiated V79 cells: evidence for non-random breakage. *Int. J. Radiat. Biol.* 71: 347-363

Newman HC, Prise KM, Michael BD (2000) The role of higher-order chromatin structure in the yield and distribution of DNA double-strand breaks in cells irradiated with X-rays and alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 : 1085-1093

Prise KM, Ahnström G, Belli M, Carlsson J, Frankenberg D, Kiefer J, Löbrich M, Michael BD, Nygren J, Simone G, Stenerlöw B. (1998) A review of dsb induction data for varying quality radiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 74: 173-184

Sachs RK, van den Engh G, Trask B, Yokota H, Hearst JE (1995) A random-walk/giant loop model for interphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2710-2714

Scholz M, Kellerer AM, Kraft-Weyrather W, Kraft G (1997) Computation of cell survival in heavy ion beams for therapy. *Radiat. Environ. Biophys.* 36 : 59-66

van den Engh G, Sachs R, Trask BJ (1992) Estimating genomic distance from DNA sequence location in cell nuclei by a Random Walk Model. *Science* 257: 1410-1411

Woodcock CL, Dimitrov S. (2001) Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 11: 130-135

Yokota H, van den Engh G, Hearst JE, Sachs RK, Trask BJ (1995) Evidence for the organization of chromatin in Megabase pair-sized loops arranged along a Random Walk path in the human G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> interphase nucleus. *J. Cell. Biol.* 130: 1239-1249

## Anhang

Abbildungen A1-A4 zeigen exemplarisch Vergleiche zwischen gemessenen DNA-Mengenverteilungen (nach Bestrahlung mit He-, O-, Ca- und U-Ionen) und simulierten Profilen nach Anwendung der verschiedenen Modellkombinationen. Die dazugehörigen optimalen Bruchraten (pro Gy und Gbp) sowie die erzielten quadratischen Fehler sind in den Tabellen A1 und A2 dargestellt.

Bestrahlung	I	II	III	IV
355.25 Gy $^4\text{He}^{2+}$ (LET 21 keV/ $\mu\text{m}$ , 8.4 MeV/u)	5.8	5.8	3.2	1.3
400 Gy $^{16}\text{O}^{8+}$ (LET 518 keV/ $\mu\text{m}$ , 4.1 MeV/u)	11.0	4.8	15.0	6.1
250 Gy Ca (LET 2100 keV/ $\mu\text{m}$ , 6.9 MeV/u)	20.3	10.4	12.0	6.0
900 Gy U (LET 14000 keV/ $\mu\text{m}$ , 9 MeV/u)	4.8	2.3	3.6	1.7

Tabelle A1: Bruchraten (Gy x Gbp)<sup>-1</sup> zu den in Abbildungen A1-A4 dargestellten Simulationen

Bestrahlung	I	II	III	IV
355.25 Gy $^4\text{He}^{2+}$ (LET 21 keV/ $\mu\text{m}$ , 8.4 MeV/u)	4.84e-04	5.06e-04	1.85e-04	1.87e-04
400 Gy $^{16}\text{O}^{8+}$ (LET 518 keV/ $\mu\text{m}$ , 4.1 MeV/u)	1.45e-04	2.32e-04	2.12e-04	2.04e-04
250 Gy Ca (LET 2100 keV/ $\mu\text{m}$ , 6.9 MeV/u)	2.22e-05	2.66e-05	1.33e-04	1.33e-04
900 Gy U (LET 14000 keV/ $\mu\text{m}$ , 9 MeV/u)	1.08e-04	1.14e-04	9.53e-05	1.05e-04

Tabelle A2: Quadratische Fehler zwischen Simulation und gemessenen DNA-Mengenverteilungen zu den in Abbildungen A1-A4 dargestellten Simulationen

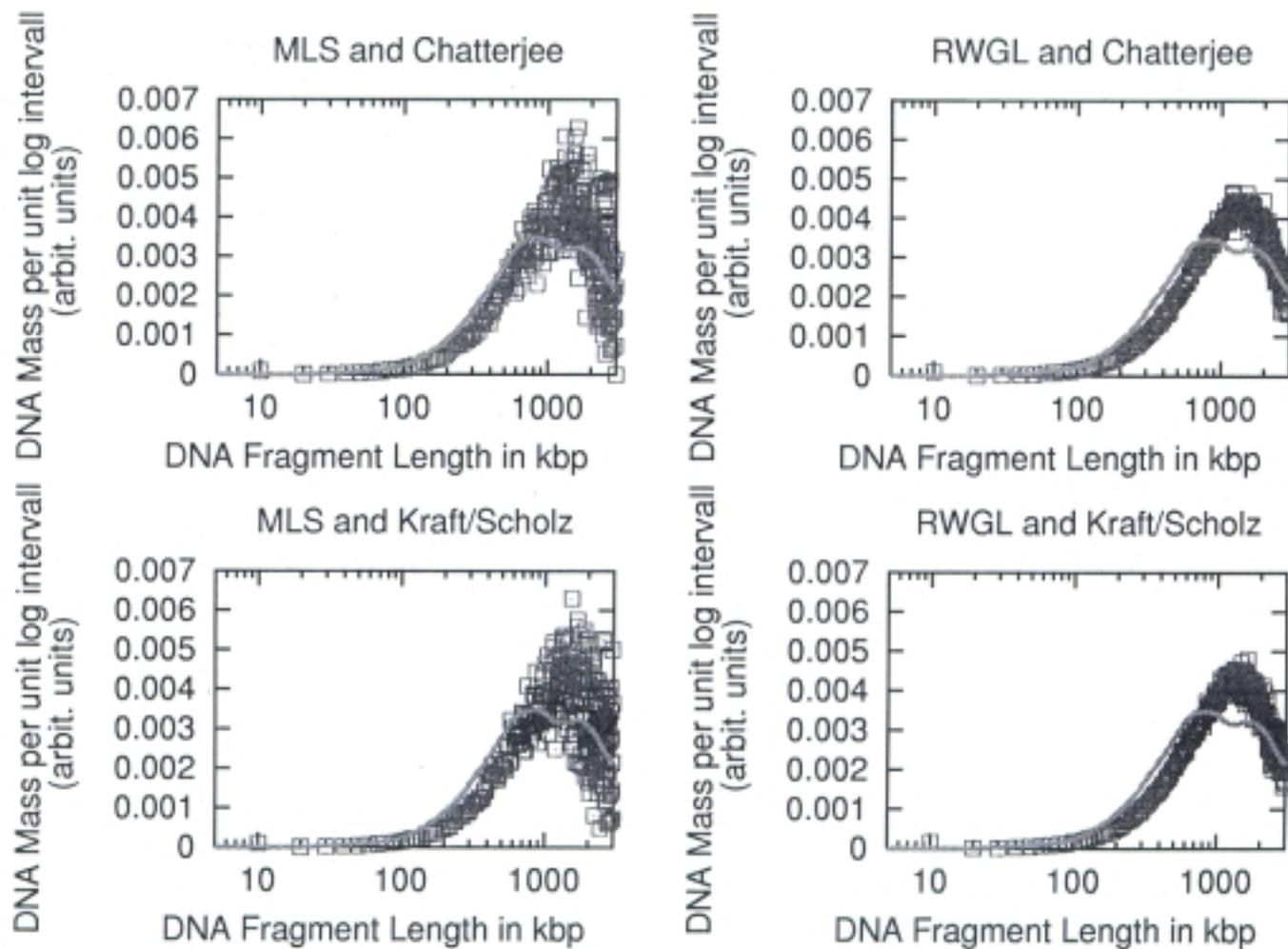


Abbildung A1: Vergleich zwischen gemessenen DNA-Mengenverteilungen (hellgrau) nach Bestrahlung mit Helium-Ionen (355 Gy) und bestangepassten simulierten Verteilungen (dunkelgrau) bei den verschiedenen Modellkombinationen

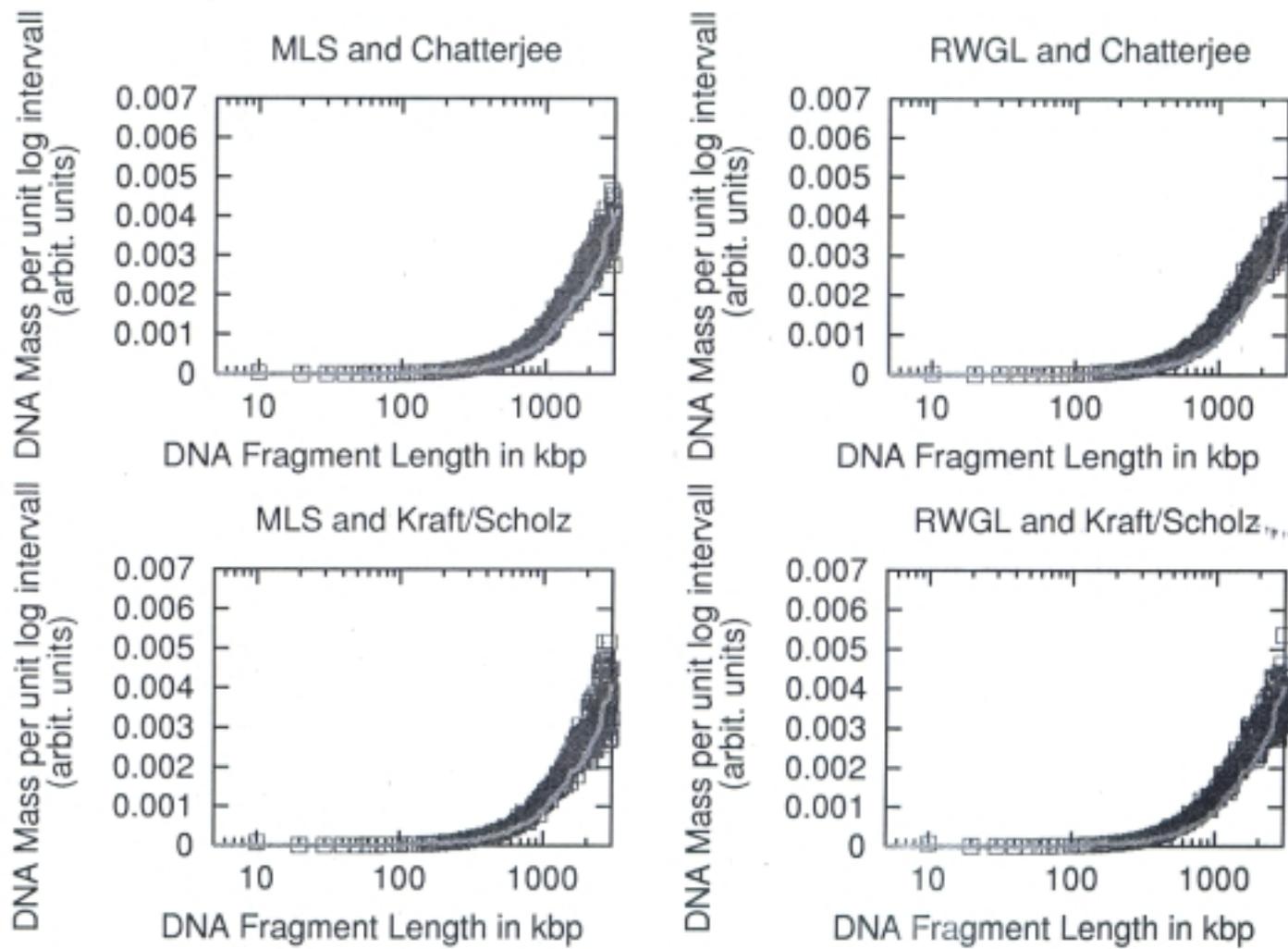


Abbildung A2: Vergleich zwischen gemessenen DNA-Mengenverteilungen (hellgrau) nach Bestrahlung mit Sauerstoff-Ionen (400 Gy) und bestangepassten simulierten Verteilungen (dunkelgrau) bei den verschiedenen Modellkombinationen

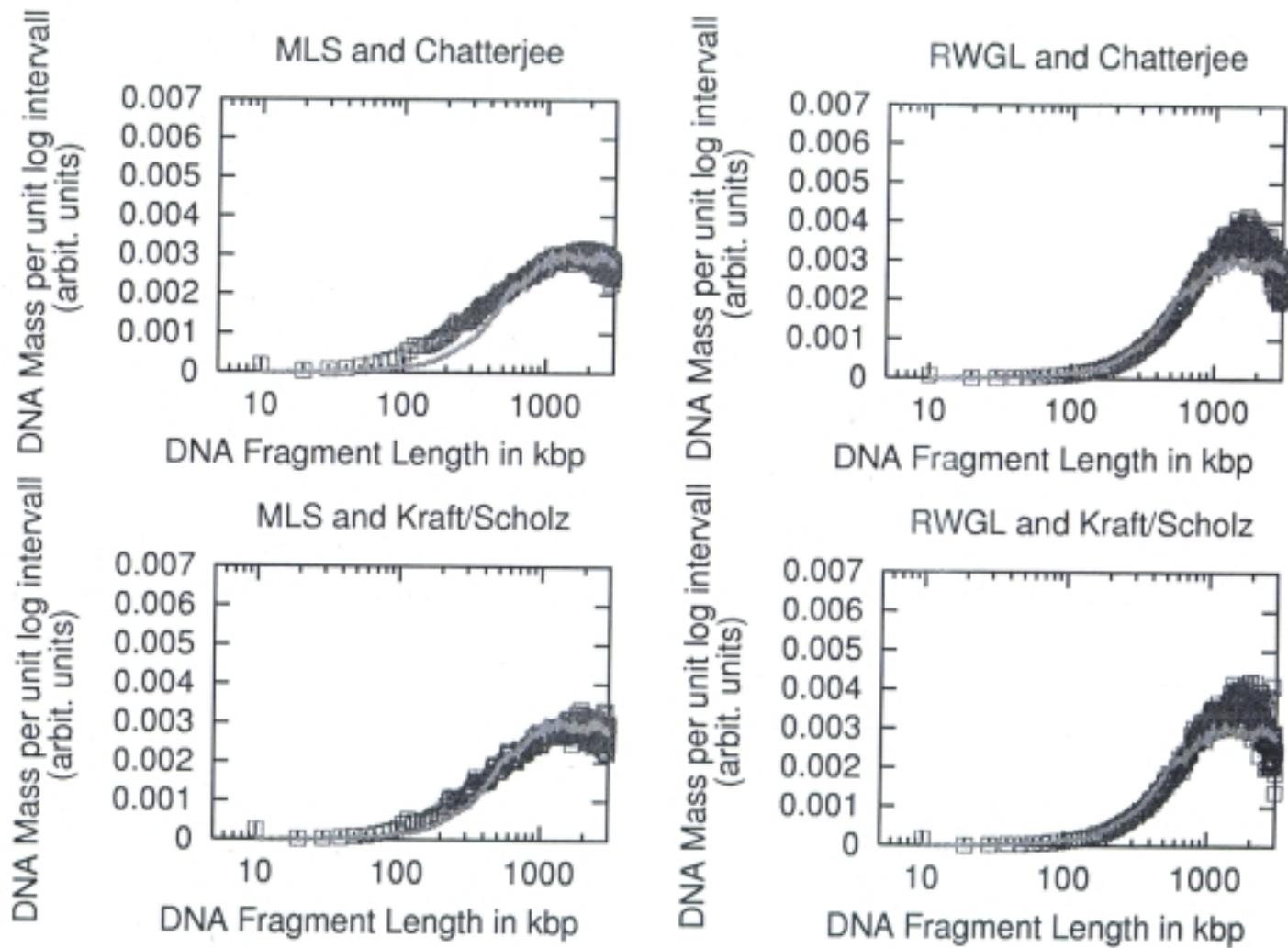
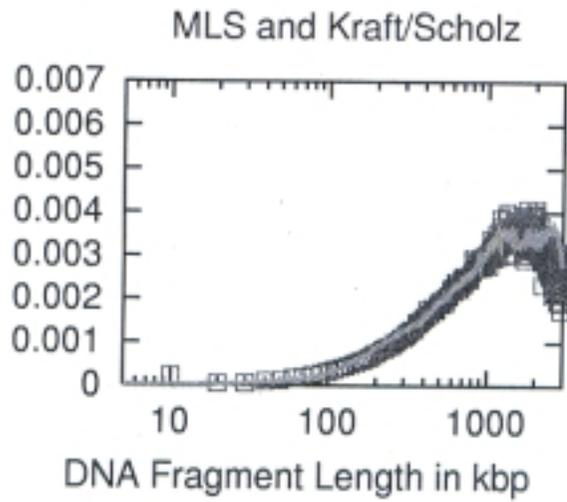
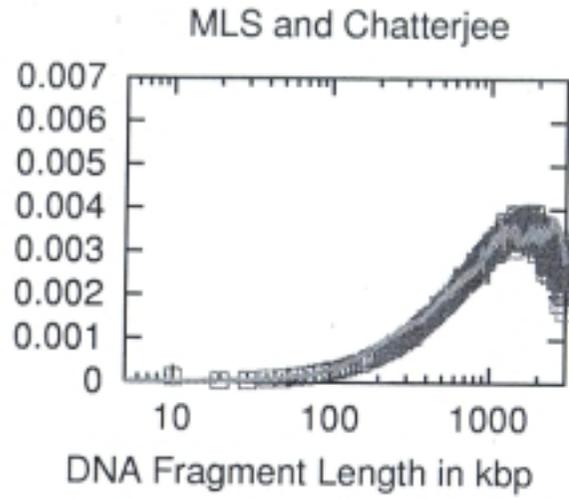


Abbildung A3: Vergleich zwischen gemessenen DNA-Mengenverteilungen (hellgrau) nach Bestrahlung mit Calcium-Ionen (250Gy) und bestangepassten simulierten Verteilungen (dunkelgrau) bei den verschiedenen Modellkombinationen

DNA Mass per unit log intervall (arbit. units)



DNA Mass per unit log intervall (arbit. units)

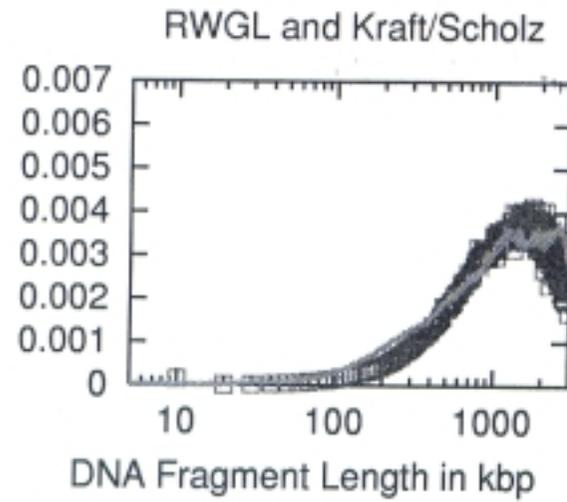
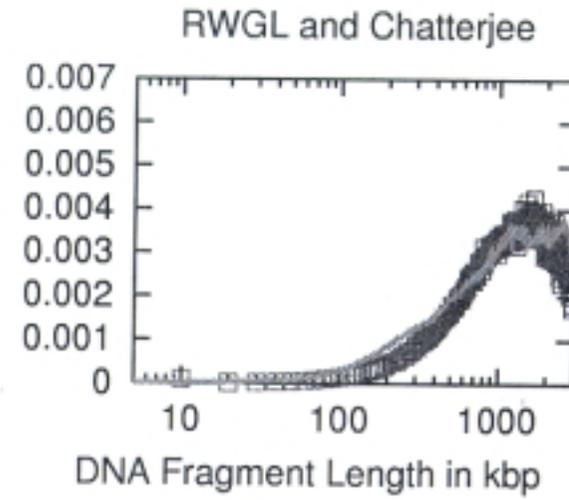


Abbildung A4: Vergleich zwischen gemessenen DNA-Mengenverteilungen (hellgrau) nach Bestrahlung mit Uran-Ionen (900 Gy) und bestangepassten simulierten Verteilungen (dunkelgrau) bei den verschiedenen Modellkombinationen