

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Jörg Kotzerke

**^{99m}Tc -HYNIC-DAPI-DNA-Bindungsnachweis und
Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI
mittels Agarose-Gelelektrophorese**

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
Doctor medicinae (Dr. med.)
Vorgelegt
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

von

Robert Punzet

aus Stuttgart Bad-Cannstatt

Dresden 2013

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Mündlichen Prüfung:

gez.: _____

Vorsitzender der Promotionskommission

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methode	2
2.1	Material	2
2.1.1	Plasmid-DNA.....	2
2.1.2	Chemikalien	3
2.1.3	Radionuklide und Bestrahlungssysteme.....	5
2.2	Methode	8
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	8
2.2.2	^{99m} Tc-DAPI-HYNIC-DNA-Bindungsnachweis.....	9
2.2.3	Charakterisierung der Plasmid pUC 19 Konformationen	10
2.2.4	Detektion und Quantifizierung	11
2.2.5	Experimentelles Design.....	11
2.2.6	Inkubationstemperatur und pH-Wert.....	12
2.2.7	Berechnung der Energiedosis	13
2.2.8	Statistische Auswertung	14
3	Ergebnisse	16
3.1	^{99m} Tc -HYNIC-DAPI -DNA-Bindungsnachweis.....	16
3.2	Standardisierung der Messergebnisse und Quantifizierung.....	17
3.2.1	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	17
3.2.2	Untersuchung der Intensitätsänderung der Banden bei unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen	20
3.3	Einfluss physikalischer und chemischer Parameter auf die Plasmid-DNA	21
3.3.1	Einfluss von DMSO auf die Plasmid-DNA	21
3.3.2	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Plasmidintegrität.....	22
3.3.3	Einfluss des pH-Wertes auf die Plasmidintegrität	24
3.3.4	Bestrahlung der Plasmid-DNA bei unterschiedlichen pH-Werten	26
3.4	Schädigung der Plasmid-DNA durch SnCl ₂ im TechneScan PYP-Kit	28
3.5	Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach Exposition von Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten.....	30
3.5.1	Bestrahlung des Plasmides mit Röntgenstrahlung	30
3.5.2	Bestrahlung mit dem β-Strahler Rhenium-188 (¹⁸⁸ Re)	31

3.5.3	Bestrahlung mit dem α -Strahler Radium-223 (^{223}Ra).....	33
3.5.4	Bestrahlung mit Tc-99m	37
3.5.5	Bestrahlung mit der Substanz Tc-99m-HYNIC-DAPI	39
3.6	Untersuchung der nicht-radioaktiven HYNIC-DAPI Derivate und Bestrahlung mit dem Referenzkit	41
3.6.1	Inkubation mit Tc-99-HYNIC-DAPI	41
3.6.2	Inkubation mit HYNIC-DAPI Substanz.....	44
3.6.3	Bestrahlung mit Referenzkit	46
4	Diskussion.....	48
4.1	Plasmid pUC 19	48
4.2	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI -DNA-Bindungsnachweis.....	49
4.3	Standardisierung der Messergebnisse und Quantifizierung.....	49
4.3.1	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	49
4.3.2	Untersuchung der Intensitätsänderung der Banden bei unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen	50
4.4	Einfluss physikalischer und chemischer Parameter auf die Plasmid-DNA	50
4.4.1	Einfluss von DMSO auf die Plasmid-DNA	50
4.4.2	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Plasmidintegrität.....	51
4.4.3	Einfluss des pH-Wertes auf die Plasmidintegrität mit und ohne Bestrahlung ...	51
4.5	Schädigung der DNA durch SnCl_2 im TechneScan PYP-Kit	52
4.6	Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach Exposition von Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten.....	53
4.6.1	Bestrahlung des Plasmides mit Röntgenstrahlung	53
4.6.2	Bestrahlung mit dem β -Strahler Rhenium-188 (^{188}Re).....	53
4.6.3	Bestrahlung mit dem α -Strahler Radium-223 (^{223}Ra).....	55
4.6.4	Bestrahlung mit Tc-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$).....	56
4.6.5	Bestrahlung mit der Substanz Tc-99m-HYNIC-DAPI	58
4.7	Untersuchung der nicht-radioaktiven HYNIC-DAPI Derivate und Bestrahlung mit dem Referenzkit	60
4.7.1	Inkubation mit Tc-99-HYNIC-DAPI	60
4.7.2	Inkubation mit HYNIC-DAPI Substanz.....	61
4.7.3	Bestrahlung mit Referenzkit	61
4.8	Übersicht Radionuklidbestrahlung und Vergleich mit externer Röntgenstrahlung ...	62
4.8.1	Vergleich der Reduktion der Supercoiled-Fraktion nach Bestrahlung	62

4.8.2	Vergleich der ESB:DSB Verhältnisse	63
4.9	Methodische Limitationen.....	64
4.10	Ausblick.....	65
5	Zusammenfassung.....	66
6	Abstract.....	68
7	Anhang.....	70
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	70
7.2	Tabellenverzeichnis.....	73
7.3	Chemikalenliste.....	76
7.4	Geräte und sonstige Materialien.....	76
7.5	Tabellen mit Daten zu den Abbildungen.....	77
7.5.1	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	77
7.5.2	Untersuchung der Intensitätsänderung der Banden bei unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen	79
7.5.3	Einfluss von DMSO auf die Plasmid-DNA	80
7.5.4	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Plasmidintegrität.....	80
7.5.5	Einfluss des pH-Wertes auf die Plasmidintegrität	81
7.5.6	Bestrahlung der Plasmid-DNA bei unterschiedlichen pH-Werten	83
7.5.7	Schädigung der Plasmid-DNA durch SnCl ₂ im TechneScan PYP-Kit	84
7.5.8	Bestrahlung des Plasmides mit Röntgenstrahlung	85
7.5.9	Bestrahlung mit dem β -Strahler Rhenium-188 (¹⁸⁸ Re).....	86
7.5.10	Bestrahlung mit dem α -Strahler Radium-223 (²²³ Ra).....	90
7.5.11	Bestrahlung mit Tc-99m	94
7.5.12	Bestrahlung mit der Substanz Tc-99m-HYNIC-DAPI	97
7.5.13	Inkubation mit Tc-99-HYNIC-DAPI	100
7.5.14	Inkubation mit HYNIC-DAPI Substanz.....	101
7.5.15	Bestrahlung mit Referenzkit	102
8	Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens	105
9	Erklärung zur Einhaltung gesetzlicher Vorgaben	106
10	Danksagung	107
11	Literaturverzeichnis.....	108

Verzeichnis der Abkürzungen

^{188}Os	Osmium-188
^{188}Re	Rhenium-188
^{188}Wo	Wolfram-188
^{210}Po	Polonium-210
^{223}Fr	Francium-223
^{223}Ra	Radium-223
^{229}Rn	Radon-229
^{235}U	Uran-235
^{99}Mo	Molybdän-99
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Metastabiles Technetium-99m
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
ESB	Einzelstrangbruch
EtBr	Ethidiumbromid
HEDP	Hydroxyethylidendiphosphonsäure
HWZ	Halbwertszeit
LET	Linearer Energietransfer
lin	Linearisierte DNA
oc	open circle DNA
PYP	Pyrophosphat
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
sc	Supercoiled DNA
SEM	Standard Error of the Mean
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
VK	Variationskoeffizient

1 Einleitung

Das Radionuklid ^{99m}Tc ist in der nuklearmedizinischen Diagnostik das am häufigsten genutzte Radionuklid. Dies liegt an den günstigen strahlenphysikalischen Eigenschaften wie der kurzen HWZ von 6 Stunden, der Emission von γ -Strahlung geringer Energie ($E_\gamma=142\text{keV}$) und der nicht vorhandenen β -Strahlung. Neben γ -Strahlung emittiert ^{99m}Tc pro Zerfall zusätzlich fünf Auger- und Konversionselektronen. Diese niederenergetischen Elektronen haben eine Reichweite von wenigen nm bis zu einigen μm . Da sie ihre Energie auf dieser kurzen Strecke abgeben (hoher Linearer Energietransfer (LET)), können lokal sehr hohe Energiedichten erreicht werden (Howell 1992). Ionisierende Strahlung mit hohem LET verursacht DNA-Schäden von größerer Komplexität. Es konnte bisher gezeigt werden, dass in die Zelle aufgenommenes ^{99m}Tc zu einem geringeren Zellüberleben im Vergleich zur externen Bestrahlung führt (Kotzerke et al. 2012). Eine überproportionale DNA-Schädigung konnte im Zellversuch nicht nachgewiesen werden, da sich ^{99m}Tc vorwiegend im Zytoplasma und nicht im Zellkern anreicherte. Eine Lokalisierung der Auger-Emitter ^{123}I und ^{125}I im Zellkern und an die DNA mithilfe der DNA-bindenden Farbe Hoechst 33342 konnte bereits gezeigt werden (Balagurumoorthy et al. 2006; Yasui et al. 2007). Dabei wurde nachgewiesen, dass die DNA-gebundenen Auger-Emitter ^{123}I und ^{125}I DSB erzeugen, welche nicht radikalvermittelt (indirekt) sind, sondern auf einer direkten Schädigung der DNA beruhen. Da Zellkulturen über Schutz- und Reparaturmechanismen verfügen, ist die Adressierung des Zellkerns beeinträchtigt. In dieser Arbeit wurde ein Testsystem bestehend aus isolierter Plasmid-DNA genutzt. In der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Dresden, konnte ^{99m}Tc mittels eines HYNIC-Linkers an den DNA-Farbstoff DAPI gebunden werden. Die Substanz ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI wurde in eigenen Experimenten verwendet, um ^{99m}Tc in unmittelbare DNA-Nähe zu bringen, da DAPI an die kleine Furche in AT-reiche Regionen der DNA bindet. Ziel dieser Arbeit war es, die Dosis-Wirkung verschiedener Strahlenqualitäten auf Plasmid-DNA zu untersuchen und durch Zugabe des Radikalfängers DMSO zu bestimmen, ob es sich um radikalvermittelte oder direkte Strangbrüche handelt. Zur Quantifizierung der Strangbrüche wurde die Agarose-Gelelektrophorese gewählt, mit der es möglich ist DNA-Konformationen elektrophoretisch aufzutrennen. Diese Methode beruht darauf, dass Strangbrüche die Plasmidkonformation ändern und die Konformationen über unterschiedliche Laufeigenschaften in der Elektrophorese auftrennbar sind.

Hauptziel der Arbeit war der Vergleich der Radiotoxizität von ungebundenem ^{99m}Tc und gebundenem ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI und die Frage, ob die Auger-Elektronen zu einer Zunahme an direkten DSB bei Bestrahlung durch ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI führen. Als Nebenaspekte werden die Dosis-Wirkung und die Schädigungsqualität (direkt/indirekt) unterschiedlicher Strahlenqualitäten auf die Plasmid-DNA untersucht.

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Plasmid-DNA

Plasmid pUC 19

Plasmide sind extrachromosomale, meist doppelsträngige DNA-Moleküle ohne Proteine und kommen in der Regel in Bakterien vor. Sie sind oft Träger von Antibiotikaresistenzgenen und können zwischen Bakterien ausgetauscht werden. Das Plasmid pUC (plasmid University of California) 19 ist ein künstlich hergestelltes bakterielles Plasmid mit 2686 Basenpaaren und ist ein Derivat des Plasmids pBR322. (Lin-Chao et al. 1992)

Als Plasmide kamen pUC 19 Vektoren unterschiedlicher Hersteller zum Einsatz.

- pUC 19 der Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland (www.carl-roth.de)
- pUC 19 der Firma New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland (www.neb-online.de)
- pUC 19 hergestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. Jessberger vom Institut Physiologische Chemie der TU Dresden

1 kbp Plus DNA-Leiter / Marker

Um im Gel zu erkennen, wie weit Bruchstücke einer spezifischen Anzahl an Basenpaaren gewandert sind, wurden auf jedes Gel zwei Spuren mit Marker aufgetragen. Es wurde bei allen Versuchen die 1kbp DNA-Leiter der Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, verwendet, welcher sich optimal für die Größenbestimmung von Plasmidsträngen zwischen 500 bp und 10000 bp eignet (Herstellerangabe). Abb. 1 zeigt ein Bild des Markers mit entsprechender Beschriftung der Banden.

Ein quantitativer Vergleich der Banden ist möglich, da es eine lineare Abhängigkeit zwischen DNA-Konzentration und Fluoreszenz gibt. (Le Pecq und Paoletti 1966)

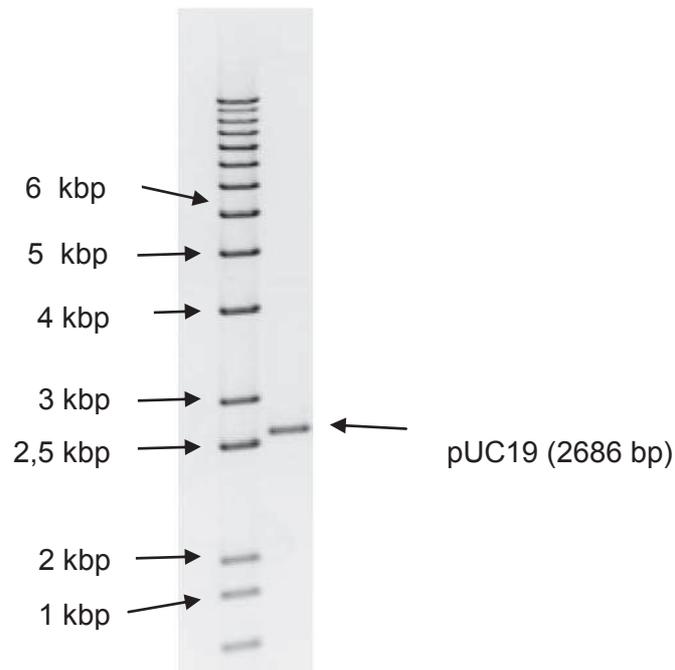


Abb. 1: 1 kbp Plus DNA-Leiter / Marker und Plasmid im Agarosegel (1,4 %)

2.1.2 Chemikalien

Ethidiumbromid (EtBr)

Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der verwendet wird, um DNA und RNA anzufärben. Er interkaliert in die DNA (Begusova et al. 2000) und verfügt über zwei Absorptionsbanden im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 210 nm und 285 nm. Die Emissionsbande von EtBr liegt im sichtbaren Bereich bei 605 nm Wellenlänge. Die Fluoreszenz-Emission des orangefarbenen Lichtes nimmt nach Interkalation um den Faktor 50-100 zu.

Unter UV-Licht werden so die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Konformationen zur Fluoreszenz angeregt und mit einer CCD-Kamera in einer Darkbox (Diana III Digital Imaging System) aufgenommen.

Agarose

Als Agarose bezeichnet man ein Polysachharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose. Sie wird benutzt um Gele für die Agarose-Gelelektrophorese herzustellen, wobei die Konzentration abhängig von der Größe der aufzutrennenden Moleküle gewählt werden muss. In der Versuchsreihe werden 1,4 % Agarosegele verwendet.

Es wird in allen Versuchen Agarose NEEO Ultra-Qualität von der Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, verwendet.

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dimethylsulfoxid ist ein organisches Lösungsmittel. In der Literatur wird beschrieben, dass DMSO als Radikalfänger Strahlenschäden verhindern kann (Goddu et al. 1996). Es bildet mit Hydroxylradikalen Komplexe und verhindert so eine Zell- oder DNA-Schädigung durch radikalvermittelte Effekte. In den Versuchen wurde 0,2 M DMSO verwendet. (Balagurumoorthy 2012)

Zinn-Pyrophosphat (Sn-PYP)

In der nuklearmedizinischen Diagnostik wird Sn-PYP dazu verwendet um Erythrozyten zu markieren. Dies wird bei der Blutpool-Szintigraphie eingesetzt, bei der die links- und rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion bestimmt werden kann. Ebenfalls ist es möglich eine Blutungsquellenszintigraphie anzufertigen, um verdeckte abdominale Blutungen zu finden. Erythrozyten können in vivo und in vitro markiert werden.

Für die Markierung ist ein Reduktionsmittel von entscheidender Bedeutung. Das Zinn-Kation Sn^{2+} übernimmt diese Aufgabe (Weinstein et al. 1971). Im Sn-PYP-Kit liegt das Zinn als Zinnchlorid (SnCl_2) vor, welches allerdings zur Hydrolyse und Oxidation neigt. Pyrophosphat dient als Ligand, der dies verhindert, indem ein stabiler Zinn-Pyrophosphatkomplex gebildet wird (Doly et al. 1982). In der Literatur wird beschrieben, dass Zinnchlorid Schäden an Plasmid-DNA und in Zellen induziert, welche durch Hydroxylradikale vermittelt werden (Assis et al. 1998; de Mattos et al. 2000; Guedes et al. 2006). Diese werden vermutlich durch die Fenton-ähnliche Reaktion verursacht (Dantas et al. 1996).

Es wurde das TechneScan PYP-Kit der Firma Mallickrodt Medical BV, Petten, Niederlande, verwendet. Eine Durchstechflasche mit 24 mg Pulver enthält 20 mg Natriumdiphosphat (PYP) x 10 H_2O und 4 mg Zinn-(II)-chlorid-Dihydrat.

2.1.3 Radionuklide und Bestrahlungssysteme

Röntgenröhre

Zur Bestrahlung der Plasmide wurde die Röntgenröhre des „Zentrums für Innovationskompetenz für Medizinische Strahlenforschung in der Onkologie - OncoRay“, Dresden, Deutschland verwendet. Bei der Röntgenröhre handelte es sich um den Typ Xylon Y.TU 320 mit einer Eigenfilterung von 3 mm Beryllium (Be) und 3 mm Aluminium (Al). Die Röhre wurde mit einer Spannung von 200 kV und einer Stromstärke von 20 mA betrieben. Es wurde eine Kupfer-Kollimatorplatte WBI verwendet. Die Dosisleistung der Röntgenröhre betrug 1,235 Gy/min.

Technetium-99m ($^{99m}\text{TcO}_4^-$)

Bei ^{99m}Tc handelt es sich um das wichtigste in der nuklearmedizinischen Diagnostik verwendete Nuklid. Es ist metastabil mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 6 h und emittiert γ -Strahlung mit einer Energie von 140 keV. Es verfügt über einen niedrigen LET von 1 keV/ μm (Howell 1992). ^{99m}Tc entsteht aus Molybdän-99 (^{99}Mo), welches zu 86 % in ^{99m}Tc und zu 14 % in ^{99}Tc zerfällt. Durch Elution eines $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generators (Tyco Healthcare GmbH/Coviedien, Neustadt/Donau, Deutschland) mit NaCl 0,9% erhält man ^{99m}Tc , welches als Pertechnetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) vorliegt. Das metastabile ^{99m}Tc zerfällt unter γ -Emission zu ^{99}Tc , welches durch β -Zerfall und sehr langer Halbwertszeit von 2×10^5 Jahren zum stabilen Ruthenium-99 (^{99}Ru) zerfällt. Zusätzlich zum γ -Zerfall werden auch niederenergetische Elektronen mit hohem linearem Energietransfer (LET), sogenannte Konversions- und Auger-Elektronen emittiert. Der Zerfall von ^{99m}Tc zu ^{99}Tc verläuft in zwei Schritten. Zuerst geht der Zustand mit 142,7 keV durch innere Konversion in einen Zustand mit 140,5 keV über. Aus diesem Übergang resultiert die Emission von Konversionselektronen. Die so entstandene freie Stelle auf der Elektronenschale, kann durch ein Elektron eines höheren Energieniveaus aufgefüllt werden. Die somit freigewordene Energie kann zur Emission eines Elektrons aus einer höheren Schale führen, dem sogenannten Auger-Elektron, benannt nach dem Entdecker dieses Effektes, Pierre Victor Auger (Humm et al. 1994). Anschließend wird die restliche Energie von 140,5 keV als γ -Strahlung frei und es entsteht ^{99}Tc . Konversions- und Auger-Elektronen, besitzen eine Reichweite von ca. 2 nm – 250 μm (Howell 1992). Auger-Elektronen verfügen im Allgemeinen über eine geringere Energie und Reichweite, sowie einen höheren LET als die Konversionselektronen (Howell 1992).

Tabelle 1: Emissionsspektrum von ^{99m}Tc . Dargestellt sind Emissionen mit einer Häufigkeit von > 1 %. Die Aufteilung der Rubriken erfolgte nach Howell, 1992.

Strahlung	Energie	Yield	Reichweite	LET
	[MeV]	[1/Zerfall]	[μm]	[keV/ μm]
Gamma	1,41E-01	8,89E-01		~ 1
X-ray $\text{K}\alpha_1$	1,84E-02	2,89E-02		
X-ray $\text{K}\alpha_2$	1,83E-02	2,17E-02		
CK NNX	3,34E-05	1,98E+00	2,05E-03	16,3
CK LLX	4,29E-05	1,93E-02	2,38E-03	15,2
CK MMX	1,14E-04	7,47E-01	5,98E-03	19,4
Auger MX Y	2,26E-04	1,10E+00	1,05E-02	21,5
IC 1 M,N ...	1,83E-03	9,91E-01	1,65E-01	11
Auger LMM	2,05E-03	8,68E-02	1,99E-01	10,3
Auger LMX	2,32E-03	1,37E-02	2,41E-01	9,6
Auger KLL	1,53E-02	1,26E-02	5,57E+00	2,7
IC 2 K	1,19E-01	8,43E-02	1,93E+02	0,6
IC 2 L	1,73E-01	1,36E-02	2,44E+02	0,7

Rhenium-188 ($^{188}\text{ReO}_4$)

^{188}Re entsteht aus Wolfram-188 (^{188}W) durch β -Zerfall. Es wird aus einem $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Generator durch Elution mit Kochsalzlösung eluiert und hat eine Halbwertszeit von 16,9 Stunden. ^{188}Re zerfällt unter β -Emission zu Osmium-188 (^{188}Os). Seine maximale β -Energie beträgt 2,2 MeV, die mittlere β -Energie beträgt 765 keV und seine γ -Strahlung hat eine Energie von 155 keV. Es hat einen niedrigen LET von 0,2 keV/ μm . In der Nuklearmedizin wird ^{188}Re unter anderem an das Bisphosphonat Hydroxyethylidendiphosphonsäure (HEDP) gekoppelt und zur palliativen Therapie von ossären Metastasen verwendet (Knapp et al. 1997; Palmedo et al. 2000; Liepe et al. 2003).

Das ^{188}Re wurde aus einem Generator der Firma ITM Isotopen Technologien München AG, Garching, Deutschland, gewonnen.

Radium-223 ($^{223}\text{RaCl}_2$)

Als α -Strahler wurde mit ^{223}Ra ein Isotop des Radiums mit einer Halbwertszeit von 11,4 Tagen verwendet. Es handelt sich um einen α -Strahler, mit einem geringen β -Anteil von 3,6 % und einem γ -Anteil von nur 1,1 %. Die mittlere Energie-Emission der α -Strahlung beträgt 5,98 MeV. ^{223}Ra ist ein sehr seltenes Metall, welches natürlich durch α -Zerfall aus Thorium-227 (^{227}Th), sowie durch β -Zerfall aus Francium-223 (^{223}Fr) entsteht. Der Tochterkern des ^{223}Ra ist ^{223}Rn , das

durch α -Zerfall aus ^{223}Ra entsteht. Beim Zerfall der α -Strahler wird ein Heliumatomkern ausgesendet. Diese massereichen Teilchen verfügen über einen hohen linearen Energietransfer (LET), d.h. die komplette Energie der Teilchen wird auf einer sehr kurzen Weglänge abgegeben. In der Nuklearmedizin wird ^{223}Ra neuerdings in der Therapie von Knochenmetastasen eingesetzt. Nach der Injektion wird Radiumchlorid, aufgrund seiner Eigenschaft als Kalzium-Mimetikum im Knochen eingelagert (Parker et al. 2013; Lassmann und Nosske 2013). Die Metastasen verfügen über einen erhöhten Kalziumumsatz im Vergleich zum physiologischen Knochengewebe, darum wird das ^{223}Ra vermehrt in den Metastasen angereichert (Cheetham und Petrylak 2012). Vorteil der kurzen Reichweite ist die Schonung des umgebenden Normalgewebes.

In neuesten Studien wurde das Radiopharmazeutikum Alpharadin der Norwegischen Firma Algeta ASA untersucht. In einer randomisierten Doppelblindstudie (Phase II) konnte eine signifikante Verlängerung des Überlebens bei Patienten mit einem kastrations-resistentem-Prostatakarzinom festgestellt werden (Nilsson et al. 2013; Parker et al. 2013).

Eine Phase III Studie konnte Schmerzreduktion, eine Stabilisierung des Prostata-Spezifischen-Antigens (PSA) und eine Normalisierung der Alkalischen Phosphatase zeigen (Croke et al. 2012).

Wir bezogen $^{223}\text{RaCl}_2$ vom Institut für Energie und Technologie, Kjeller, Norwegen.

Tc-99m-HYNIC-DAPI ([Tc-99m]Tc(Tricin)₂HYNIC-DAPI)

Aufgrund der sehr kurzen Reichweite von Auger- und Konversionselektronen, wird eine direkte Schädigung der DNA erst erwartet, wenn sich das emittierende Radionuklid sehr nah an der DNA befindet, da die Reichweite der Auger-Elektronen nur wenige Nanometer beträgt (Howell 1992).

Beim Plasmid ist die DNA frei zugänglich, da schützende Proteine oder Zellwandbarrieren fehlen. Bei der Inkubation von Plasmid-DNA mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ist keine Bindung an die DNA zu erwarten. Aus diesem Grund wurde in der Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Dresden, eine Substanz entwickelt, um $^{99\text{m}}\text{Tc}$ an die DNA zu binden bzw. in DNA-Nähe zu bringen. (Abb. 2) 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich in AT-reichen Regionen der kleinen Furche (minor groove) der Doppelstrang-DNA (ds-DNA) anlagert (Tanious et al. 1992). Mittels eines HYNIC-Linkers am DAPI, kann eine Markierung mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ an DAPI stattfinden. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ kann somit in unmittelbare DNA Nähe gebracht werden.

Für weitere Informationen verweise ich auf die Dissertation von Frau Sandra Ferl.

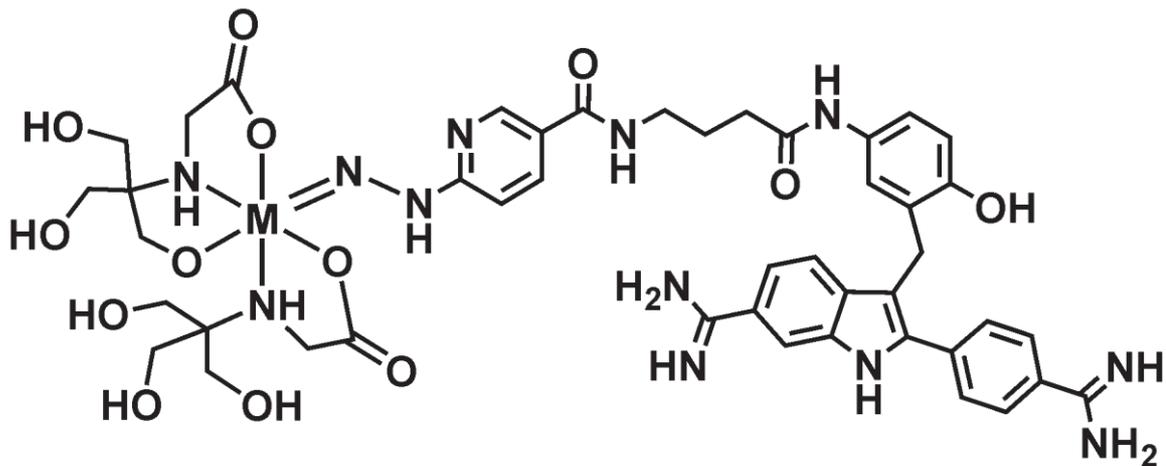


Abb. 2: Strukturformel [^{99m}Tc]Tc(Tricin) $_2$ HYNIC-DAPI; M = ^{99m}Tc

2.2 Methode

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode um Nukleinsäuren (DNA und RNA) nach ihrer Größe aufzutrennen (De Mattos et al. 2004). Die Konzentration des Agarosegels, bestimmt die Größe der Poren im Gel und damit wie engmaschig das Polysaccharidnetz im Gel ist. In dieser Arbeit wurden 1,4%ige Agarosegele verwendet. Um diese herzustellen, wurden 2,1 g Agarose in 150 ml TAE-Puffer gelöst. Dieses Gemisch wurde in der Mikrowelle bis kurz vor den Siedepunkt erhitzt und anschließend geschüttelt bis eine klare Flüssigkeit entstand. Anschließend wurde das Gemisch in die Elektrophoresekammer gegeben und der ein PVC-Kamm in das noch flüssige Gel getaucht. Nach Erkalten und Erhärten ergeben sich die Geltaschen, die die Proben aufnehmen. Die Elektrophoresekammer füllte man mit TAE-Puffer, bis das Gel 1mm mit Puffer überdeckt war. Nun konnten die Proben aufgetragen werden.

Der in den Proben enthaltene Ladepuffer mit Bromphenolblau wandert parallel zur DNA mit einer Größe von ca. 450 bp. Dieser enthält unter anderem Saccharose, welche die Dichte der Probe erhöht und somit dafür sorgt, dass die Probe am Boden der Geltasche bleibt und nicht in die Elektrophoresekammer ausgewaschen wird. Um eine Überhitzung und ein Schmelzen des Agarosegels zu verhindern, wurde die Elektrophoresekammer während des Laufs gekühlt. (Abb. 3: Agarose-Gelelektrophorese) Die negativ geladene DNA wandert je nach Konformation der

Plasmid-DNA unterschiedlich schnell zur Anode. Kleinere Moleküle legen die größte Wanderungstrecke zurück und es erfolgt eine Auftrennung der unterschiedlichen DNA-Konformationen. Anders als bei Proteinen ist bei Nukleinsäuren das Verhältnis zwischen Ladung und Größe (in Basenpaaren) konstant. Für lineare doppelsträngige DNA-Fragmente besteht im elektrischen Feld eine lineare Abhängigkeit zwischen dem dekadischen Logarithmus der Fragmentlänge (in Basenpaaren) und der relativen Wanderungsdistanz. Das Wanderungsverhalten nicht-linearer DNA kann nicht mit linearer Standard-DNA verglichen werden, da sich ringförmige DNA im Agarosegel völlig anders verhält. (Quelle: Gentechnische Methoden - Chemgapedia)



Abb. 3: Agarose-Gelelektrophorese mit Elektrophorese- und Stromversorgungseinheit

2.2.2 ^{99m}Tc -DAPI-HYNIC-DNA-Bindungsnachweis

Um eine Bindung von ^{99m}Tc -DAPI-HYNIC an die DNA nachzuweisen, wurden 10 MBq bzw. 20 MBq ^{99m}Tc -DAPI-HYNIC und 10 MBq bzw. 20 MBq ^{99m}Tc mit jeweils 200 ng Plasmid-DNA inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Agarose-

Gelelektrophorese durchgeführt. Unter Anregung durch UV-Licht wurden die Banden der sc-Fractionen ausgeschnitten und die gebundene Aktivität mittels Gamma-Counter (Typ Cobra II) ermittelt.

2.2.3 Charakterisierung der Plasmid pUC 19 Konformationen

Plasmide sind extrachromosomale häufig in Bakterien vorkommende und meist doppelsträngige DNA-Moleküle. Sie liegen in einer Supercoiled-Konformation vor. Supercoiled-DNA ist dicht gepackt und legt aufgrund ihrer geringen Größe den weitesten Weg im Agarosegel zurück. Nachdem ein DNA-Strang beschädigt wurde und somit ein Einzelstrangbruch (ESB) entstanden ist, wird die Supercoiled-Form entspannt und es entsteht eine ringförmige (open circle) DNA. Diese relativ „sperrige“ Form legt die kürzeste Strecke im Agarosegel zurück. Sollte ein DSB entstehen, entweder durch einen zweiten Bruch am komplementären Strang in der Nähe eines ESB oder durch einen DSB in einem Supercoiled-Plasmid, ändert sich die Plasmid-Konformation hin zu einem linearen (lin) Plasmid. Diese Form läuft mit einer Geschwindigkeit im Agarosegel, die zwischen der Supercoiled- und Open Circle-Form liegt. Die Wandergeschwindigkeiten sehen also wie folgt aus: $sc > lin > oc$. In Abb. 4 sind die verschiedenen Plasmid-Konformationen im elektronenmikroskopischen Bild dargestellt.

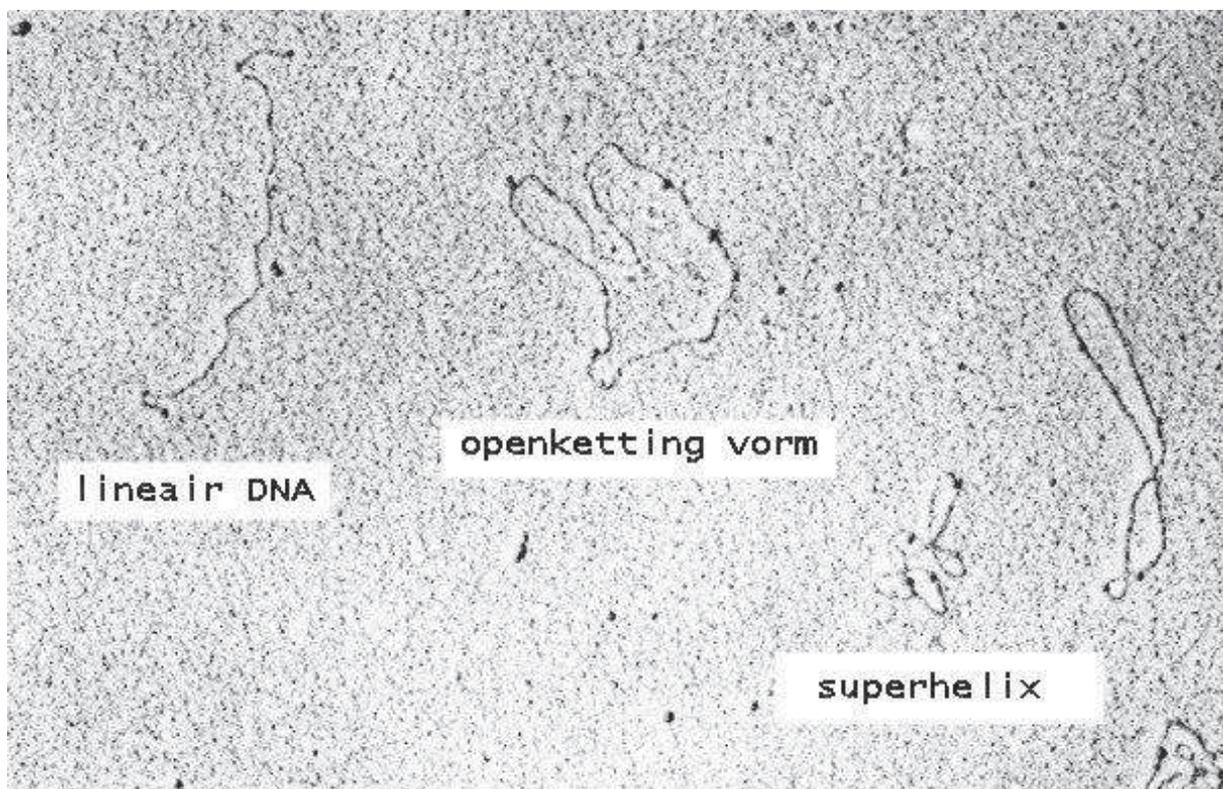


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme verschiedener Plasmidkonformationen (Quelle: Wikimedia, Photograph sec11; Lizenz: Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported)

2.2.4 Detektion und Quantifizierung

Zur Bestimmung der Intensität der Banden wurde das Programm Fiji verwendet, eine Software zur Analyse von biologischen Bildern (Schindelin et al. 2012). Es handelt sich bei Fiji um ein Bildbearbeitungsprogramm, mit dem sich die Intensität der DNA-Banden berechnen lässt. Die Intensitätsänderungen der verschiedenen Konformationen (sc, oc, lin) konnten anschließend verglichen werden.

2.2.5 Experimentelles Design

Die Proben wurden in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen inkubiert. Es wurde immer dieselbe Pipettierreihenfolge eingehalten.

- Plasmid
- DMSO
- Entionisiertes Wasser
- Radionuklid / Röntgenstrahlung / Chemotoxische Substanzen

Jede Probe wurde auf ein Volumen von 20 µl eingestellt und für 1 h inkubiert. Danach konnten 10 µl je Probe abpipettiert und in neue Mikroreaktionsgefäße gegeben werden. Diese wurden für weitere 23 Stunden inkubiert und ergaben den 24 Stunden Wert.

Die verbleibenden 10 µl versetzte man mit 1,25 µl Ladepuffer (Gel Ladepuffer 10X BlueJuice™). Von diesen 11,25 µl Gesamtvolumen wurden 10 µl auf das Agarosegel aufgetragen, die einer Plasmidmenge von 100 ng pro Geltasche entsprechen. Pro Experiment wurden zwei Mikroreaktionsgefäße mit je 1,5 µl (1500 ng) Marker pipettiert und mit 18,5 µl entionisiertem Wasser auf 20 µl Volumen aufgefüllt. Diese beiden Proben dienen als Marker an den beiden Außenseiten des Gels und lassen ablesen, wie weit DNA mit einer spezifischen Anzahl an Basenpaaren (bp) im Gel wandert. In eine weitere Probe wurden 200 ng (2 µl) enzymatisch linearisiertes Plasmid gegeben und mit 18 µl H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Diese Probe diente der Kontrolle, wie weit linearisierte DNA, also DNA mit mindestens einem DSB, im Gel wanderte. Eine unbehandelte Kontrollprobe mit 200 ng (2 µl) pUC 19 in 18 µl H₂O diente auf jedem Gel als Referenz für unbeschädigte sc-DNA. Die Elektrophoresekammer wurde bis 1 mm über das Gel mit TAE Puffer gefüllt und auf Eis gestellt. Es wurde eine Spannung von 100 Volt (3 V/cm) für 3 h angelegt. Das Gel wird anschließend für 15 Minuten in Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt. Anschließend wurde eine Aufnahme an einer Darkbox „Digital Imaging System Diana III“ gemacht und für jeden Versuch ein Bild im TIF-Format (Tagged Image File) erzeugt. Die aufgenommenen Bilder wurden anschließend mit der Software Fiji ausgewertet. Die Beschriftung der Spuren auf dem Gel erfolgte jeweils nach folgendem Schema:

Die Spuren, auf denen Marker aufgetragen wurde, sind mit einem „M“ beschriftet, Spuren mit enzymatisch linearisiertem Plasmid mit einem „L“. Die Kontrollproben, in denen sich nur Plasmid in TE-Puffer und entionisiertes H₂O befindetet, sind mit einem „K“ markiert.

2.2.6 Inkubationstemperatur und pH-Wert

Inkubationstemperatur

Es wurde versucht die Inkubationstemperatur zwischen den Versuchen möglichst identisch zu halten, was aufgrund einiger Ursachen nicht immer möglich war. Die 1h-Werte wurden, falls nicht anders beschrieben, immer bei 20 °C Raumtemperatur inkubiert. Ein Gefrieren der Proben und anschließendes Auftauen innerhalb nur einer Stunde hätte keine gleichmäßige Temperatur über die gesamte Inkubationszeit erlaubt. Für die 24h-Werte wurden die Proben bei -20 °C tiefgefroren. Dies war vor allem bei der Substanz ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI-sinnvoll, um eine erhöhte Stabilität zu gewährleisten. Um Vergleiche mit anderen Substanzen leichter zu ermöglichen, wurden diese, falls möglich, auch bei -20 °C inkubiert. Leider war dies bei ²²³Ra aus strahlenhygienischen und logistischen Gründen nicht möglich. Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung konnte ebenfalls nur bei Zimmertemperatur stattfinden.

pH Bestimmung

Die Plasmid-DNA wird in TE-Puffer mit pH=7,4 gelöst und verdünnt und bei -20 °C gelagert. In den meisten der hier gezeigten Versuche liegt der Gesamt-pH-Wert der Proben ebenfalls in diesem Bereich, da die zugegebenen Bestandteile in einem ähnlichen pH-Wert vorliegen. Der ⁹⁹Mo/^{99m}Tc-Generator wird mit isotonischer Kochsalzlösung mit pH=7,5 eluiert, ebenso der ¹⁸⁸Wo/¹⁸⁸Re Generator.

²²³Ra lag ebenfalls in physiologischer Kochsalzlösung vor.

Sämtliche Proben wurden mit entionisiertem Wasser mit pH=7 auf 20 µl Volumen aufgefüllt. DMSO, welches eine lipophile Substanz ist, hat keinen Einfluss auf den pH-Wert. Die einzige Substanz, welche vom neutralen pH-Wert abweicht, ist HYNIC-DAPI, sowie ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI (pH=6,1).

Um zu untersuchen, wie sich die Zugabe von ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI mit pH 6,1 auf den Gesamt-pH auswirkt, wurde folgende Messung durchgeführt.

Der niedrigstmögliche pH-Wert der Proben wird erreicht, wenn neben den 2 µl Plasmid, 18 µl ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI, zugegeben wird.

Da eine direkte Messung der Proben aufgrund des zu geringen Volumens von nur 20 µl nicht möglich war, wurden pH-Messproben hergestellt, welche bei gleichzeitig erhöhtem Gesamtvolumen von 400 µl, über die gleichen Stoffkonzentrationen verfügten. Die Messung der Probe mit 40 µl TE-Puffer und 360 µl ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI ergab einen pH-Wert von 6,9.

Es wurde herausgefunden, dass bei den Versuchen pH-Werte zwischen 6,9 und 7,5 vorlagen. Auf dieselbe Weise wurden die pH-Werte der Proben in Versuch 3.3.3 und 3.3.4 bestimmt.

2.2.7 Berechnung der Energiedosis

Die Energiedosis, die durch die unterschiedlichen Radionuklide auf das Plasmid einwirkte, wurde von Herrn Dr. Robert Freudenberg, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Dresden berechnet. Die Bestrahlung fand in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen mit 20 µl Volumen statt. Es wurde ein kugelförmiges Inkubationsvolumen mit einem Radius von 1,68 mm abgeschätzt.

Zur Dosisberechnung wurde eine Monte-Carlo-Simulation mit dem Programm Geant4 der Firma Geant4 Collaboration durchgeführt.

Mit folgender Formel konnte anschließend die Energiedosis berechnet werden.

$$D(A, t) = S * \frac{A * T_{1/2}}{\ln(2)} \left(1 - \exp\left(-\ln(2) * \frac{t}{T_{1/2}}\right) \right)$$

S: Aktivitäts-Dosis-Konversionsfaktor

A: Zugegebene Aktivität

T_{1/2}: HWZ des verwendeten Nuklids

t: Inkubationszeit

Tabelle 2: Aktivitäts-Zeit-Dosis Beziehung von ^{188}Re , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{223}Ra im verwendeten Inhalationsvolumen

D(A,t) [Gy]	A [MBq]					
^{188}Re	0,5	1	5	10	20	30
t [h]						
1	4	8	40	80	160	240
24	60	120	600	1200	2400	3600

D(A,t) [Gy]	A [MBq]					
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	0,5	1	5	10	20	30
t [h]						
1	0,25	0,5	2,5	5	10	15
24	2	4	20	40	80	120

D(A,t) [Gy]	A [MBq]					
^{223}Ra	0,001	0,003	0,005	0,01	0,03	0,05
t [h]						
24	20	60	100	200	600	1000
48	35	105	175	350	1050	1750

2.2.8 Statistische Auswertung

Standard Error of the Mean

Die beschriebenen Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt. Aus diesen drei Versuchen wurden Mittelwerte gebildet und der Standardfehler des Mittelwertes (engl. Standard Error of the Mean (SEM)) berechnet. Berechnet wurde der SEM mit der Formel:

$$\text{SEM} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\sqrt{n}}$$

n: Anzahl der Messwerte

In den Tabellen sind die Mittelwerte der Versuche, $\pm\text{SEM}$ angegeben.

Die Diagramme stellen sich aus den Mittelwerten dar. Der angegebene Fehler ist der SEM.

Variationskoeffizient

In Versuch 3.2.1 wurde der Variationskoeffizient (VK) bestimmt, um die Reproduzierbarkeit der Wiederfindung der Fluoreszenzintensitäten für die entsprechenden Plasmidkonformationen abzuschätzen.

Der VK wurde mit folgender Formel berechnet:

$$VK(X) = \frac{\text{Standardabweichung (X)}}{\text{Mittelwerte (X)}}$$

X: Fluoreszenzintensitäten der Spuren 2-19 (vgl. Versuch 3.2.1)

Bestimmung der Signifikanz

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad QuickCalcs, GraphPad Software Inc., La Jolla, USA (www.graphpad.com). Es wurden ungepaarte t-Tests durchgeführt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ betrug.

3 Ergebnisse

Alle Experimente wurden mit dem Plasmid pUC 19 durchgeführt. Nach Zugabe der Radikalfänger oder Modulatoren, Radionuklide oder chemotoxischen Substanzen, wurden die Proben bei 20 °C für 1 h und -20 °C für 24 h inkubiert. Auf das Agarosegel wurden zwei Spuren Marker, eine Spur enzymatisch linearisiertes Plasmid, eine Kontrollprobe und die behandelten Proben aufgetragen. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde die DNA gefärbt und ein Bild aufgenommen. Pro experimentelle Bedingung erfolgten drei unabhängige Versuche. Ein repräsentatives Bild eines Gels wurde ausgewählt und in der Arbeit im entsprechenden Abschnitt abgebildet. Die Fluoreszenzintensitäten der Banden wurden mit der Software Fiji ausgewertet und als relative Werte (%) angegeben.

3.1 ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI -DNA-Bindungsnachweis

Um eine Bindung von ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI an die DNA nachzuweisen, wurden 10 MBq bzw. 20 MBq ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI und 10 MBq bzw. 20 MBq ^{99m}Tc mit jeweils 200 ng Plasmid-DNA inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Unter Anregung durch UV-Licht wurden die Banden der sc-Fractionen ausgeschnitten und die gebundene Aktivität mittels Gamma-Counter (Typ Cobra II) ermittelt.

Tabelle 3 zeigt die im Gamma-Counter bestimmte Aktivität der Banden.

Tabelle 3: Messung der an das Plasmid gebundenen Aktivität (1h)

	Gebundene Aktivität (MBq)	Restanteil sc-Fraktion
Zugegebene Aktivität		
10 MBq ^{99m} Tc	0,0005	0,87
20 MBq ^{99m} Tc	0,0005	0,79
10 MBq ^{99m} Tc-HYNIC-DAPI	0,15	0,74
20 MBq ^{99m} Tc-HYNIC-DAPI	0,3	0,68

Mit folgender Formel lässt sich nun die Anzahl an gebundenen ^{99m}Tc Atomen pro Plasmidmolekül berechnen. 1 MBq ^{99m}Tc besteht aus 3EE+10 Atomen. 100 ng Plasmid bestehen aus 3,4EE+10 Molekülen.

$$\frac{Tc99m}{Plasmid} = \frac{gebundene\ Aktivität\ x\ 3EE + 10\ x\ 1/MBq}{Restanteil\ sc - Fraktion\ x\ 3,4EE + 10}$$

Tabelle 4: ^{99m}Tc/Plasmid Verhältnisse

Zugegebene Aktivität	^{99m} Tc/Plasmid
10 MBq ^{99m} Tc	0,0005
20 MBq ^{99m} Tc	0,0005
10 MBq ^{99m} Tc-HYNIC-DAPI	0,18
20 MBq ^{99m} Tc-HYNIC-DAPI	0,39

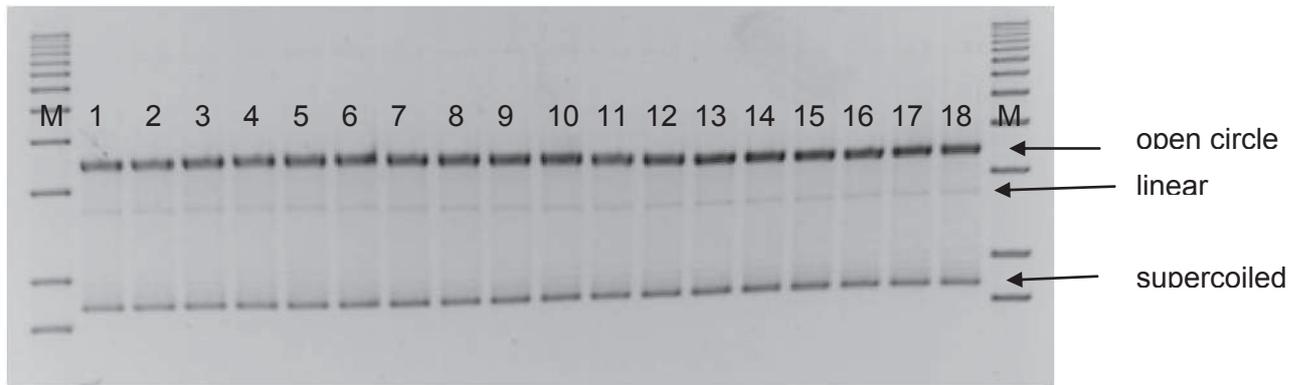
Tabelle 4 zeigt eine um Faktor 360 bei 10 MBq bzw. Faktor 780 bei 20 MBq erhöhte Aktivität an der Plasmid-DNA. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI eine höhere Bindungsaffinität zum Plasmid hat als ^{99m}Tc-Per technetat.

3.2 Standardisierung der Messergebnisse und Quantifizierung

3.2.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Um abschätzen zu können, ob die DNA-Banden verschiedener Auftragestellen und Spuren auf einem Gel miteinander vergleichbar sind, wurden achtzehn Proben mit einem Radionuklid der gleichen Aktivität, 10 MBq ¹⁸⁸Re, inkubiert und auf ein Gel aufgetragen. Es wurde jeweils nach 1 h und nach 24 h Inkubationszeit ein Gel mit Proben geladen und eine Elektrophorese gestartet.

A



B

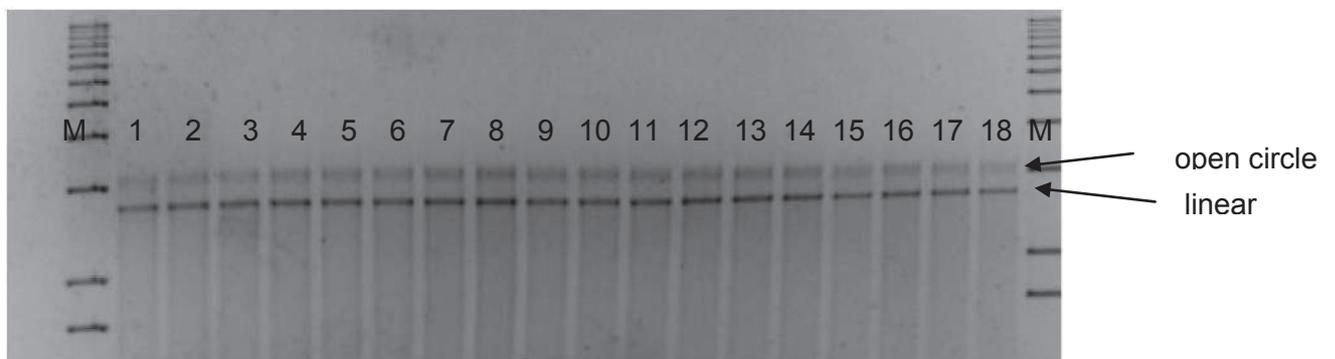
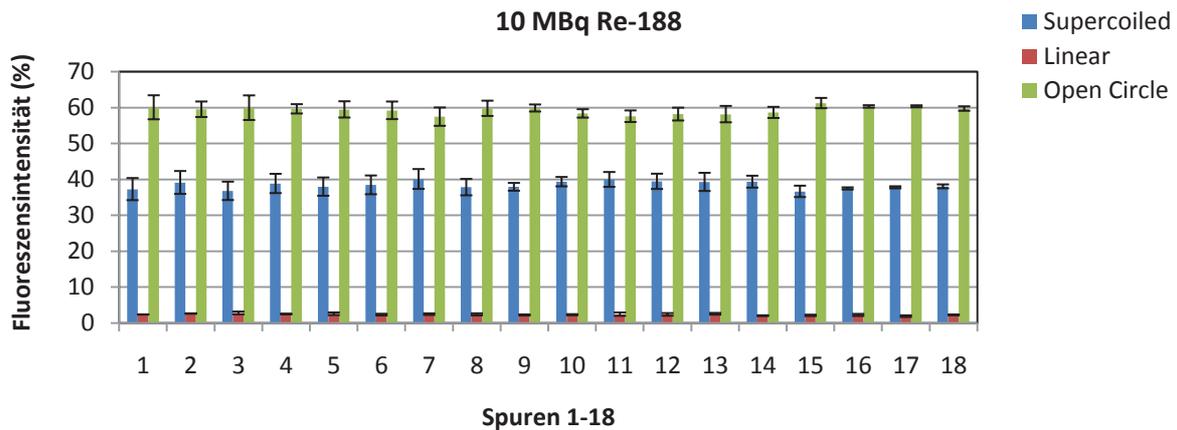


Abb. 5: Fluoreszenzintensität der Plasmid-DNA Konformationen auf einem Agarosegel. Plasmid-DNA wurde mit 10 MBq Re-188 bestrahlt und jeweils 10 μ l der DNA-Lösungen auf 18 Spuren aufgetragen. (A) Die Spuren 1-18 zeigen die DNA-Konformationen als open circle (oc) und supercoiled (sc) DNA-Banden nach 1h Exposition und (B) nach 24 h Exposition als oc- und linearisierte (lin) DNA-Banden.

Die Spuren wurden schließlich miteinander verglichen und auf Unterschiede im Verhältnis zwischen den Fraktionen untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass nach 1 h drei Banden (sc, lin, oc) zu sehen sind, nach 24 h verschwindet die sc-Bande und es sind nur noch die oc-Bande sowie die lin-Bande zu sehen. Die relativen Intensitätswerte aller Plasmid-Konfigurationen auf den verschiedenen Spuren zeigten eine gute Übereinstimmung, was auf eine gleichmäßige Belichtung des gesamten Agarosegels und eine allgemein gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hinweist.

A



B

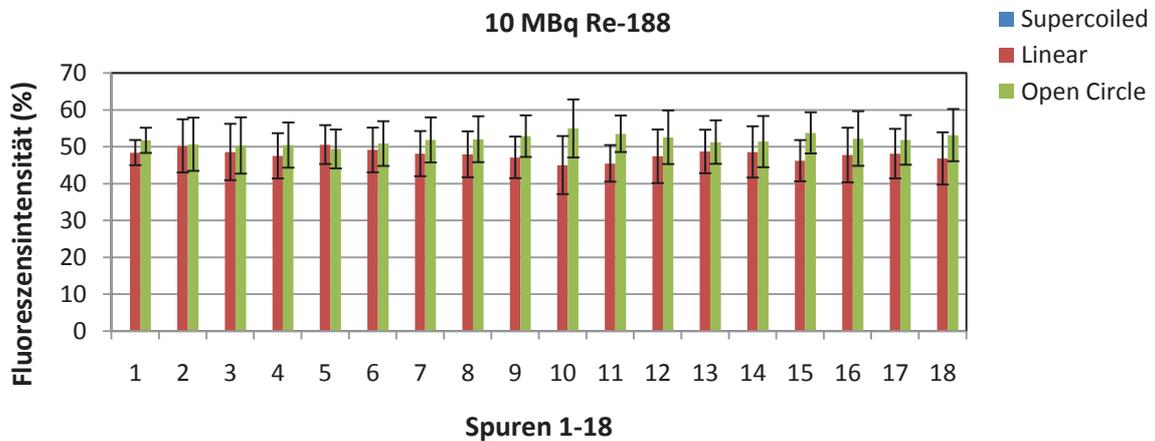


Abb. 6: Reproduzierbarkeit der relativen Fluoreszenzintensitäten auf einem Agarosegel (Abb.1). Plasmid-DNA wurde mit 10 MBq Re-188 bestrahlt und jeweils 10 µl der DNA-Lösungen in 18 Gelspuren aufgetragen. (A) Die Spuren 1-18 zeigen die Fluoreszenzintensitäten der DNA-Konformationen nach 1h Exposition open circle (oc) und supercoiled (sc) und (B) DNA-Konformationen nach 24 h Exposition oc- und linearisierte (lin) DNA-Banden. Mittelwerte aus drei Versuchen ± SEM.

Zur Darstellung der Variation der Messwerte in Abhängigkeit von der Gelspur wurde der Intra-Assay-Variationskoeffizient berechnet, welcher ein relatives Streuungsmaß darstellt und ein Maß der Streuung zwischen den unterschiedlichen Spuren ist. Um die Variation zwischen unterschiedlichen Gelen zu betrachten, wurde aus sechs Spuren verschiedener Gele mit 10 MBq ¹⁸⁸Re der Inter-Assay-VK berechnet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Intra- und Inter-Assay-VK

Intra-Assay-VK	1 h	24 h
Supercoiled	2,7 %	nicht messbar
Linear	9,3 %	3%
Open Circle	1,7 %	2%
Inter-Assay-VK	1 h	24 h
Supercoiled	15,9 %	nicht messbar
Linear	26,3 %	25,6 %
Open Circle	6,1 %	19,0 %

3.2.2 Untersuchung der Intensitätsänderung der Banden bei unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen

Um untere und obere Nachweisgrenzen von Plasmidkonzentrationen im Gel und die Korrelation zwischen Plasmidmasse und Fluoreszenz festzustellen, wurde ein Bereich von 5 ng bis 175 ng pUC19 untersucht. Da bei allen Experimenten 100 ng pro Geltasche aufgetragen wurden, ist für die Versuchsreihe vor allem der Bereich ≤ 100 ng interessant.

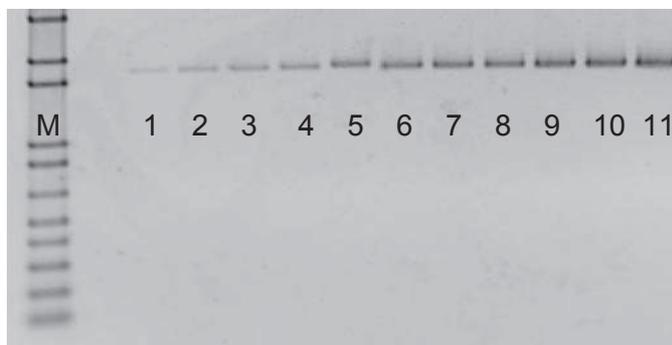


Abb. 7: Spur 1-11: Agarosegel mit Darstellung der sc-Banden bei ansteigender Plasmidmasse. (5; 10; 15; 20; 25; 50; 75; 100; 125; 150 und 175 ng)

Es wurde nur die sc-Form des Plasmids aufgetragen, da keine Behandlung des Plasmids erfolgte. Für diesen Bereich konnte eine annähernd lineare Intensitätszunahme gezeigt werden. Die Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten $R^2=0,973$.

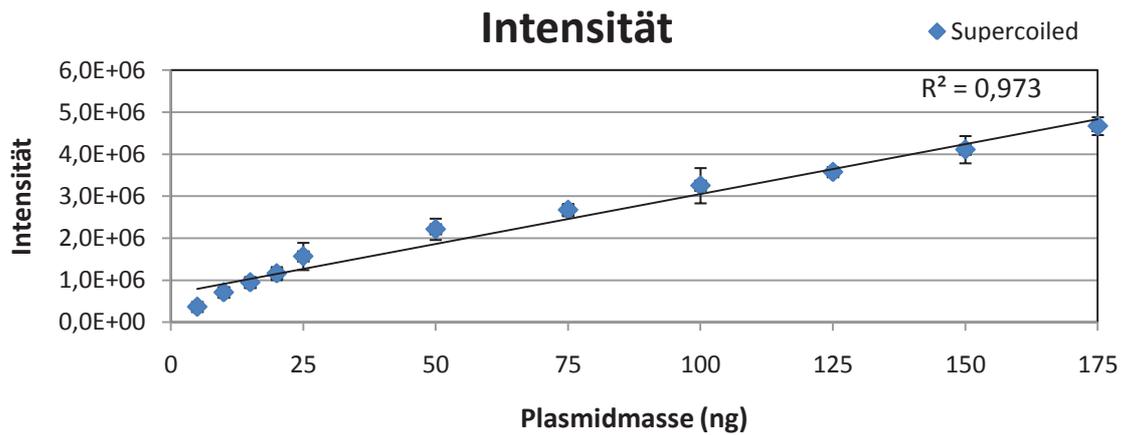


Abb. 8: Darstellung der Abhängigkeit der Plasmidmasse von der Fluoreszenzintensität (5; 10; 15; 20; 25; 50; 75; 100; 125; 150 und 175 ng). Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

3.3 Einfluss physikalischer und chemischer Parameter auf die Plasmid-DNA

3.3.1 Einfluss von DMSO auf die Plasmid-DNA

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit ist der Nachweis der radikalvermittelten Effekte mit dem Radikalfänger DMSO. Um auszuschließen, dass DMSO in der verwendeten Konzentration (0,2 M) toxische Effekte auf das Plasmid hat, wurde folgendes Experiment unternommen: pUC 19 wurde für jeweils 1 h und 24 h mit 0,2 M DMSO inkubiert und anschließend die DNA Schädigung mittels Elektrophorese bestimmt.



Abb. 9: Spur 1: Fluoreszenzintensität des Plasmides + 0,2 M DMSO für 1 h (A) und 24 h (B).

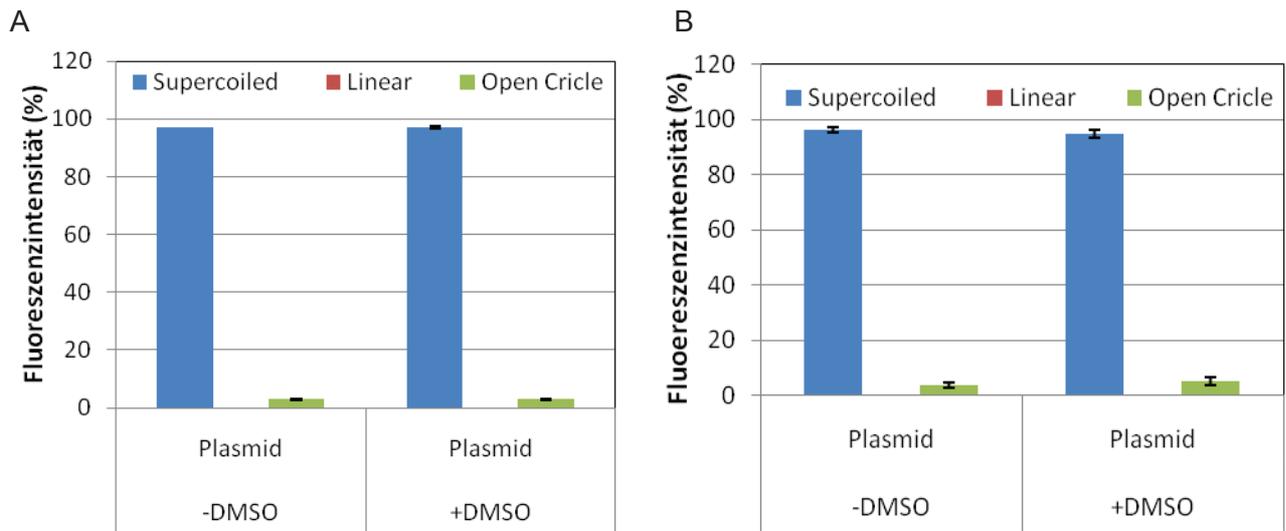


Abb. 10: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen \pm 0,2 M DMSO im Agarosegel nach 1 h (A) und 24 h (B) Inkubationszeit. Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

Als Ergebnis konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe von 0,2 M DMSO weder nach 1 h, noch nach 24 h Inkubationszeit Schäden am Plasmid verursacht. Eine Schädigung der DNA durch DMSO in den Bestrahlungsexperimenten mit Radionukliden und anderen Versuchen kann somit ausgeschlossen werden. Die p-Werte in Tabelle 6 zeigen keine Signifikanz bezogen auf die Unterschiede der Plasmidintegrität in Gegenwart von DMSO im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe.

Tabelle 6 p-Werte DMSO Einfluss

	1 h Inkubationszeit	24 h Inkubationszeit
sc Änderung	1,0	0,37
oc Änderung	1,0	0,41

3.3.2 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Plasmidintegrität

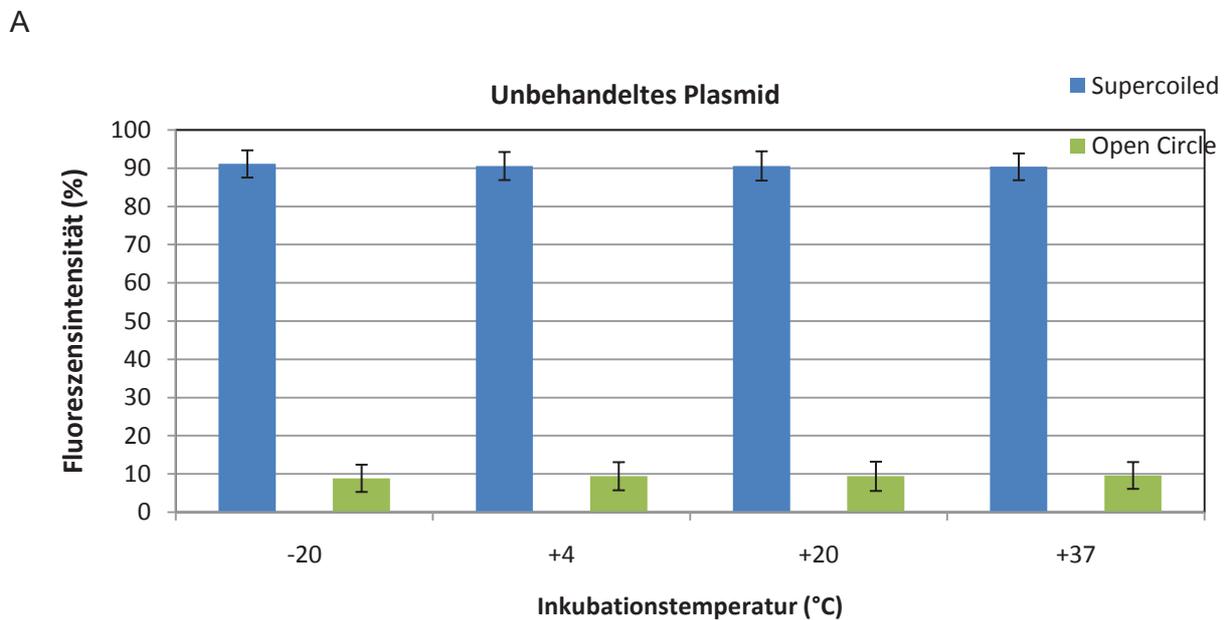
Um den Einfluss der Temperatur auf die Plasmidintegrität zu untersuchen, wurde pUC 19 bei vier unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Nach 1 h und 24 h Inkubationszeit zeigen die p-Werte in Tabelle 7 keine statistisch signifikante Erhöhung des DNA-Schadens. Die Experimente wurden zwischen -20 °C und +37 °C durchgeführt.

Tabelle 7: p-Werte Inkubationstemperatur

	-20°C/+37°C (1h)	-20°C/+37°C (24h)
sc Änderung	0,8959	0,5019
oc Änderung	0,8959	0,5019



Abb. 11: Spuren 1-4: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation bei -20°C, +4°C, +20°C, +37°C nach 1 h (A) und 24 h (B) Inkubationszeit.



B

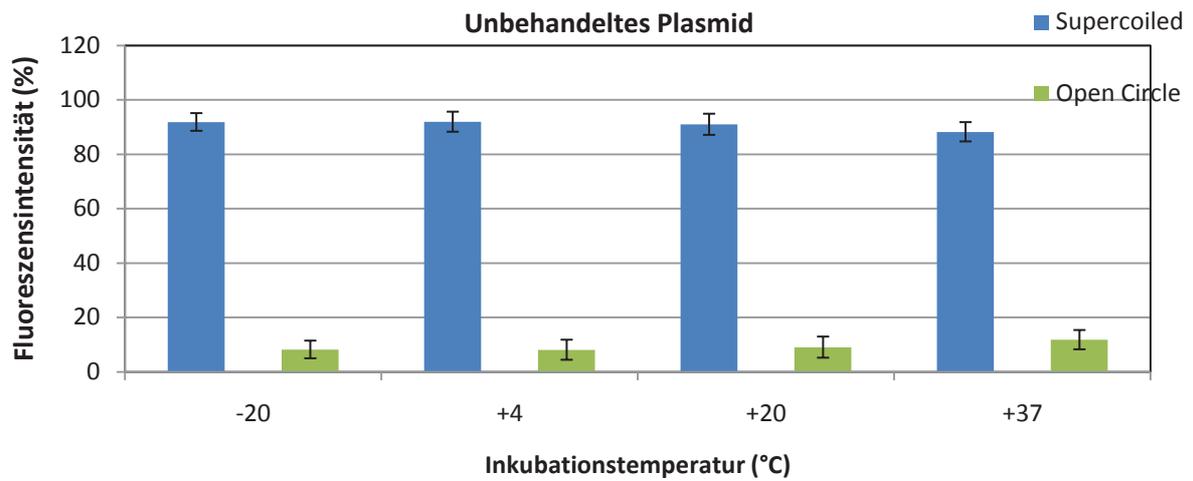
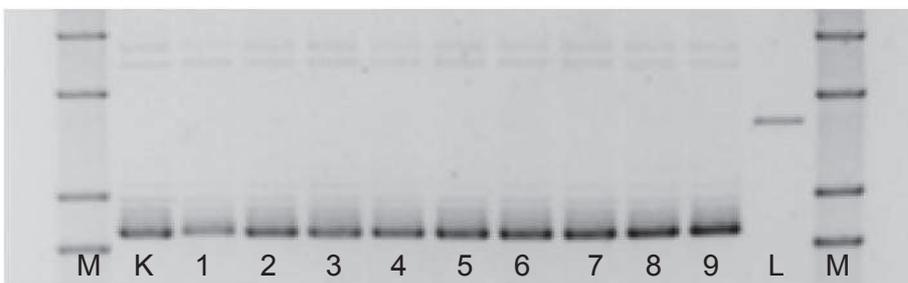


Abb. 12: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation bei -20°C, +4°C, +20°C, +37°C nach 1 h (A) und 24 h (B) Inkubationszeit. Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

3.3.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Plasmidintegrität

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob der pH-Wert im Bereich zwischen 5,8 und 8,2 einen Einfluss auf die Schädigung der DNA hat. Die DNA-Proben wurden mittels Phosphatpuffer pH (5,1- 9,0) auf unterschiedliche pH-Werte (7,4; 5,8; 6,0; 6,2; 6,5; 7,0; 7,5; 7,8; 8,1; 8,2) eingestellt.

A



B

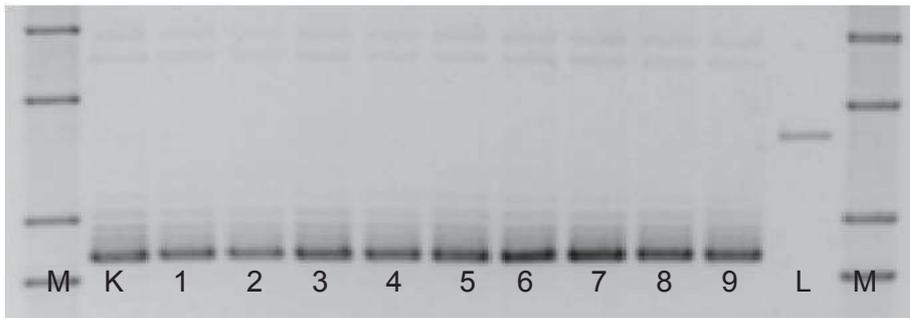
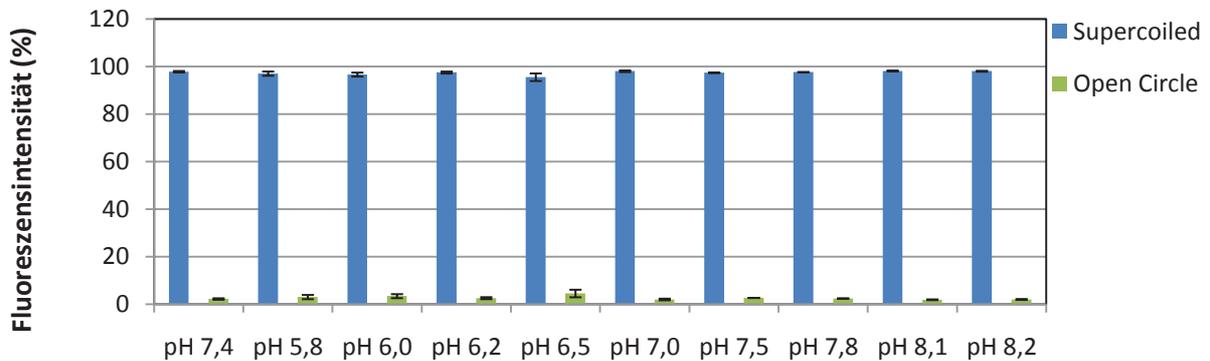


Abb. 13: Spuren 1-9: Fluoreszenzintensität der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation bei unterschiedlichen pH-Werten (5,8; 6,0; 6,2; 6,5; 7,0; 7,5; 7,8; 8,1; 8,2) nach 1h (A) und 24h (B) Inkubationszeit.

Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Inkubationszeit von 1 h und 24 h pH-Werte im Bereich zwischen 5,8-8,2 keinen Einfluss auf den Erhalt der sc-Formation haben. Bei pH 8,1 wurde der höchste Anteil an sc-Konformation (1 h: 98,1%; 24 h: 98,2 %) und niedrigste Anteil an ESB (1 h: 1,9%; 24 h: 1,8 %) ermittelt. Bei pH 6,5 wurde der niedrigste Anteil an sc-Konformation (1 h: 95,5%; 24 h: 94,8 %) und höchste Anteil an ESB (1 h: 4,5%; 24 h: 5,2 %) gefunden. Diese Unterschiede wurden mittels t-Test auf statistische Signifikanz überprüft.

A



B

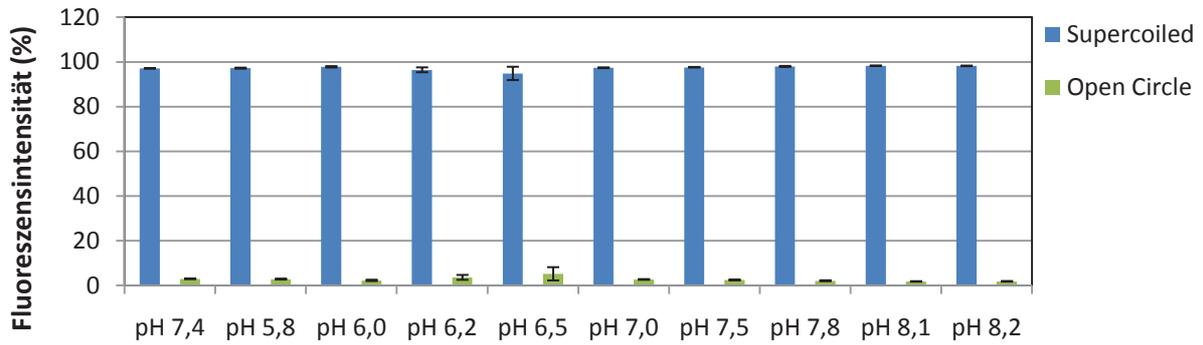


Abb. 14: Darstellung der Fluoreszenzintensität der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation bei unterschiedlichen pH-Werten (5,8; 6,0; 6,2; 6,5; 7,0; 7,5; 7,8; 8,1; 8,2) nach 1h (A) und 24h (B) Inkubationszeit. Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

Wie Tabelle 8 zeigt, konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Tabelle 8 p-Werte Plasmidintegrität pH-Wert

	1 h Inkubationszeit	24 h Inkubationszeit
sc Änderung	0,18	0,10
oc Änderung	0,18	0,32

3.3.4 Bestrahlung der Plasmid-DNA bei unterschiedlichen pH-Werten

Getestet wurde, ob Plasmid-DNA nach Bestrahlung bei variierendem pH-Wert und gleichzeitiger Bestrahlung, ein unterschiedliches Ausmaß an DNA-Schäden aufweist.

Da in der Literatur über eine erhöhte DNA-Schädigung berichtet wird (Sahu et al. 1995), wurde untersucht, ob es bei den pH-Werten der hier gezeigten Versuche ebenfalls zu einer Veränderung der Strahlensensibilität in Abhängigkeit vom pH-Wert kommt.

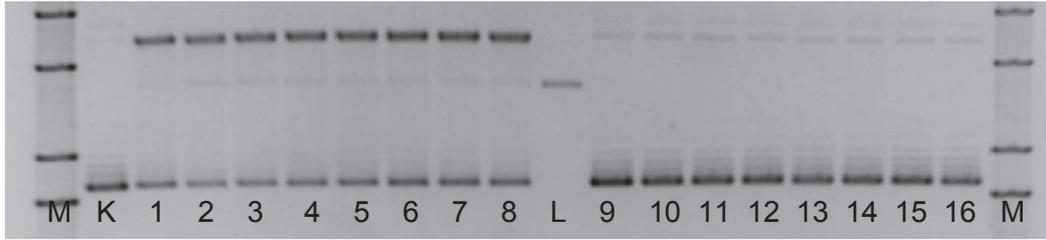
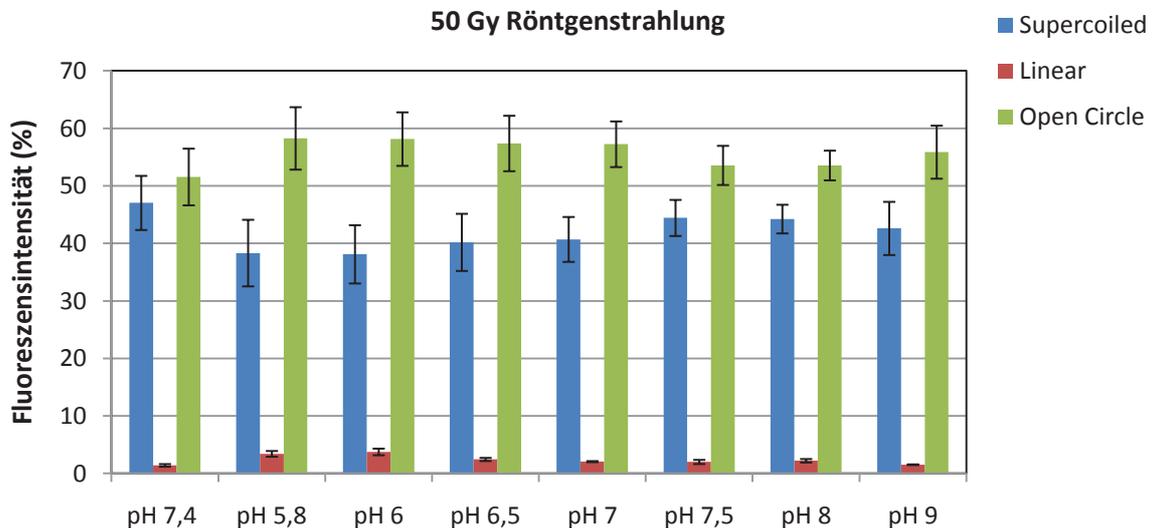


Abb. 15: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung bei unterschiedlichen pH-Werten. Bahn 1: Kontrolle (pH 7,4) +50 Gy Röntgen; Spuren 2-8: pH (5.8, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9) + 50 Gy Röntgen Spuren 9-16: pH (5.8, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9) + 50 Gy Röntgen + 0.2 M DMSO.

Getestet wurde der relevante Bereich zwischen pH 5,8 und pH 9,0 bei konstanter Energiedosis von 50 Gy externe Röntgenstrahlung. Zusätzlich wurde in diesem Experiment der Einfluss des Radikalfängers DMSO untersucht.

Im untersuchten pH-Bereich hatte der pH-Wert keinen Einfluss auf die Anzahl an ESB oder DSB im pUC 19. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass durch Variation des pH-Wertes in den hier gezeigten Versuchen kein Einfluss auf die DNA Schädigung zu erwarten ist.

A



B

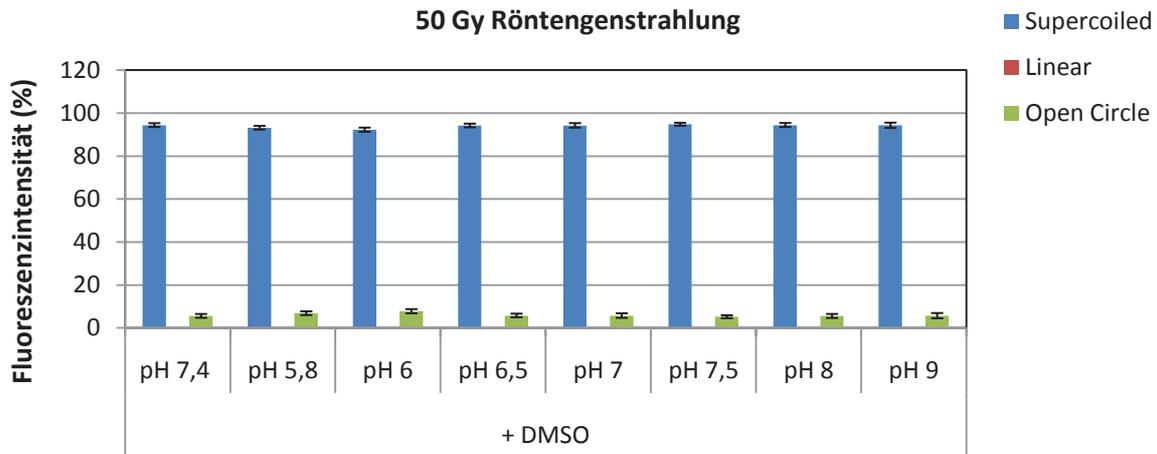


Abb. 16: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung bei unterschiedlichen pH-Werten. 50 Gy Röntgen ohne DMSO (A) 50 Gy Röntgen + 0.2 M DMSO (B). Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

Es wurden jeweils der pH-Wert mit der höchsten und niedrigsten gemessenen Schädigung verglichen. Dies waren ohne DMSO (pH 7; pH 7,4) und mit DMSO (pH 5,8 und pH 7,5). Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, wie die p-Werte in Tabelle 9 zeigen.

Tabelle 9: p-Werte ohne DMSO (pH 7; pH 7,4) und mit DMSO (pH 5,8 und pH 7,5)

	Ohne DMSO	Mit DMSO
sc Änderung	0,1547	0,1393
lin. Änderung	0,055	-
oc Änderung	0,1856	0,1393

3.4 Schädigung der Plasmid-DNA durch SnCl₂ im TechneScan PYP-Kit

Im verwendeten TechneScan PYP-Kit ist neben Pyrophosphat SnCl₂ enthalten, welches als Reduktionsmittel dient und von dem berichtet wurde, dass es radikalvermittelte DNA Schäden induziert (de Mattos et al. 2000). In diesem Experiment wurde untersucht, ob dieser Effekt durch Inkubation mit dem Sn-PYP-Kit erreicht werden kann. Es ist die SnCl₂ Konzentration der jeweiligen Probe angegeben. PYP und SnCl₂ liegen im Verhältnis von 5:1 vor. Inkubiert wurde das Plasmid mit einer steigenden Sn-PYP Konzentration, um die Abhängigkeit der Entstehung von ESB von der SnCl₂-Konzentration nachzuweisen

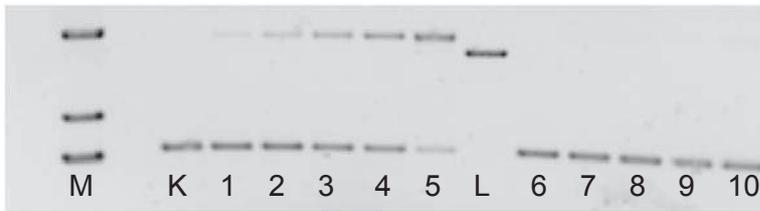


Abb. 17: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach 1h Inkubation mit dem Sn-PYP-Kit. Spuren 1-5: Plasmid + PYP (10, 20, 40, 50, 100) µg/ml SnCl₂ Spuren 6-10: Plasmid + PYP (10, 20, 40, 50, 100) µg/ml SnCl₂ + 0.2 M DMSO.

Nach einstündiger Inkubation des Plasmides mit dem Sn-PYP-Kit bei SnCl₂ Konzentrationen von 10 µg/ml bis 100 µg/ml zeigte sich mit steigender Konzentration ein Anstieg an ESB auf 76,8 %. Gleichzeitig nahm die Supercoiled-Fraktion von 100% bei unbehandeltem Plasmid auf 22,6 % bei einer SnCl₂ Konzentration von 100 µg/ml ab. Die Zugabe des Radikalfängers DMSO verhinderte die chemotoxische Schädigung der DNA praktisch komplett. Bei der höchsten Konzentration von 100 µg/ml SnCl₂ konnte durch Zugabe von 0,2 M DMSO der Supercoiled-Anteil erhalten werden. Die ESB blieben bei einem niedrigen Wert von maximal 2,4 %.

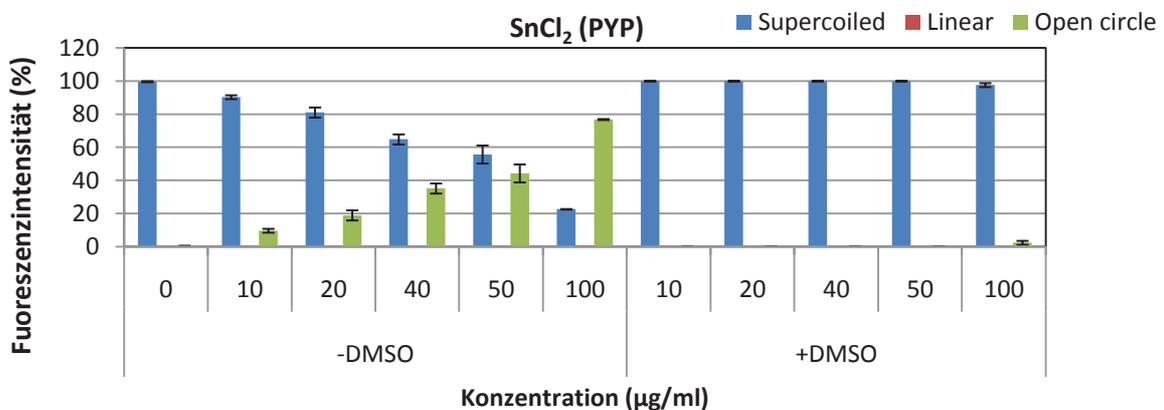


Abb. 18: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach 1h Inkubation mit dem Sn-PYP-Kit ±DMSO. Mittelwerte aus drei Versuchen ±SEM

Die p-Werte in Tabelle 10 zeigen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollprobe und Zugabe von Sn-PYP schon bei einer Konzentration von 10 µg/ml SnCl₂ festgestellt werden konnte. Bei den Proben, welche mit DMSO versehen wurden, konnte bei allen SnCl₂ Konzentration keine signifikante Zunahme an DNA Schaden festgestellt werden.

Tabelle 10 p-Werte PYP im Vergleich zur Kontrolle

	10 µg/ml	100 µg/ml + DMSO
sc Änderung	0,0016	0,16
oc Änderung	0,0016	0,16

3.5 Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach Exposition von Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten

3.5.1 Bestrahlung des Plasmides mit Röntgenstrahlung

Die Dosis-Wirkungs-Kurve mit externer Röntgenstrahlung diente als Standard für die Bestrahlungsversuche und stellt eine Strahlenqualität mit niedrigem LET dar. Das Plasmid wurde an einer Röntgenröhre vom Typ Xylon Y.TU 320 (Dosisleistung=1,235 Gy/min) extern bestrahlt. Bei zunehmender Dosis verringerte sich der Anteil der Supercoiled-Fraktion stetig.



Abb. 19: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit externer Röntgenstrahlung unterschiedlicher Dosen Spuren 1-6: Plasmid + Röntgendosis (5, 10, 20, 30, 50, 80) Gy ; Spuren 7-12: Plasmid + Röntgendosis (5, 10, 20, 30, 50, 80) Gy + 0.2 M DMSO.

Die Intensität der oc-Bande, welche die ESB repräsentiert, nahm mit steigender Dosis zu. Die Plasmidschädigung war schon bei der geringsten Dosis im Vergleich zur Kontrollprobe signifikant erhöht (Tabelle 11). DSB konnten bis zur höchsten verwendeten Dosis von 80 Gy nicht festgestellt werden. Der Supercoiled Anteil der Proben mit DMSO lag bei 97,4 %, was fast dem Ausgangswert des unbehandelten Plasmids von 100 % entsprach. Der Anteil an ESB lag bei 2,6 % im Vergleich zu 0 % bei der Kontrolle.

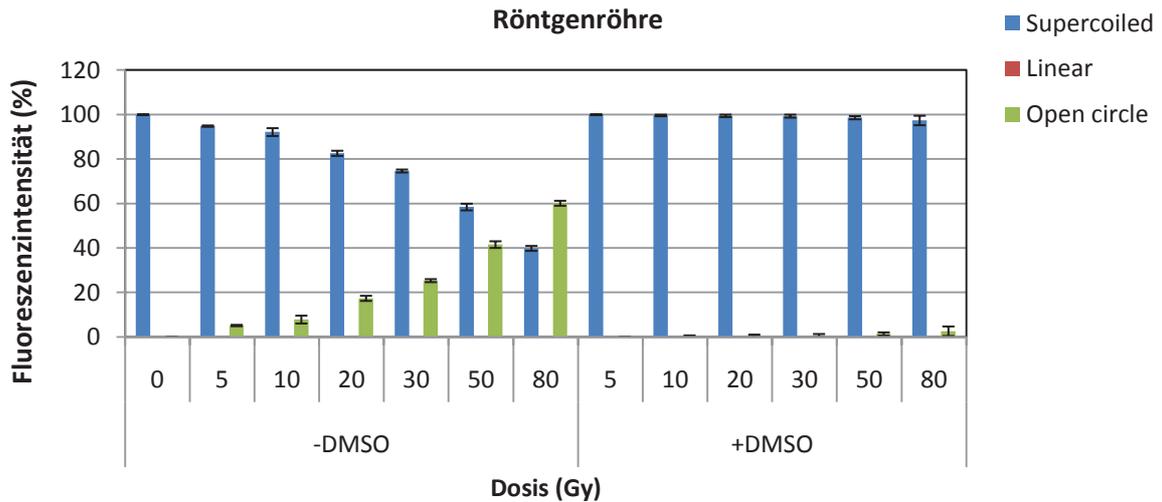


Abb. 20: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit externer Röntgenstrahlung unterschiedlicher Dosen \pm DMSO . Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

Dies spricht gegen einen signifikanten Plasmidschaden zwischen den Proben mit Radikalfänger und der Kontrollprobe ohne DMSO-Zusatz (Tabelle 11).

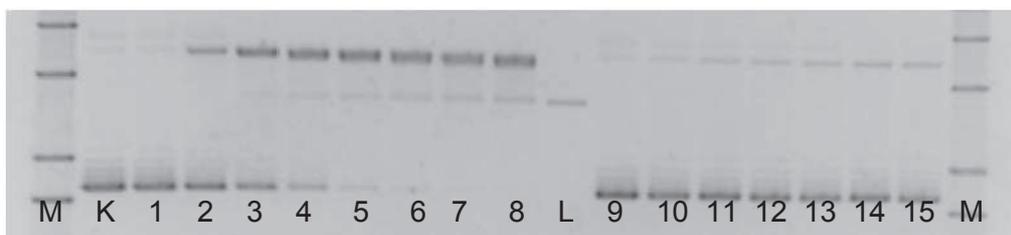
Tabelle 11 p-Werte Röntgen im Vergleich zur Kontrolle

	5 Gy - DMSO	80Gy + DMSO
sc Änderung	0,0001	0,2838
oc Änderung	0,0001	0,2834

3.5.2 Bestrahlung mit dem β -Strahler Rhenium-188 (^{188}Re)

Die Dosis-Wirkungs-Kurve von ^{188}Re wurde bestimmt, um die Wirkung eines β -Strahlers auf die Plasmid-DNA zu untersuchen und den Versuchsbedingungen mit einem Inkubationsvolumen von 20 μl hohe Dosen bis 3000 Gy exponieren zu können. Die lange Bestrahlungszeit von 48h führt zur Dosissteigerung, so dass Dosen bis 3000 Gy (30 MBq ^{188}Re , 48 h) erreicht wurden.

A



B

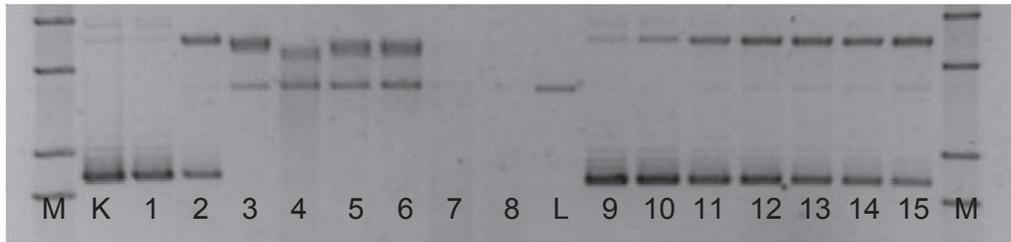
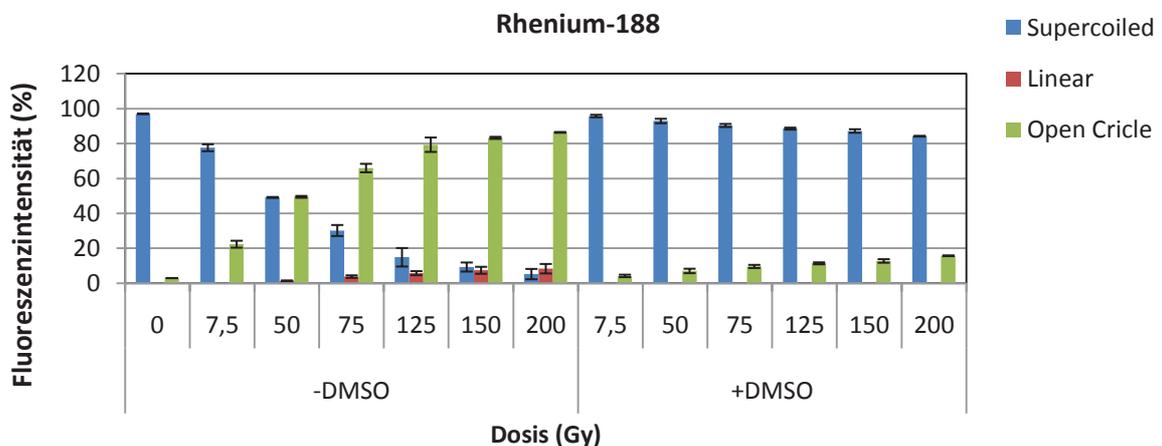


Abb. 21: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem β -Strahler ^{188}Re mit unterschiedlichen Dosen. Spur 1: Plasmid + 0.2 M DMSO ; Spuren 2-8: Plasmid + ^{188}Re (7.5, 50, 75, 125, 150, 200) Gy ; Spuren 9-15: Plasmid + ^{188}Re (7.5, 50, 75, 125, 150, 200) Gy + 0.2 M DMSO (A) Spuren 1: Plasmid + 0.2 M DMSO ; Spuren 2-8: Plasmid + ^{188}Re (120, 600, 1200, 1800, 2400, 3000) Gy ; Spuren 9-15: Plasmid + ^{188}Re (120, 600, 1200, 1800, 2400, 3000) Gy + 0.2 M DMSO (B).

Ab einer Energiedosis von 1200 Gy blieb keine sc-Konformation mehr erhalten, da alle Plasmide durch Strangbrüche in die oc- oder lin-Form übergegangen sind. Durch Zugabe von 0,2 M DMSO als Radikalfänger konnten bis 120 Gy alle Brüche im DNA Strang verhindert werden. Es entstand kein signifikanter Unterschied an Plasmidschaden (Tabelle 12). Bei 200 Gy + DMSO war eine eindeutige Zunahme ($p=0,0001$) an Brüchen im Vergleich zur unbehandelten Probe feststellbar. Der Schaden war aber sehr viel niedriger als bei der 200 Gy Probe ohne DMSO ($p=0,0001$). Die Ergebnisse repräsentieren die DNA-protective Wirkung des DMSO auch bei sehr hohen Dosen. Das ESB:DSB Verhältnis lag bei niedrigen Dosen bis 200 Gy im Bereich von 40:1 – 10:1. Im hohen Dosisbereich fiel es auf unter 2:1, was dafür spricht, dass die DSB überproportional stark zunehmen. Mit Radikalfänger DMSO lag das Verhältnis auch im hohen Dosisbereich zwischen 30:1 und 20:1, was bedeutet, dass sich das Verhältnis zu Gunsten der ESB verschob. Auf den Punkt der ESB:DSB Verhältnisse wird in der Diskussion genauer eingegangen.

A



B

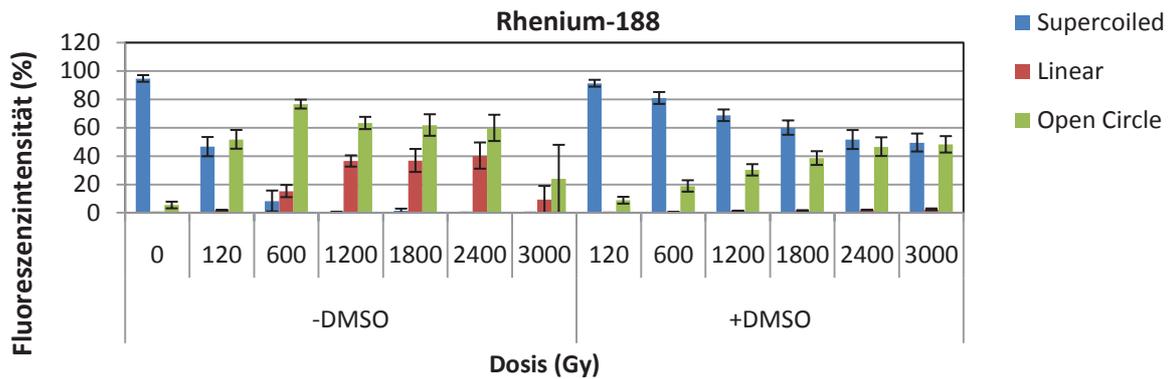


Abb. 22: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem β -Strahler ^{188}Re mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B). Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

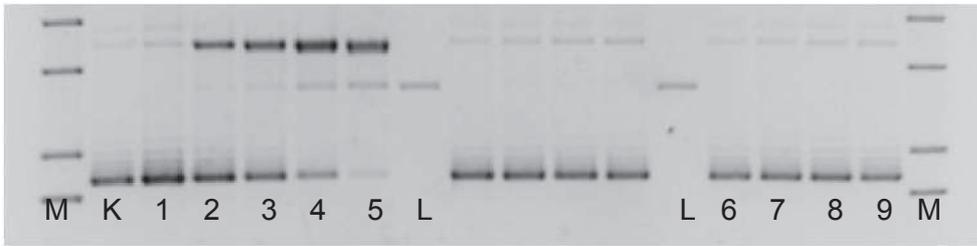
Tabelle 12: p-Werte ^{188}Re

	K/120 Gy + DMSO	K/200 Gy + DMSO	200Gy/200Gy+DMSO
sc Änderung	0,3642	0,0001	0,0001
oc Änderung	0,3642	0,0001	0,0001

3.5.3 Bestrahlung mit dem α -Strahler Radium-223 (^{223}Ra)

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung nach Bestrahlung mit dem α -Strahler ^{223}Ra beschreibt die DNA-Schäden am Plasmid. Die hohe Energiedichte, welche auf die DNA einwirkt, führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu DSB, weshalb der Anteil der DSB am DNA-Schaden zunimmt (Lobrich et al. 1996). Aus diesem Grund wird α -Strahlern eine hohe relative biologische Wirksamkeit (RBW) zugeschrieben. Bei Bestrahlung mit gleicher Dosis führen sie also zu einem verringerten Zellüberleben im Vergleich zu Strahlung mit niedrigem LET. Aufgrund der langen HWZ von 11,4 Tagen und um eine optimale Ausnutzung des kaum verfügbaren α -Strahlers ^{223}Ra zu gewährleisten, wurde die Bestrahlungszeit erhöht, um eine höhere Dosisexposition zu erreichen. Eine Erhöhung der Radionuklidkonzentration in den Proben war aufgrund des begrenzten Inkubationsvolumens nicht möglich. Bei den ^{223}Ra Versuchen wurde deshalb mit Inkubationszeiten von 24 h und 48 h gearbeitet. Auf diese Weise wurden 1750 Gy (50 kBq, 48 h) als Maximaldosis erreicht. Die p-Werte in Tabelle 13 zeigen bei 40 Gy einen signifikanten Plasmidschaden im Vergleich zur Kontrollprobe.

A

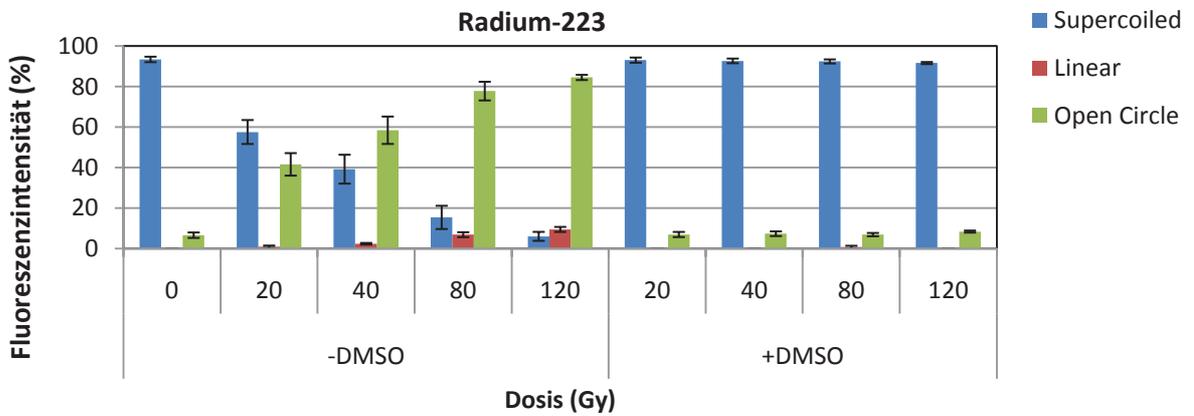


B



Abb. 23: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem α -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen Spur 1: Plasmid + 0.2 M DMSO; Bahn 2-5: ^{223}Ra Dosis (20, 40, 80, 120) Gy; Spuren 6-9: ^{223}Ra Dosis (20, 40, 80, 120) + 0.2 M DMSO (A) Spur 1: Plasmid + 0.2 M DMSO; Spuren 2-5: ^{223}Ra Dosis (35, 70, 140, 210) Gy; Spuren 6-9: ^{223}Ra Dosis (35, 70, 140, 210) + 0.2 M DMSO (B).

A



B

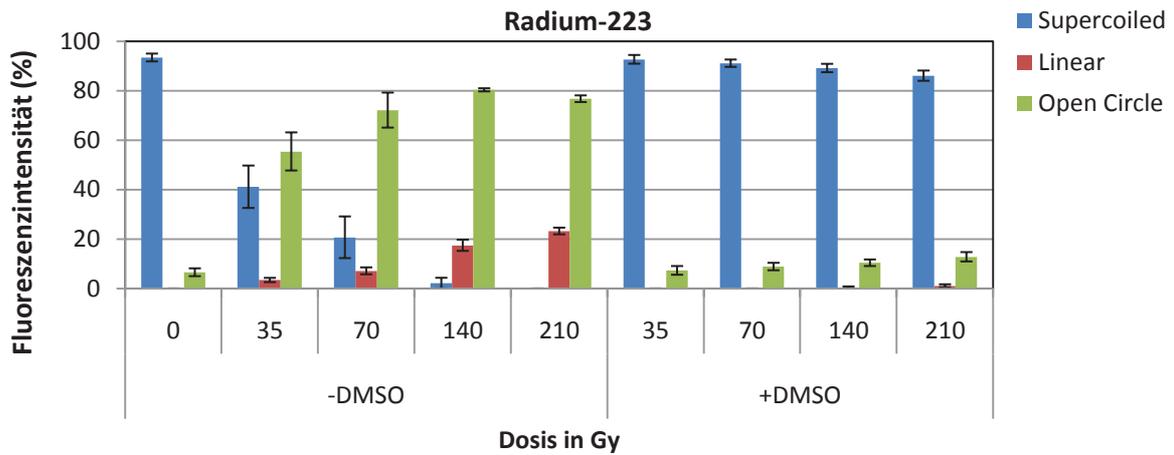


Abb. 24: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem α -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 24 h Inkubationszeit (A) und 48 h Inkubationszeit (B). Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

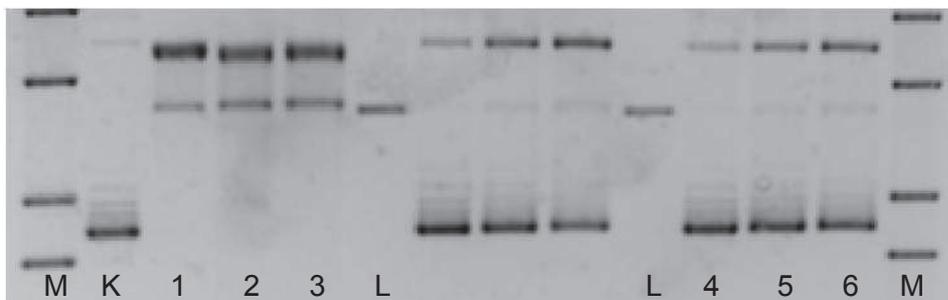
Nach Applikation von 40 Gy nach Zugabe von DMSO, zeigten die Proben signifikant weniger Schaden als ohne Radikalfänger. Die Proben mit Radikalfänger hatten bei 40 Gy keinen signifikant erhöhten DNA-Schaden im Vergleich zur Kontrollprobe (Tabelle 13).

Die Ergebnisse zeigen, dass ab einer Dosis von 210 Gy die sc-Fraktion zerstört ist. Unerwarteter Weise verminderte der Radikalfänger DMSO auch bei der Bestrahlung mit α -Teilchen den Strahlenschaden. Beim Messwert 210 Gy + 0,2 M DMSO (24 h Inkubation) konnten somit 86,1 % der sc-Fraktion wiedergefunden werden Abb. 24.

Tabelle 13: p-Werte ^{223}Ra

	K/40 Gy	40 Gy/40 Gy + DMSO	K/40 Gy + DMSO
sc Änderung	0,0017	0,0017	0,7021
lin. Änderung	0,0039	0,0039	-
oc Änderung	0,0017	0,0076	0,7021

A



B

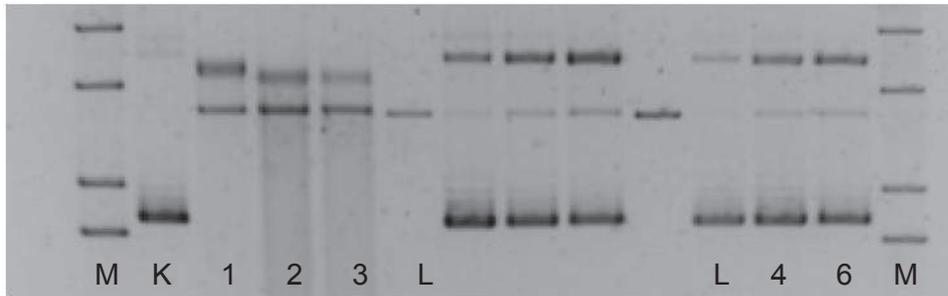
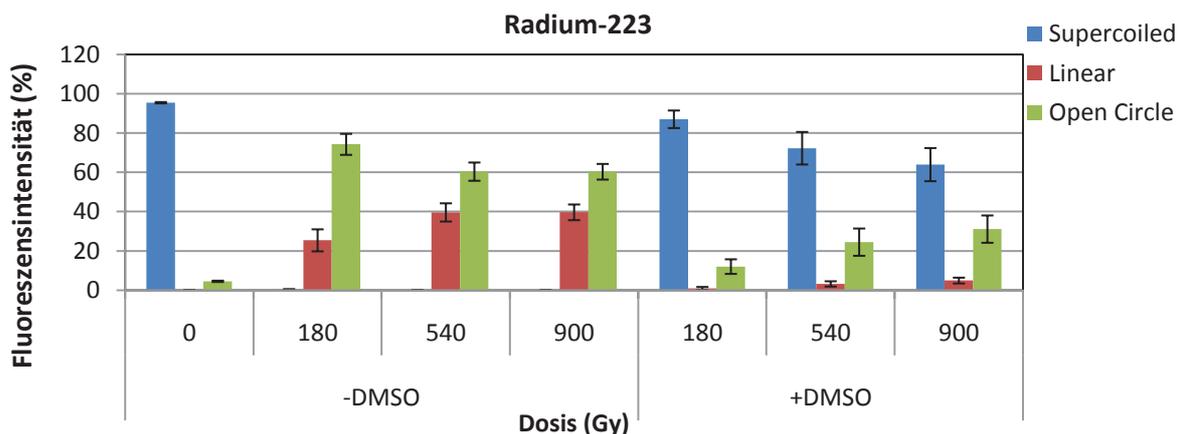


Abb. 25: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem α -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen Spuren 1-3: ^{223}Ra Dosis (180, 540, 900) Gy; Spuren 4-6: ^{223}Ra Dosis (180, 540, 900) + 0.2 M DMSO (A) Spuren 1-3: ^{223}Ra Dosis (350, 1050, 1750) Gy; Spuren 4-6: ^{223}Ra Dosis (350, 1050, 1750) + 0.2 M DMSO (B)

Das ESB:DSB Verhältnis liegt im niedrigeren Dosisbereich bis 120 Gy zwischen 40:1 und 10:1, im höheren Dosisbereich von 180 Gy bis 1750 Gy (48h Inkubation) liegt es zwischen 3:1 und 1:1.

Mit dem Radikalfänger DMSO bleibt das Verhältnis, im Gegensatz zur Bestrahlung mit ^{188}Re bei hohen Dosen, im relativ niedrigen Bereich zwischen 10:1 und 5:1. Das spricht für einen höheren Anteil an direkten Schäden, welche nicht radikalvermittelt sind und deshalb nicht durch DMSO verhindert werden können.

A



B

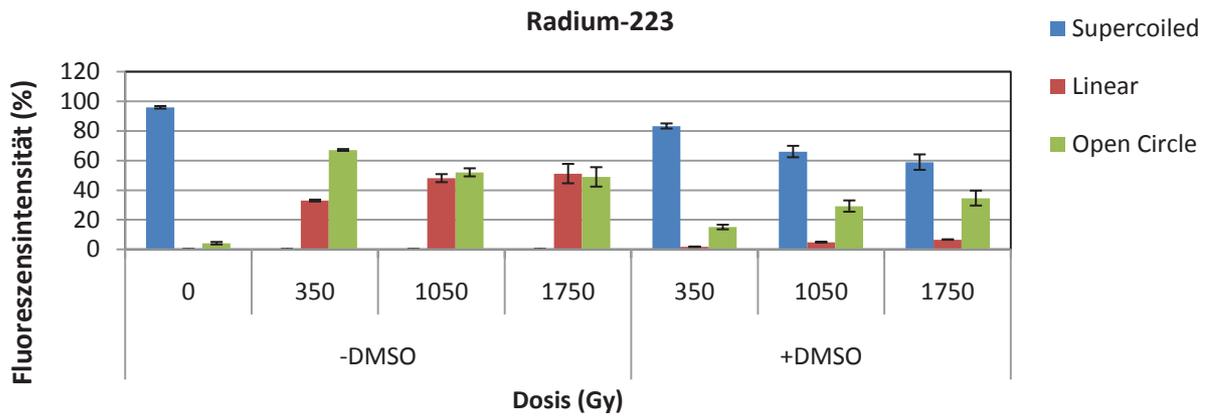
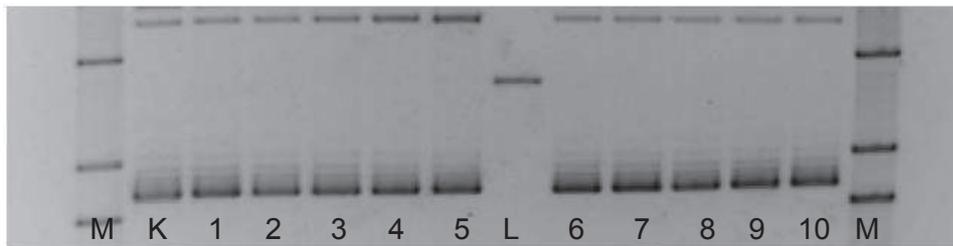


Abb. 26: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem α -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 24 h Inkubationszeit (A) und 48 h Inkubationszeit (B) Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

3.5.4 Bestrahlung mit Tc-99m

Die Dosis-Wirkungs-Kurve von $^{99\text{m}}\text{Tc} \pm$ DMSO zeigte mit zunehmender Dosis eine signifikante Zunahme an ESB, sowie eine signifikante Abnahme der Supercoiled-Bande (Tabelle 14).

A



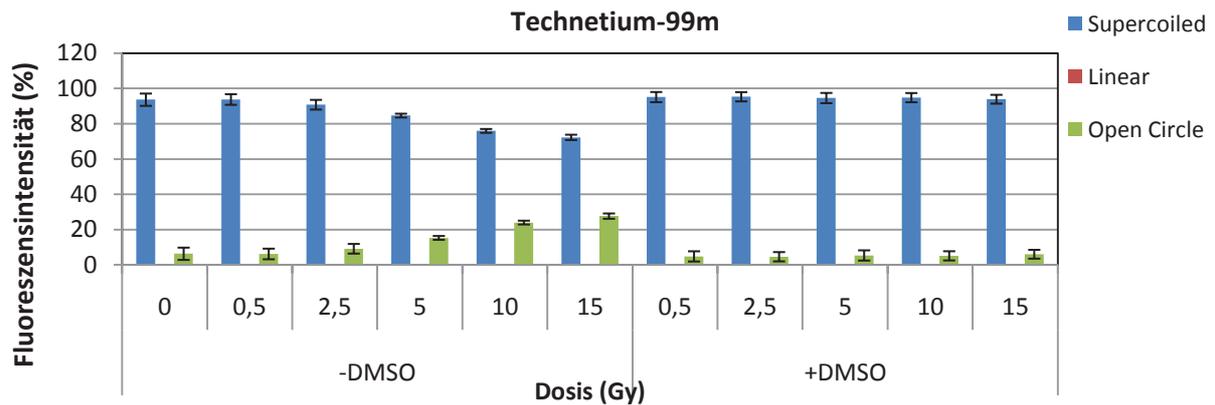
B



Abb. 27: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem γ -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen Spuren 1-5: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (0.5, 2.5, 5, 10, 15) Gy; Spuren 6-10: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (0.5, 2.5, 5, 10, 15) Gy + 0.2 M DMSO (A) Spuren 1-5: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (4, 20, 40, 80, 120) Gy; Spuren 6-10: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (4, 20, 40, 80, 120) Gy + 0.2 M DMSO (B)

Ab ca. 40 Gy traten die ersten DSB auf. Durch Zugabe des Radikalfängers DMSO konnten bis zur Höchstdosis von 120 Gy alle ESB und DSB verhindert werden (Abb. 27, Abb. 28). Die Konformation der sc-Fraktion blieb unverändert. Das ESB:DSB Verhältnis ergab eine Relation von 20:1 bis 30:1.

A



B

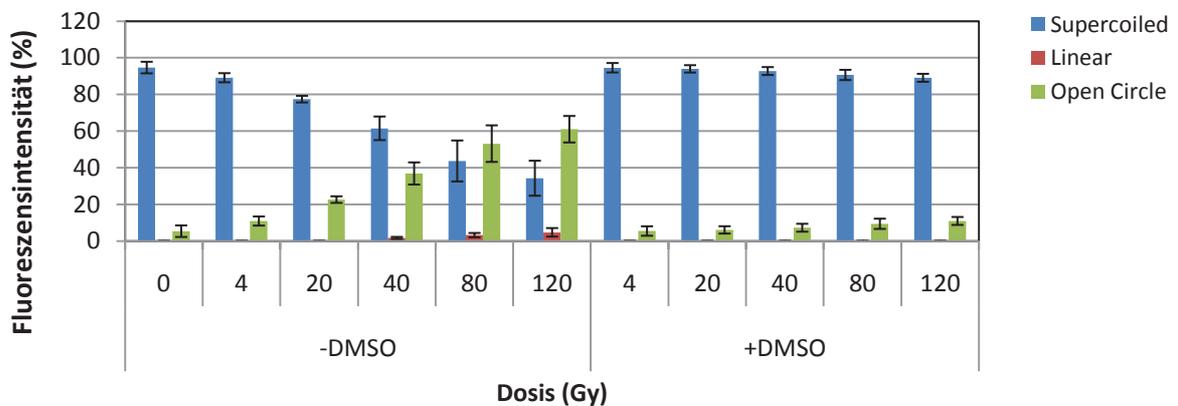


Abb. 28: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem γ -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B) Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

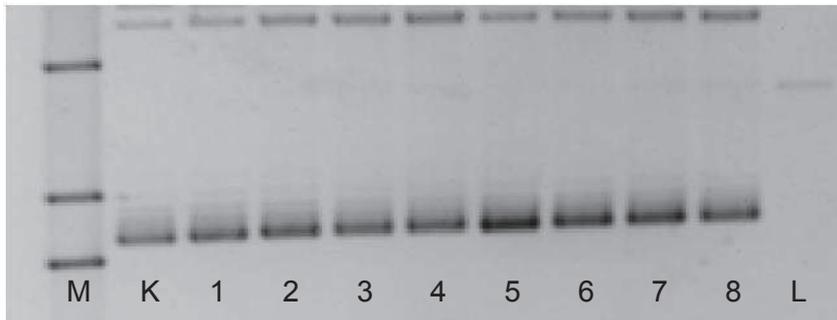
Tabelle 14: p-Werte $^{99\text{m}}\text{Tc}$ im Vergleich zur Kontrolle

	10 Gy	120 Gy + DMSO
sc Änderung	0,0087	0.3376
lin. Änderung	-	-
oc Änderung	0,0087	0.3376

3.5.5 Bestrahlung mit der Substanz Tc-99m-HYNIC-DAPI

In der Klinik für Nuklearmedizin am Universitätsklinikum Dresden bestand die Möglichkeit mit einer Substanz zu arbeiten, welche ^{99m}Tc über einen HYNIC-Linker an DAPI koppelt, welches sich an die DNA anlagert (Tanious et al. 1992). Untersucht werden konnte somit, ob ein zusätzlicher Effekt durch Auger-Elektronen mit geringer Reichweite auf die DNA zu beobachten ist.

A



B

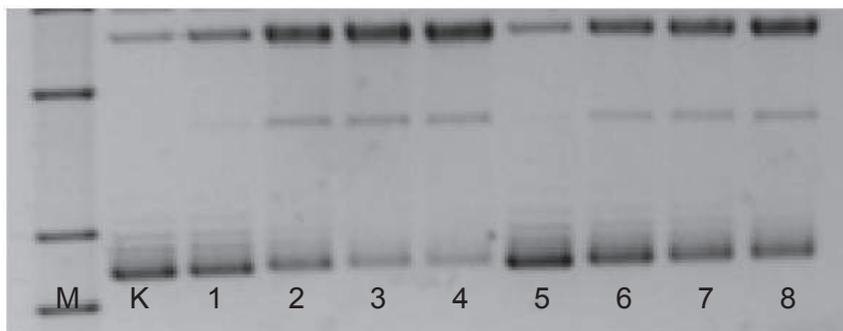
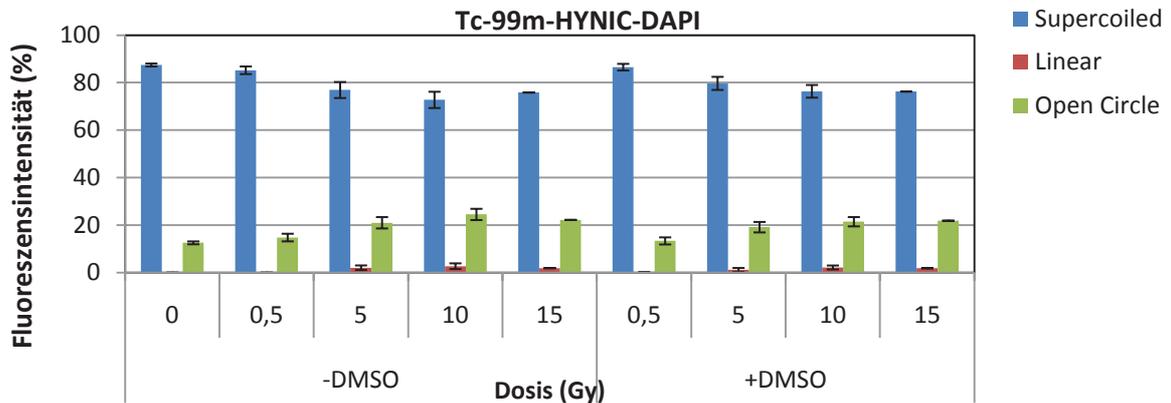


Abb. 29: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI mit unterschiedlichen Dosen Spuren 1-4: Plasmid + ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI (0.5, 5, 10, 15) Gy; Spuren 5-8: Plasmid + HYNIC-DAPI- ^{99m}Tc (0.5, 5, 10, 15) Gy + 0.2 M DMSO (A) Spuren 1-4: Plasmid + ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI (4, 40, 80, 120) Gy; Spuren 5-8: Plasmid + ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI (4, 40, 80, 120) Gy + 0.2 M DMSO (B)

Die Bestrahlung des Plasmids mit der Substanz Tc-99m-HYNIC-DAPI ohne DMSO zeigte mit steigender Dosis eine Zunahme an ESB und DSB. Es fanden sich schon nach 1 h Inkubationszeit ab 4 Gy erste linearisierte DNA-Moleküle mit signifikantem Unterschied zu unbestrahlter Plasmid-DNA (Tabelle 15). Durch Zugabe von DMSO zeigten die lin- und oc-Fractionen, welche die DNA-Strangbrüche repräsentieren, nur eine geringe Abnahme. Der Großteil der DNA-Schädigung trat trotz Radikalfänger auf. Dies passierte in dieser Arbeit, bei keiner anderen Strahlenqualität auf. Für beide Versuchsbedingungen (\pm DMSO) verursachte ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI bei gleicher Aktivität eine etwas höhere Anzahl an ESB und DSB im

Vergleich zu ^{99m}Tc -Pertechnetat. Bei niedriger Dosis lag das ESB:DSB Verhältnis mit und ohne DMSO zwischen 1:15 und 1:10. Bei etwas höheren Dosen von 40 Gy-120 Gy fällt das ESB:DSB Verhältnis auf 1:10 bis 1:5. Auch nach Bestrahlung in Gegenwart des Radikalfängers DMSO blieb es auf diesem niedrigen Niveau.

A



B

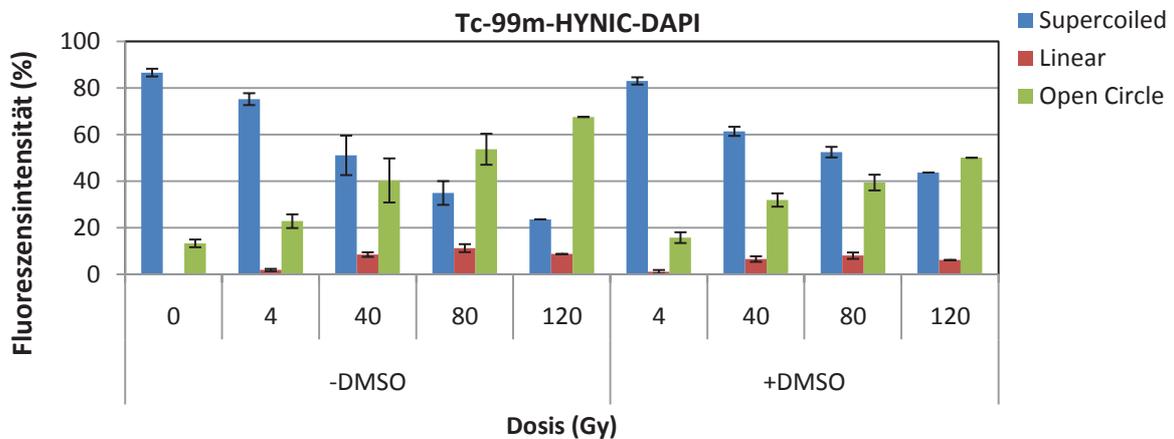


Abb. 30: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B) Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an DSB somit signifikant höher ist als bei einer Bestrahlung gleicher Aktivität mit ^{99m}Tc , welches sich weiter entfernt von der DNA befindet (Tabelle 16). Der gleichbleibend hohe Anteil an DSB bei Bestrahlung trotz DMSO Zusatz spricht für eine Zunahme der direkten DNA-Schäden, welche nicht radikalvermittelt sind.

Tabelle 15: p-Werte ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI im Vergleich zur Kontrolle

	4 Gy	80 Gy + DMSO
sc Änderung	0,0214	0,0003
lin Änderung	0,0191	0,0046
oc Änderung	0.0475	0,0024

Tabelle 16: p-Werte ^{99m}Tc-Pertechnetat im Vergleich mit ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI

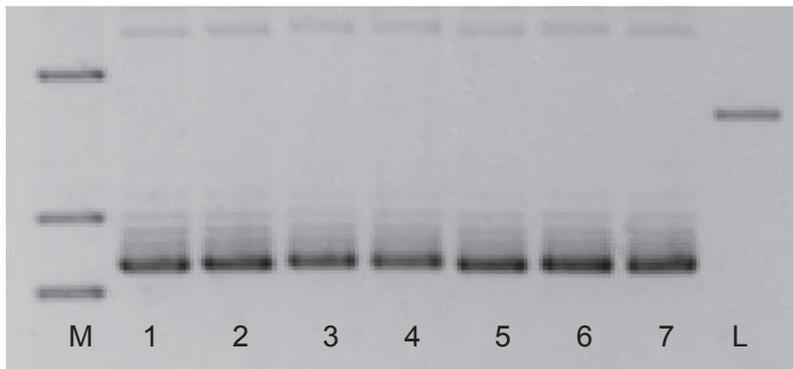
	80Gy ^{99m} Tc/ ^{99m} Tc-H-D	80Gy ^{99m} Tc/ ^{99m} Tc-H-D
	-DMSO	+DMSO
sc Änderung	0,5186	0,0005
lin Änderung	0,0177	0,0046
oc Änderung	0,9564	0,0024

3.6 Untersuchung der nicht-radioaktiven HYNIC-DAPI Derivate und Bestrahlung mit dem Referenzkit

3.6.1 Inkubation mit Tc-99-HYNIC-DAPI

Ziel dieser Untersuchung war es, die Chemotoxizität der nicht radioaktiven Verbindung ⁹⁹Tc-HYNIC-DAPI zu testen. ^{99m}Tc verfügt über eine HWZ von 6 h, wobei ein nahezu kompletter Zerfall nach etwa 10 HWZ stattfindet. Für das Experiment wurden die gleichen Volumina in derselben Reihenfolge wie in den ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI Versuchen pipettiert, nachdem das ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI mindestens 10 HWZ = 60 h abgeklungen war. Das daraus entstehende ⁹⁹Tc ist quasi stabil, mit einer HWZ = 211100 Jahre. Gewählt wurden dieselben Inkubationszeiten von 1 h bzw. 24 h wie bei den Bestrahlungsexperimenten mit der radioaktiven Verbindung. Durch diese Versuchsreihe ohne die radiotoxische Wirkung des ^{99m}Tc sollte eine chemotoxische Schädigung ausgeschlossen werden.

A



B

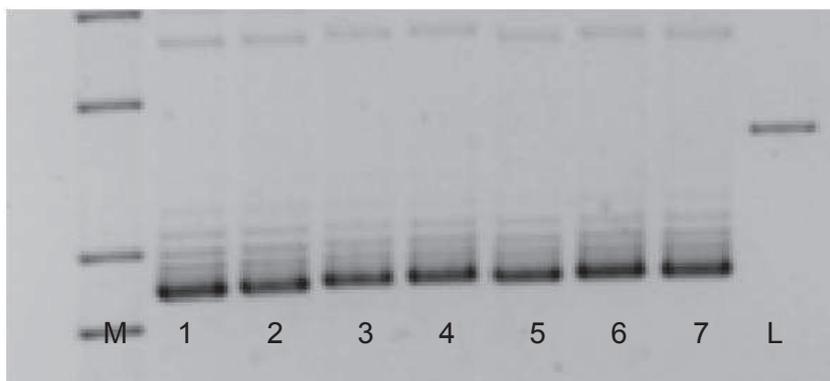
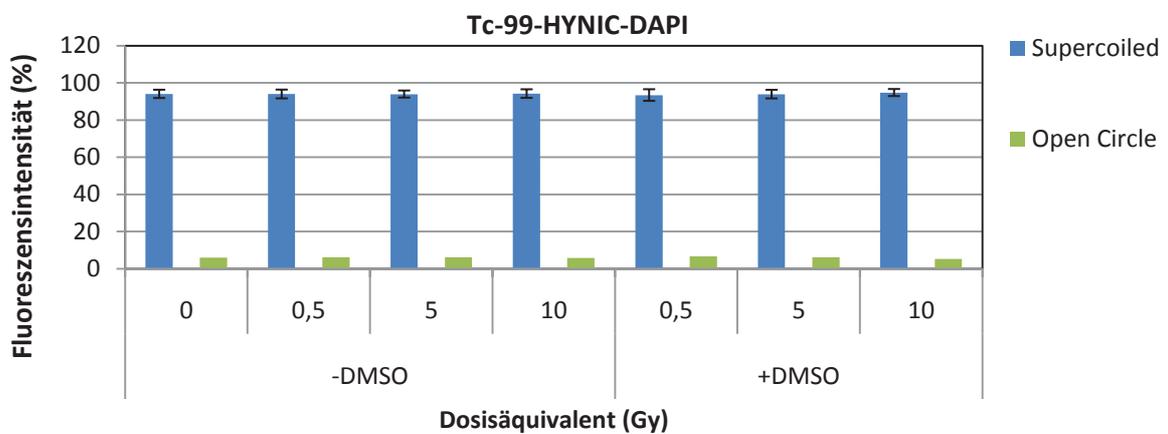


Abb. 31: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation mit ^{99}Tc -HYNIC-DAPI mit unterschiedlichen Konzentrationen Spuren 1-7: Plasmid + abgekl. Hynic-DAPI (0.5, 5, 10) Gy Äquivalent (A) Spuren 1-7: Plasmid + ^{99}Tc -HYNIC-DAPI (4, 40, 80) Gy Äquivalent (B).

Gleiche Substanzmengen und ^{99}Tc -Atome wurden verwendet und die Konzentrationen als Dosisäquivalente im Diagramm aufgetragen.

A



B

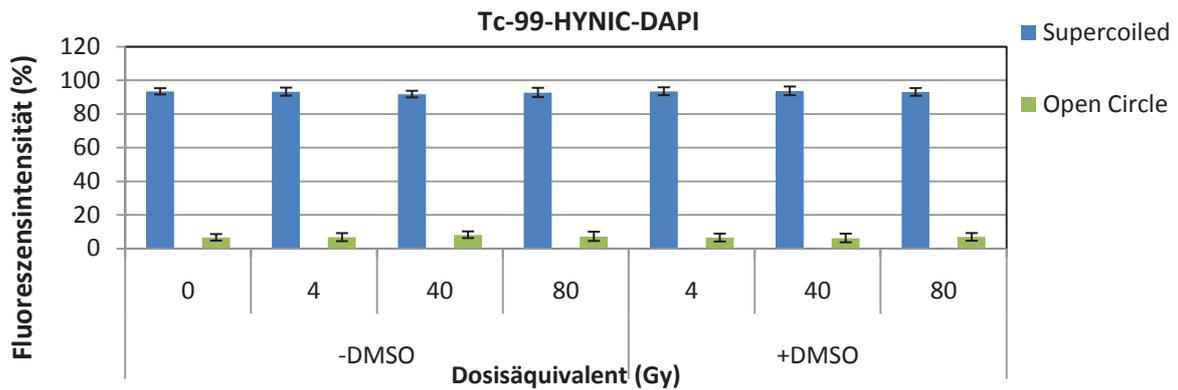


Abb. 32: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation mit ⁹⁹Tc-HYNIC-DAPI mit unterschiedlichen Konzentrationen ±DMSO nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B). Mittelwerte aus drei Versuchen ±SEM

Es trat keine sichtbare Schädigung der DNA auf. Ein Zusatz von DMSO zeigte bei den entsprechenden Konzentrationen keine Effekte. Es gab keine signifikanten Unterschiede, wie Tabelle 17 zeigt.

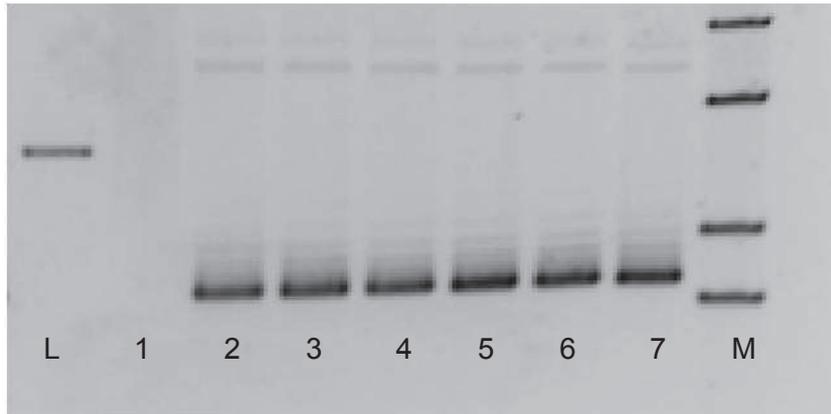
Tabelle 17: p-Werte ⁹⁹Tc-HYNIC-DAPI im Vergleich zur Kontrolle

	80 Gy Ä.	80 Gy Ä. + DMSO
sc Änderung	0,8462	0,9247
lin Änderung	-	-
oc Änderung	0,8700	0,9508

3.6.2 Inkubation mit HYNIC-DAPI Substanz

Es wurde getestet, ab welcher Konzentration das unmarkierte HYNIC-DAPI toxisch für die Plasmid-DNA wird.

A



B

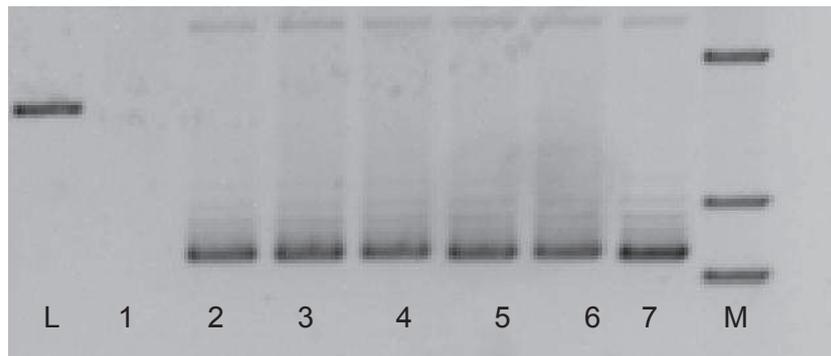
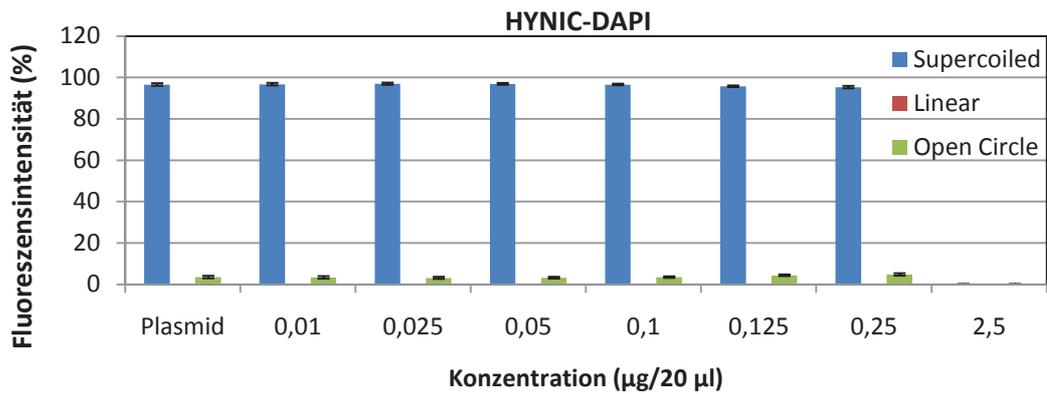


Abb. 33: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation mit HYNIC-DAPI in unterschiedlichen Konzentrationen Spuren 1-6: Plasmid + unmarkiertes HYNIC-DAPI (2,5 ; 0,25; 0,125; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01) $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ für 1 h (A) und 24 h (B)

Die abgebildete Konzentrationsreihe zeigt bis 0,25 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ keine erhöhte Schädigung der DNA. Die höchste verwendete Konzentration von 2,5 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ vernichtete das Plasmid komplett, so dass keinerlei Banden im Gel nachweisbar waren. Die Konzentration an HYNIC-DAPI in den Versuchen mit markierter $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HNYIC-DAPI und ^{99}Tc -HNYIC-DAPI lag bei 0,02 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$. Da bei dieser Konzentration keine signifikante DNA Schädigung auftrat (Tabelle 18), kann davon ausgegangen werden, dass der Schaden in den $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI Versuchen nicht auf die Chemotoxizität des HYNIC-DAPI zurückzuführen ist.

A



B

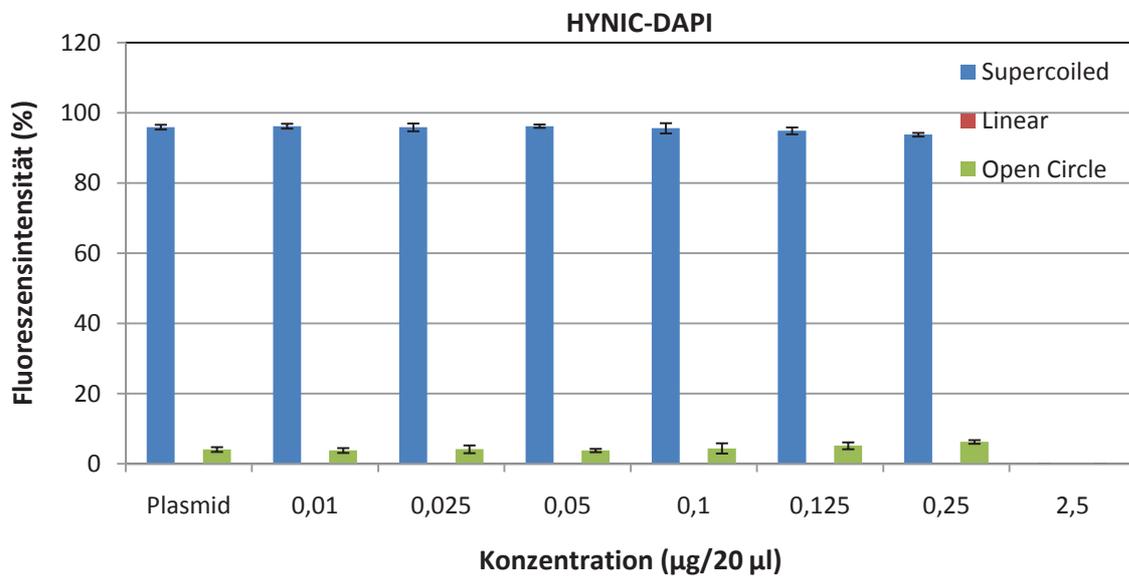


Abb. 34: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation mit HYNIC-DAPI in unterschiedlichen Konzentrationen nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B)

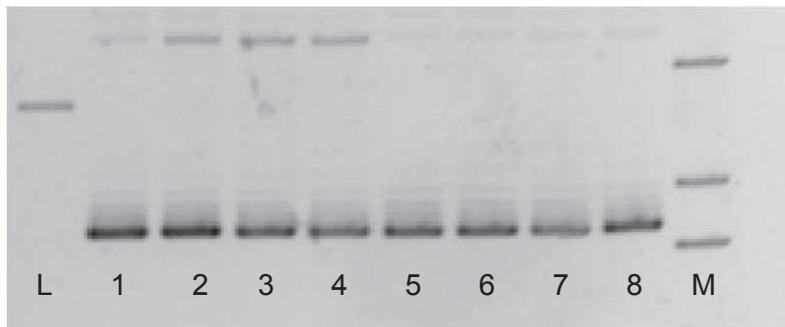
Tabelle 18:p-Werte: HYNIC-DAPI im Vergleich zur Kontrolle

	0,25µg/20µl
sc Änderung	0,6379
lin Änderung	-
oc Änderung	0,0711

3.6.3 Bestrahlung mit Referenzkit

Bei der Herstellung der Substanz ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI entstehen weitere Metaboliten, welche mittels HPLC abgetrennt werden müssen, um reine ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI-Substanz zu erhalten. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes, der durch die Aufreinigung mit HPLC entsteht, konnte leider keine mit der HPLC gereinigte ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI-Substanz verwendet werden, da das Plasmid bei pH=1-2 stark geschädigt wurde. Es konnte somit nie die gereinigte ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI Verbindung appliziert werden, da bei allen Präparationen Spuren von Pertechnetat, SnCl_2 und Tricin in der Produktlösung vorlagen. Deshalb wurde getestet, ob die anderen enthaltenen Substanzen die DNA schädigen. Das Referenzkit enthält alle Stoffe, die in der ungereinigten ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI Lösung vorlagen, außer dem ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI selbst.

A



B

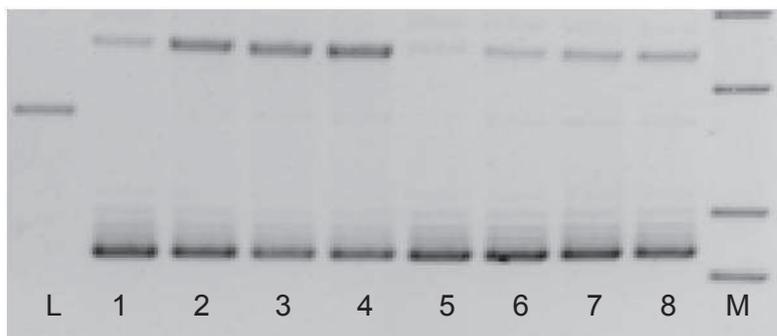
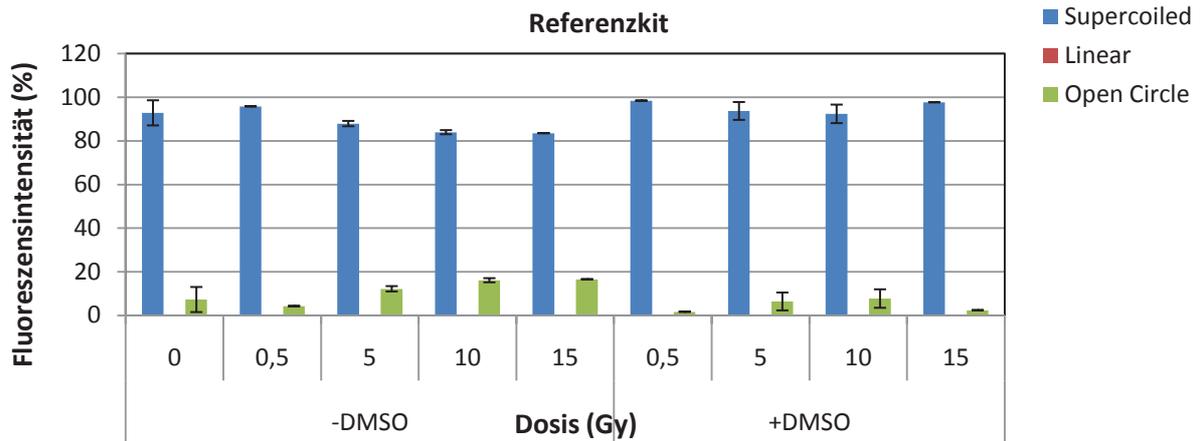


Abb. 35: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem Referenz-Kit mit unterschiedlichen Dosen Spuren 1-4: Plasmid + Referenzkit (0.5, 5, 10, 15) Gy; Spuren 5-8: Plasmid + Referenzkit (0.5, 5, 10, 15) Gy + 0.2 M DMSO (A) Spuren 1-4: Plasmid + Referenzkit (4, 40, 80, 120) Gy; Spuren 5-8: Plasmid + Referenzkit (4, 40, 80, 120) Gy + 0.2 M DMSO (B)

A



B

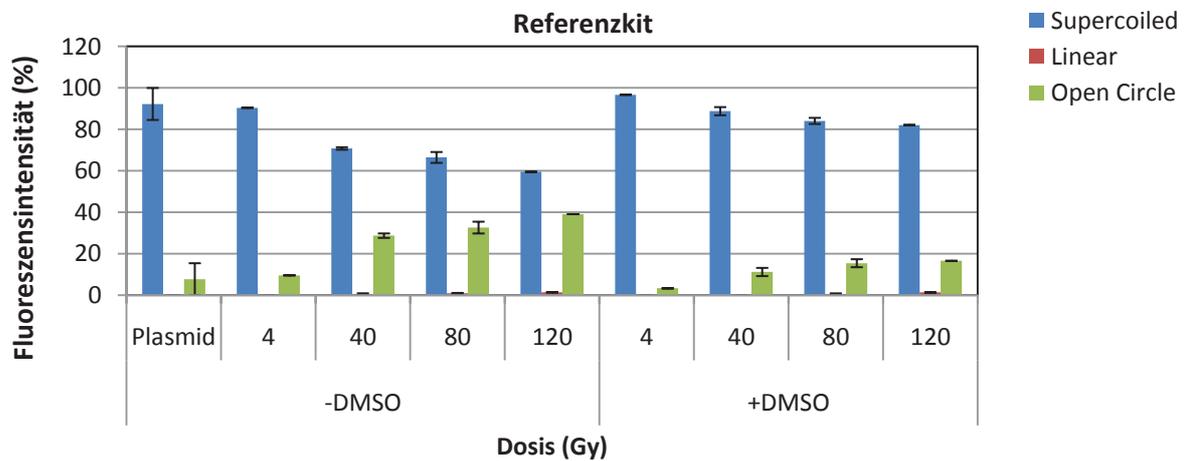


Abb. 36: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem Referenz-Kit mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B) Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM

Die Schädigung der DNA durch das Kit ist mit der von ^{99m}Tc -Pertechnetat vergleichbar und lässt sich durch Radikalfänger Zugabe größtenteils verhindern (Tabelle 19).

Tabelle 19: p-Werte Referenzkit

	K/80 Gy +DMSO	80 Gy ^{99m}Tc / 80 Gy Kit
sc Änderung	0,4056	0,2176
lin Änderung	-	-
oc Änderung	0,4340	0,2150

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie unterschiedliche Strahlenqualitäten Plasmid-DNA schädigen. In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Radionuklide ^{123}I und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) zwar in die Rattenschilddrüsenzellen PCCI3 aufgenommen werden, sich allerdings vorwiegend im Zytoplasma und nicht im Zellkern aufhalten (Dissertation Berger 2012). Eine Aussage überproportionaler Radiotoxizität bei sich in unmittelbarer Nähe der DNA befindlichen Radionukliden und speziell Auger-Emittern war somit in der Zellkultur leider nicht möglich. Deshalb wählte man in dieser Arbeit ein zellfreies System, um Zellwandbarrieren zu umgehen und Strahlenschäden und Chemotoxizität auf die DNA zu untersuchen. Es wurden die unterschiedlichen Effekte der Radionuklide mit ihren verschiedenen physikalischen Eigenschaften untersucht und verglichen. Der Einfluss des Radikalfängers DMSO auf die ESB und DSB bei verschiedenen Strahlenqualitäten wurde getestet. Als DNA kam das Plasmid pUC 19 zum Einsatz. In den weiteren Abschnitten der Diskussion wird auf das biologische System Plasmid, die Ergebnisse, deren Limitationen und einige Überlegungen zu sinnvollen Folgeuntersuchungen näher eingegangen.

4.1 Plasmid pUC 19

Plasmide sind extrachromosomale, meist doppelsträngige DNA-Moleküle ohne Proteine und kommen in der Regel in Bakterien vor. Sie sind oft Träger von Antibiotikaresistenzgenen und können zwischen Bakterien ausgetauscht werden. In der Molekularbiologie können Plasmide als Vektoren eingesetzt werden, um Gene zu transferieren. Es handelt sich bei pUC 19 um ein Derivat des sehr früh synthetisierten Plasmids pBR322 (Bolivar et al. 1977). Beide Plasmide vermehren sich in *Escherichia Coli*. Das Plasmid pUC 19 ist im Unterschied zu seinem Vorläufer ein sogenanntes high copy number-Plasmid, das heißt, es werden aufgrund einer Punktmutation im Replikationsprimer bei Temperaturen von 37 °C weitaus mehr Kopien hergestellt, als es bei pBR322 der Fall ist. Dieser Effekt lässt sich bei einer Erhöhung der Bruttemperatur auf 42 °C noch weiter steigern (Lin-Chao et al. 1992). Die Plasmide sind durch ein Ampicillin-Resistenzgen (Apr) (Bolivar et al. 1977) resistent gegen Ampicillin, was eine einfache Selektion der pUC 19 enthaltenden *E. coli* ermöglicht. Aus diesen Gründen ist pUC 19 ein häufig verwendetes Plasmid in der molekularbiologischen Forschung. Zu Beginn der Experimente arbeiteten wir mit pUC 19, welches von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Jessberger an der TU Dresden hergestellt wurde. Aufgrund der benötigten Mengen und des günstigen Preises von industriell hergestelltem pUC 19, entschieden wir uns auf Plasmide kommerzieller Hersteller umzusteigen. Ein weiterer Vorteil des industriellen Plasmids bestand in der höheren Plasmidkonzentration, da alle Bestrahlungsexperimente in einem Volumen von 20 µl durchgeführt wurden.

4.2 ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI -DNA-Bindungsnachweis

In Versuch 3.1 konnte ein direkter Bindungsnachweis von ^{99m}Tc -DAPI-HYNIC erbracht werden. Diese Bindung ist elementar für das Induzieren von DSB durch Auger-Elektronen mit sehr kurzer Reichweite. Nach Inkubation mit 10 MBq ^{99m}Tc -DAPI-HYNIC konnte ein ^{99m}Tc /Plasmid Verhältnis von 0,18 und nach Inkubation mit 20 MBq ^{99m}Tc -DAPI-HYNIC konnte ein ^{99m}Tc /Plasmid Verhältnis von 0,39 ermittelt werden. Es wird somit durchschnittlich ca. jedes fünfte bzw. jedes dritte Plasmidmolekül durch ^{99m}Tc -DAPI-HYNIC markiert. Beachtet werden muss außerdem, dass nach Berechnungen von Humm und Charlton (Humm und Charlton 1989) 0,43 DSB pro ^{99m}Tc Zerfall entstehen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass in den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen mit ^{99m}Tc -DAPI-HYNIC durch Bestrahlung mit 20 MBq ^{99m}Tc -DAPI-HYNIC bei Kompletterfall maximal ca. 13 % direkte DSB durch Auger-Elektronen in die sc-Fraktion induziert werden können.

4.3 Standardisierung der Messergebnisse und Quantifizierung

4.3.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Agarosegele, welche in diesen Experimenten verwendet wurden, enthielten immer zwanzig Taschen und Spuren um Proben aufzutragen. Um auszuschließen, dass es Variationen der Fluoreszenzintensität zwischen den verschiedenen Spuren gibt, beispielsweise durch abweichende Laufeigenschaften der inneren zu den äußeren Spuren während der Elektrophorese oder unterschiedliche Belichtung der Gelränder und der Gelmitte, wurden Versuche durchgeführt. Es wurde eine Strahlenqualität gewählt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf einem Gel für alle DNA-Konformationen zu überprüfen. In die Taschen 2-19 wurde jeweils Plasmid pipettiert, welches zuvor mit 10 MBq ^{188}Re für 1 h, sowie 24 h bestrahlt wurde.

Mit ^{188}Re wurde eine ausreichende Energiedosis erreicht, um nach 1 h Bestrahlungszeit drei Konformationen zu zeigen (sc, oc, linear). Nach 24 h verschwand die Supercoiled-Bande und es konnten noch zwei Konformationen beobachtet werden. Es konnte somit untersucht werden, ob eine gleichmäßige Ausleuchtung des gesamten Gels gewährleistet ist. Als Maß der Variation der Fluoreszenzintensität verschiedener Plasmidkonformationen wurde der Variationskoeffizient gewählt. Der größte VK wurde nach einstündiger Inkubationszeit bei den linearen Konformationen mit 9,3 % berechnet. Bei allen anderen Konformationen, sowohl nach 1 h wie nach 24 h Inkubation, lag der VK bei ≤ 3 %.

Der etwas größere VK von 9,3 % ist damit zu erklären, dass nach 1 h nur ein kleiner Anteil an linearisiertem Plasmid von ca. 2,5 % und damit eine höhere Streuung vorliegt. Im Vergleich zu Variationskoeffizienten bei radiobiologischen Tests an Zelllinien, bei denen der VK oft zwischen 20 % und 30 % liegen kann, ist auch der höchste gemessene Wert von 9,3 % niedrig. Es kann davon ausgegangen werden, dass die einzelnen Spuren der Versuche unabhängig vom Auftrageort auf dem Gel miteinander verglichen werden können.

4.3.2 Untersuchung der Intensitätsänderung der Banden bei unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen

In den hier beschriebenen Versuchen wurde die Agarose-Gelelektrophorese dazu verwendet, um unterschiedliche DNA-Konzentrationen anhand ihrer Proportionalität zur Fluoreszenzintensität zu quantifizieren. In dieser Voruntersuchung sollte gezeigt werden, dass eine Korrelation besteht. Dies muss vor allem für einen Bereich ≤ 100 ng gelten, da 100 ng die aufgetragene Plasmidmasse pro Spur in allen anderen Versuchen ist. Das Auftreten von lin- und oc-Konformationen und die abnehmende sc-Konformation durch Induktion von Strangbrüchen führt zu Banden mit einer Plasmidmasse von weniger als 100 ng. Aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten und den dazugehörigen Plasmidmassen wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt und ein Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,973$ ermittelt. Es können 97,3 % der Streuung der Fluoreszenzintensität durch eine lineare Abhängigkeit von der Plasmidmenge erklärt werden. Somit kann von einer linearen Abhängigkeit zwischen Plasmidmasse und Fluoreszenzintensität bei den hier durchgeführten Versuchen ausgegangen werden kann.

4.4 Einfluss physikalischer und chemischer Parameter auf die Plasmid-DNA

4.4.1 Einfluss von DMSO auf die Plasmid-DNA

In höheren Konzentrationen ist DMSO ein Zellgift, voraussichtlich besitzt es aber bei Konzentrationen ≤ 10 % keine zytotoxische Wirkung (Da Violante et al. 2002). Um eine Toxizität auf ungeschützte DNA schon bei geringeren Konzentrationen auszuschließen, wurde Plasmid für 1 h bzw. 24 h mit 0,2 M DMSO inkubiert und anschließend mit einer unbehandelten Kontrollprobe verglichen. Der Unterschied der Abnahme der sc-Konformation zwischen der Kontrollprobe und der mit DMSO versetzten Probe war nicht signifikant ($p_{1h} = 1,0$ / $p_{24h} = 0,37$). Für die Entstehung der oc-Konformation wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede

zwischen Kontrolle und DMSO behandelter Probe gefunden ($p_{1h} = 1,0$ / $p_{24h} = 0,41$). Es besteht demnach kein Grund zur Annahme, dass 0,2 M DMSO in dieser Konzentration bei den hier verwendeten Inkubationszeiten toxisch auf das Plasmid wirkt.

4.4.2 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Plasmidintegrität

Im Experiment 3.3.2 wurde getestet, ob die Inkubationstemperatur einen Einfluss auf die Konformation von pUC 19 hat. Es wurden die vier Temperaturen -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$ und $+37^{\circ}\text{C}$ miteinander verglichen. Die Messunterschiede waren zwischen -20°C und $+37^{\circ}\text{C}$ am größten. Aus diesem Grund wurden die Werte dieser beiden Bedingungen auf statistische Signifikanz untersucht. Die p-Werte ($p_{1h}=0,89$; $p_{24h}=0,50$) zeigen keine Signifikanz und somit kann davon ausgegangen werden, dass das Plasmid bei den hier aufgeführten Temperaturen bis 24 h Inkubation vergleichbar stabil ist.

4.4.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Plasmidintegrität mit und ohne Bestrahlung

In der Versuchsreihe im Abschnitt 3.3.3 wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die DNA Konformation in einem Bereich zwischen 5,8 und 8,2 getestet. Die pH-Werte der hier gezeigten Versuche lagen im Bereich zwischen 6,9 und 7,5. Der größte Unterschied bei den Messungen lag während beider Inkubationszeiten (1h/24h) bei den pH-Werten 6,5 und 8,1 vor. Es zeigt sich bei der Betrachtung der p-Werte weder bei der Reduktion der sc-Bande, ($p_{1h} = 0,18$; $p_{24h} = 0,10$) noch beim Anstieg der oc-Bande ($p_{1h} = 0,18$; $p_{24h} = 0,32$) eine statistische Signifikanz. Sahu et.al stellten bei der Bestrahlung von Plasmid DNA mit ^{111}In eine um Faktor 2,7 erhöhte Schädigung bei pH 4,9 im Vergleich zu pH 7,2 fest (Sahu et al. 1995). Aus diesem Grund wurde im folgenden Versuch untersucht, ob ein solcher Effekt auch bei dem hier verwendeten Plasmid im pH Bereich von 5,8-8,2 auftritt. Es wurde als Strahlenqualität externe Röntgenstrahlung gewählt, um den eingestellten pH-Wert der Proben nicht durch Zugabe von weiteren Substanzen zu verändern. Die gemessenen Ergebnisse der beiden pH-Werte, welche den höchsten bzw. niedrigsten Schaden aufwiesen, wurden auf statistische Signifikanz getestet. Mit diesen Daten wurde ein t-Test durchgeführt, um eine Signifikanz festzustellen. Weder bei der Betrachtung der Unterschiede der Proben ohne DMSO pH 7, pH 7,4 ($p_{sc} = 0,1547$; $p_{li} = 0,055$; $p_{oc} = 0,1856$), als auch der Proben mit DMSO pH 5,8, pH 7,5 ($p_{sc} = 0,1393$; $p_{oc} = 0,1393$), konnten eine signifikante Abweichungen gemessen werden. Eine mögliche Erklärung, weshalb im Vergleich zu den Autoren Sahu et al. kein Unterschied gemessen werden konnte ist, dass eine signifikante Änderung erst bei niedrigeren pH-Werten auftritt. Der in den hier gezeigten Versuchen niedrigste pH-Wert der Proben lag bei 5,8 im Gegensatz zu 4,9 bei Sahu. et. al. Ebenfalls wäre es möglich,

dass ein Unterschied der Strahlensensibilitätsänderung bei verschiedenen pH-Werten zwischen dem hier verwendeten Plasmid pUC 19 und dem von Sahu et. al verwendeten Plasmid pBR322 besteht. Ob das bei den verwandten Plasmiden pUC 19 und pBR322 zutrifft, kann hier nicht beantwortet werden und müsste in weiterreichenden Experimenten gezeigt werden.

Entscheidend für die Versuche dieser Arbeit ist, dass die pUC 19 Konformationsänderungen nicht durch die pH-Werten beeinflusst werden.

4.5 Schädigung der DNA durch SnCl₂ im TechneScan PYP-Kit

Das TechneScan PYP-Kit wird in der Nuklearmedizin bei der Blutpool-Szintigraphie und zur in vitro Erythrozytenmarkierung benutzt. Um Erythrozyten mit ^{99m}Tc zu markieren wird SnCl₂ als Reduktionsmittel im Kit verwendet (Weinstein et al. 1971). Es ist bekannt, dass Zinnchlorid durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowohl Zellen (Dantas et al. 1996; Dantas et al. 2002), als auch Plasmid DNA (Dantas et al. 1999; de Mattos et al. 2000) schädigt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Zinnchlorid sowohl direkt mit calf thymus DNA interagiert (de Mattos et al. 2005), als auch eine irreversible intrazelluläre ^{99m}Tc-Retention in PCCl3 Zellen (Wunderlich et al. 2012) bewirkt. Über das mutagene Potenzial von SnCl₂ wurde ebenfalls berichtet (Cabral et al. 1998). Untersuchungen mit Plasmid DNA und SnCl₂x2H₂O liegen vor (de Mattos et al. 2000) und zeigen eine steigende DNA Schädigung in Abhängigkeit von der SnCl₂ Konzentration. Für die in dieser Arbeit gezeigten Versuche mit SnCl₂ benutzten wir als Zinnchlorid-Quelle das TechneScan-Kit. Das Ergebnis zeigte ebenfalls eine vermehrte DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der SnCl₂-Konzentration der Proben. Schon bei der niedrigsten Konzentration von 10 µg/ml SnCl₂ war ein signifikanter Anstieg der ESB und ein Rückgang der sc-Fraktion zu sehen (p= 0,0016). Aufgrund der zu erwartenden indirekten Schädigung durch ROS, wurde versucht die DNA durch Zugabe von DMSO vor der Radikalwirkung zu schützen. Wenn die Proben vor Zugabe von SnCl₂ mit 0,2 M DMSO versetzt wurden, konnte selbst bei der höchsten verwendeten SnCl₂ Konzentration von 100 µg/ml keine signifikante DNA-Schädigung mehr festgestellt werden. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass der Schaden durch ROS entsteht. Diese, mit de Mattos et. al. vergleichbaren Ergebnisse zeigen, dass der Schaden nach Inkubation mit Zinnchlorid aus dem TechneScan PYP-Kit ähnlich dem Schaden nach Inkubation von SnCl₂ in wässriger Lösung ist.

4.6 Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach Exposition von Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten

4.6.1 Bestrahlung des Plasmides mit Röntgenstrahlung

Röntgenstrahlung zählt wie γ -Strahlung zu den Strahlenqualitäten mit niedrigem LET und verursacht deshalb ebenfalls Schäden über indirekte Effekte (Pouget und Mather 2001). Die hier verwendete Röntgenröhre verfügte über eine Dosisleistung von 1,235 Gy/min. Das Plasmid wurde bis zu einer Dosis von 80 Gy jeweils mit und ohne Zugabe von DMSO bestrahlt.

Das Ergebnis zeigt eine mit der Dosis ansteigende Anzahl ESB, die sich durch vorherige Zugabe von DMSO bis zur Höchstdosis von 80 Gy verhindern lassen. Schon die geringste Bestrahlungsdosis von 5 Gy verursachte beim Plasmid ein signifikantes Auftreten von ESB und eine signifikante Abnahme von Supercoiled-DNA im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollprobe ($p=0,0001$). Dies setzte sich bis zu 80 Gy weiter fort. Ein Auftreten von DSB konnte nicht festgestellt werden. Die Proben, welche zuvor mit Radikalfänger versetzt wurden, zeigten bis zur Höchstdosis keine signifikanten Anzeichen von DNA-Schäden ($p=0,28$). Dieses Ergebnis spricht für eine indirekte, radikalvermittelte Schädigung der DNA, wie es durch Röntgenstrahlung mit niedrigem LET zu erwarten war. In der Literatur wird über DSB nach Bestrahlung mit externen Röntgenröhren berichtet, allerdings wurde dort die DNA mit 250 Gy und 1500 Gy bestrahlt (Brezeanu et al. 2009). Solch hohe Dosen konnten mit der uns zur Verfügung stehenden Röntgenröhre nicht appliziert werden. Wir hatten allerdings die Möglichkeit, mit ^{188}Re das Plasmid mit höheren Energiedosen zu bestrahlen.

4.6.2 Bestrahlung mit dem β -Strahler Rhenium-188 (^{188}Re)

Die Verwendung des Nuklids ^{188}Re in den hier gezeigten Versuchen ermöglichte zwei grundsätzliche Dinge. Einmal konnte mit dem β -Strahler eine zusätzliche Strahlenqualität im Bezug auf Plasmidschädigung untersucht werden, andererseits erreichte man im Inkubationsvolumen eine höhere Energie bei vergleichbarer Aktivität, als mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ oder der verwendeten externen Röntgenröhre. Da ^{188}Re ebenfalls über einen niedrigen LET verfügt, war die Hypothese, dass der Strahlenschaden mit dem der Röntgen- und γ -Strahlung vergleichbar ist. Durch Bestrahlung des Plasmids mit ^{188}Re konnte mit steigender Dosis ein Verschwinden der sc-Fraktion beobachtet werden. Nach Bestrahlung mit einer Energiedosis von 150 Gy war eine Reduktion der sc-Fraktion auf 9,3 % zu beobachten. Dies deckt sich mit Beobachtungen anderer Autoren bei der Bestrahlung von Plasmid-DNA (Milligan et al. 1995). Bei ca. 1200 Gy war das

sc-Plasmid komplett zerstört, was ebenfalls in Einklang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen steht (McMahon und Currell 2011). McMahon et al. nutzten zur Applikation der Energiedosis Röntgenstrahlung und bestrahlten eine andere Plasmidform (PCDNA 3.1). Trotz dieser Unterschiede kamen sie zu einem ähnlichen Ergebnis. Bis 1200 Gy findet sich gleichermaßen ein Anstieg an ESB sowie DSB. Bei einer höheren Energiedosis steigen die DSB weiter an, während eine Reduktion an ESB zu beobachten ist. Dies ist dadurch zu erklären, dass neue oc-Konformationen nur durch einen Strangbruch in einem intakten Supercoiled-Plasmid entstehen. DSB können theoretisch auf zwei verschiedene Arten geschehen. Die erste Möglichkeit ist durch einen starken Schaden, wie es durch direkte Treffer mit einem Teilchen mit hohem LET der Fall ist (Pouget und Mather 2001). Dadurch brechen bei einem Ereignis beide DNA Stränge und es entsteht ein DSB. Die andere Möglichkeit einen DSB zu produzieren, besteht darin, dass zwei in unmittelbarer Nähe liegende ESB auf gegenüberliegenden DNA Strängen entstehen (Smialek et al. 2009). Da bei 1200 Gy die sc-Fraktion komplett verschwunden ist, gibt es keine Möglichkeit mehr oc-DNA zu erzeugen, da sich diese nur aus einem Supercoiled-Plasmid entwickeln kann. Jedoch führt jeder zusätzlich erzeugte ESB in einem oc-Plasmid, welcher sich auf dem komplementären Strang in unmittelbarer Nähe eines schon bestehenden ESB befindet, zum DSB. Dies führt zu einem Ansteigen der ESB:DSB Verhältnisses von 40:1 bei niedrigen Dosen auf bis zu 2:1 bei hohen Dosen. Die Mittelwerte der Anteile der geschädigten Plasmid-DNA bei 3000 Gy ^{188}Re betragen für sc: 0%; li: 9,4 %; oc: 23,9%. Da die Summe nicht 100 % beträgt, liegt daran, dass bei zwei von drei Versuchen alle Konformationen des Plasmids komplett zerstört wurden. Eine sinnvolle Aussage über die Verhältnisse der verschiedenen Konformationen zueinander ist bei dieser Dosis nicht mehr möglich. So wie mehrere ESB in derselben Plasmidregion zu einem DSB werden, ist es möglich das ein linearisiertes Plasmid noch einen oder mehrere DSB bekommt und dadurch kleinere Plasmidfragmente entstehen (Kassis et al. 1999b). Diese kleinen Fragmente sind mit Agarose-Gelelektrophorese nicht mehr auffindbar. Im Vergleich zur Röntgenstrahlung wurde bei ^{188}Re eine etwas größere Schädigung bei vergleichbarer Dosis festgestellt. 80 Gy Röntgenstrahlung: sc: 39,8%; li: 0%; oc: 60,2% im Vergleich zu 75 Gy ^{188}Re : sc: 30,2 %; li: 3,8%; oc: 66,0 %. Proben, welchen vor Bestrahlung DMSO zugesetzt wurde, zeigten bis 120 Gy keine signifikante Zunahme (p-Werte: 0,3642) an DNA Schäden im Vergleich zur Kontrollprobe. Bei 200 Gy + DMSO war eine eindeutige Zunahme (p= 0,0001) an Brüchen im Vergleich zur unbehandelten Probe feststellbar. Der Schaden war aber sehr viel niedriger als bei der 200 Gy Probe ohne DMSO (p= 0,0001). Das zeigt, dass DMSO auch beim β -Strahler ^{188}Re DNA Schädigung in großem Maße verhindern kann. Ab einer Dosis von 200 Gy war DMSO nicht mehr in der Lage alle Brüche zu verhindern, was dafür spricht, dass die protektive Kapazität von DMSO begrenzt ist. Das ESB:DSB Verhältnis verschiebt sich bei den Proben mit DMSO in den höheren Bereich von 10:1 bis 20:1. Die Verhinderung aller Schäden bis 120 Gy, die Verhinderung der Mehrzahl der Brüche durch DMSO bis zur Höchstdosis von

3000 Gy und ein großen ESB:DSB Verhältnis bei hohen Dosen spricht für eine indirekte Schädigung des Plasmids durch Radikalbildung.

4.6.3 Bestrahlung mit dem α -Strahler Radium-223 (^{223}Ra)

Durch Bestrahlung des Plasmids mit dem α -Strahler ^{223}Ra , war es möglich eine zusätzliche Strahlenqualität mit hohem LET in die Versuchsreihe einzubeziehen. $^{223}\text{RaCl}_2$ ist eine neue Therapiemöglichkeit bei der Behandlung von Knochenmetastasen und diesbezüglich befinden sich Pharmazeutika in der klinischen Erprobungsphase (Nilsson et al. 2012). Beim α -Zerfall werden Heliumkerne freigesetzt. α -Strahlung gilt als Strahlenqualität mit hohem LET (Baidoo et al. 2013). Der LET von ^{223}Ra beträgt 110 keV/ μm . Diese Strahlung verfügt über eine deutlich höhere Relative Biologische Wirksamkeit (RBW) (Franken et al. 2012) (20 im Vergleich zu 1 bei β - und γ -Strahlung) (Pouget und Mather 2001). Mitverantwortlich dafür ist wahrscheinlich ein höherer komplexer DNA-Schaden (Milligan et al. 2001; Terato et al. 2004). Dieser komplexe Schaden ist für die Zelle schwerer zu reparieren (Pinto et al. 2002; Pastwa et al. 2003; Runge et al. 2009). Sie ist im zellulären System effektiver im Induzieren von DSB (Löbrich 1996), deshalb ist das Verhältnis ESB:DSB kleiner, also in Richtung der DSB-Induktion verschoben (Roots et al. 1990). Neueste Studien zeigen ebenfalls eine höhere Effektivität bei der Bestrahlung von Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms und Endothelzellen im Vergleich zu Röntgenstrahlung (Riquier et al. 2013).

Im vorliegenden Versuch ist bei Bestrahlung von pUC 19 mit ^{223}Ra schon bei einer Energiedosis von 40 Gy, zusätzlich zum Verlust der sc-Fraktion ($p=0,0017$), eine Zunahme an ESB (p -Wert: 0,0017) sowie erste DSB ($p=0,0039$) festzustellen. Mit höherer Dosis ist ein weiterer Anstieg der DNA-Schädigung zu beobachten. Das ESB:DSB Verhältnis liegt im niedrigeren Dosisbereich bis 120 Gy zwischen 40:1 und 10:1, im höheren Dosisbereich von 180 Gy bis 1750 Gy liegt es zwischen 3:1 und 1:1 und somit deutlich niedriger als nach der Bestrahlung mit ^{188}Re . Der Versuch zeigte somit in Übereinstimmung mit Roots et al. eine höhere Effektivität in der Induktion von DSB mit α -Strahlung. Wenn den Proben vor Bestrahlung DMSO zugegeben wurde, konnte zwischen 40 Gy mit und ohne DMSO eine signifikante Reduktion aller Schäden ($p=$ sc: 0,0017; li: 0,0039; oc: 0,0076) beobachtet werden. Zwischen der unbehandelten Kontrollprobe und der mit 40 Gy + DMSO bestrahlten Probe, ließ sich kein Unterschied mehr ausmachen ($p=$ sc: 0,7021; oc: 0,7021). Bei weiterer Dosissteigerung konnte DMSO nicht mehr alle Schäden verhindern, das Ausmaß der ESB und DSB der mit DMSO bestrahlten DNA-Proben war aber bei allen Energiedosen geringer als bei DNA ohne DMSO. Dies spricht wie schon bei den ^{188}Re Experimenten dafür, dass DMSO eine begrenzte Kapazität als

Radikalfänger hat oder für einen erhöhten Anteil an direkten Schäden nach Bestrahlung mit ^{223}Ra . DMSO konnte auch bis zur Höchstdosis von 1750 Gy eine große Anzahl der induzierten DSB verhindern, was die Schlussfolgerung zulässt, dass auch bei α -Strahlung ein hoher Anteil an DSB durch indirekte, radikalvermittelte Wirkung zustande kommt. Betrachtet man allerdings das ESB:DSB Verhältnis der Proben mit DMSO, so fällt auf, dass es bei 10:1 – 5:1 liegt. Durch DMSO werden demnach prozentual mehr ESB als DSB verhindert. Dies lässt sich damit erklären, dass viele DSB nicht durch zwei nahe beieinander liegende ESB entstehen, sondern durch einen direkten Treffen eines α -Teilchens direkt aus der sc-Fraktion. Einen beträchtlichen Anteil von 38 % DSB stellten die Autoren Arruda-Neto fest, nachdem sie Plasmid-DNA über einen sehr langen Zeitraum (1 Jahr) mit dem α -Strahler Uran-235 (^{235}U) in sehr niedriger Dosis (15cGy) bestrahlten (Arruda-Neto et al. 2012). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ^{223}Ra das Plasmid auf indirekte und direkte Weise schädigt. Den indirekten, radikalvermittelten Schaden kann man durch Zugabe von Radikalfängern vor der Bestrahlung verhindern. Der direkte Schaden der α -Teilchen lässt sich, wie zu erwarten war, nicht durch DMSO verhindern. Ähnliches wurde in der Literatur mit Zellexperimenten und dem α -Strahler Polonium-210 (^{210}Po) beobachtet (Bishayee et al. 2000). DMSO konnte in diesen Experimenten den von ^{210}Po induzierten Zelltod, welcher häufig durch DSB eingeleitet wird, nicht verhindern.

4.6.4 Bestrahlung mit Tc-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ ist, aufgrund seiner kurzen HWZ von 6 h und seiner monoenergetischen γ -Strahlung, das in der nuklearmedizinischen Diagnostik am häufigsten verwendete Nuklid. Neben der γ -Strahlung mit niedrigem LET (1keV/ μm) emittiert $^{99\text{m}}\text{Tc}$ niederenergetische Konversions- und Auger-Elektronen mit sehr kurzer Reichweite (Howell 1992) (siehe Tabelle 1). Pro Zerfall von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ werden 89 % der freiwerdenden Gesamtenergie als γ -Strahlung frei, wohingegen nur 11 % der Energie als niederenergetische Elektronen abgegeben werden. Die Dosis-Wirkungskurve zeigt ab 10 Gy eine signifikante DNA Schädigung im Vergleich zur Kontrolle ($p= 0,0087$). Mit steigender Dosis nimmt der Schaden stetig zu. DSB sind ab 80 Gy sicher nachweisbar. Der Unterschied im Auftreten von DSB im Vergleich zur Bestrahlung mit der externen Röntgenröhre kann mit dem Verwenden eines anderen Plasmids erklärt werden, welches unbehandelt bereits über 6,4 % ESB verfügt. Diese führen bei Bestrahlung schneller zu DSB, als unbeschädigtes Supercoiled-Plasmid. Die Plasmidproben, denen vor Bestrahlung DMSO hinzugegeben wurde, zeigen bis zur bestrahlten Höchstdosis von 120 Gy keinen signifikanten Unterschied ($p= 0,3376$) im DNA-Schaden. Die Vermeidung der ESB und der komplette Erhalt an Supercoiled-Plasmid durch den Radikalfänger, sprechen für eine radikalvermittelte Wirkung des $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Es scheint,

dass die Bildung von ROS für den kompletten Plasmidschaden verantwortlich ist. Es konnte durch Agarose-Gelelektrophorese kein direkter Effekt auf Plasmid-DNA durch Auger-Elektronen mit hohem LET nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Plasmide nur einzelne Treffer von Augerelektronen bekommen, wenn sich ein zerfallendes ^{99m}Tc -Pertechnetat Molekül in der Nähe eines Plasmidringes befindet. Auf diese Art werden vorrausichtlich zu wenige Plasmide beschädigt, um einen sichtbaren Effekt auszulösen. Diese Experimente legen die Vermutung nahe, dass das gelegentliche, statistische Aufeinandertreffen von ^{99m}Tc -Pertechnetat und pUC 19 in wässriger Lösung nicht ausreicht, um einen detektierbaren Auger-Effekt nachzuweisen.

Stöchiometrische Betrachtungen

Zur Interpretation der Ergebnisse kann die Ermittlung der stöchiometrischen Verhältnisse zwischen Plasmid-DNA und den radioaktiven Liganden hilfreich sein.

Bei jedem Experiment mit ^{99m}Tc -Verbindungen wurden 200 ng Plasmid-DNA eingesetzt, die $6,8\text{E}+10$ DNA-Molekülen entsprechen.

Die Masse von 1 MBq ^{99m}Tc entspricht $3,0\text{E}+10$ ^{99m}Tc Atomen. Das Verhältnis von Ligand (^{99m}Tc) zu der Anzahl von Plasmid-Molekülen (pUC 19) für eine Bestrahlung mit 1 MBq ^{99m}Tc beträgt somit $0,44 : 1$, bei 10 MBq Tc-99m ist die Relation Ligand : DNA = $4,5 : 1$. Es stehen somit etwa fünf ^{99m}Tc -Teilchen pro Plasmid-Molekül zur Verfügung. Ein Molekül pUC 19 verfügt über 2686 Basenpaare, 200 ng pUC 19 entsprechen $1,6\text{E}+14$ Basenpaaren. Es lässt sich ein Verhältnis von Ligand zu Basenpaaren von $0,00165 : 1$ bei einer Bestrahlung mit 10 MBq ^{99m}Tc bestimmen (1 Teilchen ^{99m}Tc pro 606 bp). Balagurumoorthy et. al verwendeten im Experiment mit Plasmid pUC 19 und ^{125}I -Iodo-Hoechst (^{125}HI) eine Ligand : DNA Relation von $3:1$, die einer Ligand:basenpaar ratio von $1:0,00112$ (1 Ligand ^{125}HI pro 895 bp) entspricht (Balagurumoorthy et al. 2012). In den hier gezeigten Versuchen mit ^{99m}Tc lag ein vergleichbares Verhältnis bei 10 MBq ^{99m}Tc (5 Gy nach 1 h bzw. 40 Gy nach 24h) vor. In ihren Versuchen bestrahlten sie pUC 19 für 0, 11, 18 und 33 Tage mit ^{125}I in unterschiedlichem Abstand zum Plasmid. Mit steigender Dosis beobachteten sie verstärkte Strangbrüche im Plasmid. Je näher sich das ^{125}I am Plasmid befand, desto weniger konnte DMSO den verursachten Schaden verhindern. Das Ergebnis, dass ein in unmittelbarer DNA-Nähe lokalisierter Auger-Emitter direkten DNA-Schaden verursacht, stimmt mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten überein. Im Abschnitt 4.6.5 wird darauf ausführlich eingegangen.

Die verwendete ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI Substanz bindet an die kleinen Furchen der DNA. Ausgehend von einer Standard-DNA mit einer Helixwindung von 10 bp stehen damit bei dem hier verwendeten Plasmid pUC19 mit 2686 bp pro DNA-Molekül 268 potentielle Bindungsstellen zur

Verfügung, die $1,84E+13$ Bindungsstellen im Versuchsansatz entsprechen. Wenn man annimmt, dass jede dieser Bindungsstellen mit einem ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI Molekül besetzt ist, kann man über folgende Formel die Anzahl der Zerfälle in unmittelbarer DNA-Nähe berechnen:

$A = \text{Aktivität}; N = 1,84E+13$ (Anzahl der Bindungsstellen); $T_{1/2} = 21600\text{s}$

$$A = \frac{N \times \ln 2}{T_{1/2}} = 5,9E + 8 \text{ Bq}$$

Pro Bq finden 33000 Zerfälle statt. Bei einer vollständigen Belegung aller Bindungsstellen, zählt man $1,95E+13$ Zerfälle von ^{99m}Tc in DNA-Nähe bei $6,8E+10$ Plasmiden. Diesen Berechnungen zufolge und der in Modellen berechneten Anzahl der DSB pro Zerfall (Humm et al. 1994) könnte man von einer totalen Vernichtung aller Plasmidringe ausgehen. Dies konnte in den eigenen Versuchen nicht reproduziert werden. Hierfür gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten: In den Experimenten lag die verwendete Maximalaktivität bei $30 \text{ MBq } ^{99m}\text{Tc}$. Aus den vorherigen Berechnungen folgt, dass $30 \text{ MBq } ^{99m}\text{Tc}$ $9E+11$ Atomen entsprechen. Es standen somit in keinem Versuch ausreichend ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI Moleküle zur Besetzung aller Bindungsstellen zur Verfügung. Zudem wurde in den Versuchen aufgrund von pH-Inkompatibilitäten nur ungereinigte Substanz verwendet, d.h. es sind nicht alle ^{99m}Tc Atome an HYNIC-DAPI gebunden bzw. es existiert ein hoher Überschuss an unmarkierten HYNIC-DAPI. Ebenfalls kann nicht abschließend geklärt werden, ob jedes ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI Molekül an eine freie Bindungsstelle bindet. Diese Gründe können erklären, weshalb nach Bestrahlung mit ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI zwar einige direkte DSB auftreten, jedoch keine vollständige Vernichtung des Plasmids stattfindet.

4.6.5 Bestrahlung mit der Substanz Tc-99m-HYNIC-DAPI

Die Idee Auger-Emitter an die DNA zu binden, um den Schaden der hohen Energie mit kurzer Reichweite zu untersuchen, besteht schon längere Zeit. ^{111}In ist ein Auger-Emitter und bindet über ionische Wechselwirkungen ohne zusätzliche Stoffe an die DNA (Kalfas et al. 1984). Schon früh wurde beobachtet, dass intrazellulär angereicherte Auger-Emitter Strahlenschäden in Zellen verursachen, die über den durch Dosimetrie berechneten liegen (McLean et al. 1989). Die Möglichkeit ^{111}In einerseits an die DNA zu binden, andererseits die Bindung durch Zugabe von Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) einfach zu verhindern, wurde genutzt um den Strahlenschaden auf ungeschützte DNA zu untersuchen (Sahu et al. 1995). Hierbei zeigten sich vermehrt Strangbrüche beim an die DNA gebundenen ^{111}In , im Vergleich zum Ungebundenen. Eine Möglichkeit auch andere Auger-Emitter in den Zellkern zu bringen und somit ihre Wirkung auf die DNA zu beobachten, besteht in der Verwendung von Hormonkopplung (DeSombre et al.

1996) oder DNA-bindenden Fluoreszenzfarben (Yasui et al. 2007). Es wurde mehrfach gezeigt, dass über den leicht zu jodierenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 die Auger-Emitter ^{123}I und ^{125}I an die DNA gebunden werden können (Kassis et al. 1999a; Kassis et al. 1999b; Lobachevsky und Martin 2004; Balagurumoorthy et al. 2008). Dabei zeigte sich, dass nahe an der DNA befindliche Auger-Emitter einen direkten Schadensmechanismus und weiter entfernte einen indirekten Schadensmechanismus auslösen (Balagurumoorthy et al. 2012). Beim Vergleich zwischen Plasmid DNA und Zellen unterschieden sich die beiden biologischen Systeme dadurch, dass DMSO den Schaden von DNA-gebundenen Auger-Emittern nicht verhindern konnte, der Zellschaden konnte allerdings abgeschwächt werden (Kassis et al. 2000). Auch an der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikum Dresden wurden schon Zellversuche mit Auger-Emittern durchgeführt. In ihrer Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Uniklinikum Dresden, zeigte Frau Vanessa Berger dass ^{123}I und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) in Rattenschilddrüsenzellen (PCCL 3) aufgenommen werden (Dissertation Berger 2012). Frau Sabine Zierold zeigte in ihrer Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Dresden (Dissertation Zierold 2012) ebenfalls, dass $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in PCCL 3- und FRTL 5-Zellen (ebenfalls Rattenschilddrüsenzellen) aufgenommen werden. Der $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - Uptake fand allerdings zu 96 % ins Zytoplasma und nicht in den Zellkern statt (Dissertation Berger 2012). Aufgrund der geringen Reichweite der Auger-Elektronen war deshalb im Zellexperiment eine direkte DNA-Schädigung nicht möglich.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ lässt sich nicht direkt an einen Hoechst 33342-Ring binden. In der Literatur beschreiben Häfliger et. al eine Möglichkeit, wie sie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ an Plasmid-DNA binden (Hafliger et al. 2005). Sie synthetisierten zu diesem Zweck zwei $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tricarbonyl-Komplexe mit den DNA-Bindern Pyren und Anthrachinon. Frau Sandra Ferl, Doktorandin in der Nuklearmedizin am Uniklinikum Dresden, wählte bei der Entwicklung ihrer Substanz einen anderen Weg. Der DNA-bindende Farbstoff DAPI (Tanious et al. 1992) wurde mit Hilfe eines HYNIC Linkers an $^{99\text{m}}\text{Tc}$ gebunden. Mit der Substanz $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI bestand in der Klinik für Nuklearmedizin der TU Dresden die Möglichkeit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ direkt an Plasmid-DNA zu binden und den Schaden zu evaluieren.

Eine Energiedosis von 4 Gy durch $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI sorgte für eine signifikante Reduktion von sc-DNA und einem signifikanten Anstieg an ESB, sowie DSB ($p = \text{sc}: 0,0214; \text{li}: 0,0191; \text{oc}: 0,0475$). Mit steigender Dosis nahm der DNA-Schaden weiter zu. Die Proben, welche mit Radikalfänger DMSO versetzt wurden, zeigten ebenfalls eine signifikante Schädigung, im Vergleich zur Kontrollprobe ($p_{K/80 \text{ Gy} + \text{DMSO}} = \text{sc}:0,0003; \text{lin}:0,0046; \text{oc}:0,0024$). Es war also nicht möglich, das Plasmid mit DMSO vor Strangbrüchen zu schützen. Ein wichtiger Hinweis darauf, dass der Schaden nicht komplett radikalvermittelt ist. Wenn man nun die Ergebnisse der Bestrahlung des Plasmides mit nicht DNA gebundenem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI vergleicht, zeigt sich eine interessante Erkenntnis. Die 80 Gy Werte ohne DMSO unterscheiden sich nur in der Anzahl der DSB signifikant ($p_{\text{lin}} = 0,0177$). Die erhöhte DNA-Schädigung durch $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-

DAPI resultiert also voraussichtlich größtenteils auf eine Zunahme an DSB. Das Ereignis, dass die Anzahl der DSB mit Zunahme der Entfernung des Auger-Emitters von der DNA abnimmt, wurde schon für ^{125}I festgestellt (Adelstein und Kassis 1996; Balagurumorthy et al. 2012). Beim Vergleich der 80 Gy Werte von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-DAPI}$ mit DMSO, zeigt sich bei allen Fraktionen ein signifikanter Unterschied ($p = \text{sc}:0,0005; \text{lin}:0,0046; \text{oc}:0,0024$). Es ist zu vermuten, dass ein Teil der ESB, die das $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-DAPI}$ verursacht ebenfalls nicht radikalvermittelt sind. Die Feststellung, dass Auger-Elektronen ESB verursachen, machten auch die Autoren Sahu et. al mit ^{111}In (Sahu et al. 1995). Bei Betrachtung des ESB:DSB Verhältnis sieht man, dass es für die Bestrahlung mit $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-DAPI}$ zwischen 10:1 und 5:1 liegt. Wenn das Plasmid vor Bestrahlung mit DMSO geschützt wurde, blieb das Verhältnis ebenfalls bei diesem Wert. Ein relativ niedriges Verhältnis an ESB:DSB auch bei DMSO Zugabe, spricht für einen hohen LET, welcher bei einem DNA Treffer mit höherer Wahrscheinlichkeit einen DSB verursacht. Ähnliche Werte wurden bei α -Bestrahlung mit ^{223}Ra gemessen, welche ebenfalls einen hohen LET hat. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass in geringer Entfernung von der DNA befindliches $^{99\text{m}}\text{Tc}$ einen erhöhten Schaden im Vergleich zu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in größerer Distanz verursacht. Dieser Schaden lässt sich zu großen Teilen nicht durch Radikalfänger verhindern, was dafür spricht, dass es sich um direkte DNA-Schädigung handelt. Verantwortlich gemacht werden dafür Auger-Elektronen mit kurzer Reichweite und hohem LET.

4.7 Untersuchung der nicht-radioaktiven HYNIC-DAPI Derivate und Bestrahlung mit dem Referenzkit

4.7.1 Inkubation mit Tc-99-HYNIC-DAPI

Die Substanz DAPI interkaliert in die kleine Furche (minor groove) der DNA und ist damit potentiell toxisch und mutagen. Um auszuschließen, dass von HYNIC-DAPI selbst eine Schädigung der DNA ausgeht, wurde das ≥ 10 HWZ = 60 h abgeklungene Molekül aus dem vorhergehend beschriebenen Versuch in identischen Konzentrationen und Volumina mit Plasmid inkubiert und der Schaden bestimmt. Bei der höchsten getesteten Dosis konnte weder bei den Proben ohne DMSO ($p = \text{sc}:0,8462; \text{oc}: 0,9247$), noch bei den Proben mit DMSO ($p = \text{sc}:0,8700; \text{oc}: 0,9508$) eine signifikante DNA-Schädigung festgestellt werden. DSB wie sie mit $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-DAPI}$ auftraten, konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-DAPI}$ in den hier verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten keine Schädigung der DNA verursacht.

4.7.2 Inkubation mit HYNIC-DAPI Substanz

Zusätzlich wurde noch getestet, ab welcher Konzentration sich die Toxizität des HYNIC-DAPI bemerkbar macht. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe mit unmarkiertem HYNIC-DAPI erstellt und für 1 h und 24 h inkubiert. Die höchste verwendete HYNIC-DAPI Konzentration lag bei 2,5 µg/20 µl Inkubationsvolumen. Bei dieser Menge wurde das Plasmid komplett zerstört und es konnte keine Bande mehr im Gel gefunden werden. Die Toxizität von HYNIC-DAPI in hohen Konzentrationen konnte gezeigt werden. Ab dem nächsten Verdünnungsschritt von 1:10 (0,25 µg/20 µl) konnte keine signifikante DNA Schädigung mehr gemessen werden ($p = sc: 0,6379$; $oc: 0,0711$). Auch die Konzentrationen bis 0,01 µg/20 µl zeigten keine Beschädigung des Plasmids. Die Konzentration der Proben in den ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI Versuchen lag bei 0,02 µg/20 µl. Für diese Menge konnte keine toxische Wirkung von HYNIC-DAPI auf das Plasmid festgestellt werden. Die Versuche mit der ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI und unmarkierter HYNIC-DAPI Substanz machen eine chemotoxische Ursache der Beobachtungen mit ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI sehr unwahrscheinlich und bestätigen die Vermutung eines direkten Effektes durch Auger-Elektronen.

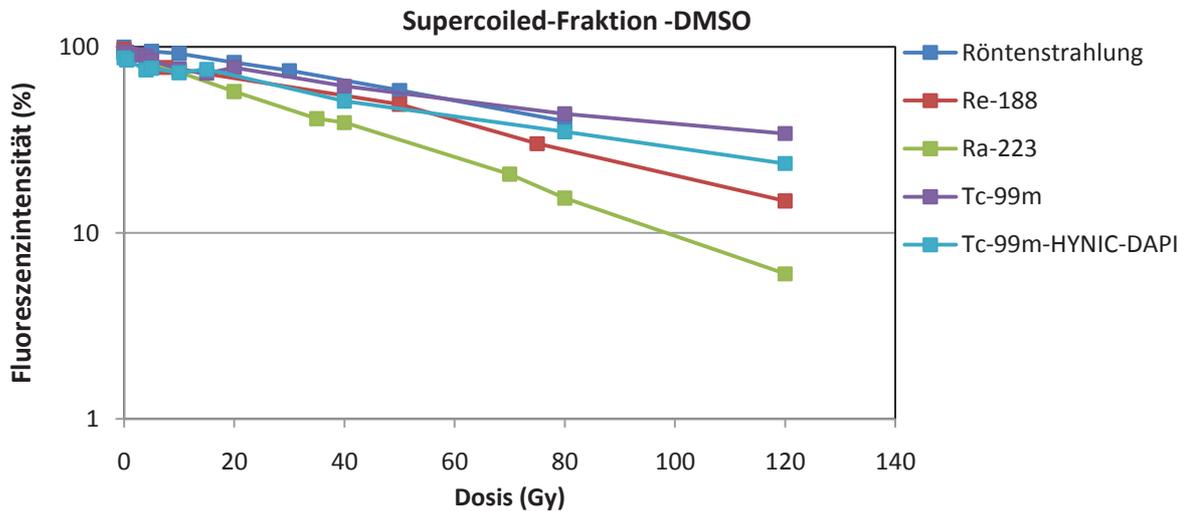
4.7.3 Bestrahlung mit Referenzkit

Bei der Herstellung der Substanz ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI entstanden weitere Metaboliten, welche sich in der Lösung befanden. Es handelt sich dabei um Tricin, SnCl_2 und Pertechnetat. Um auszuschließen, dass der erhöhte beobachtete DNA Schaden von einem anderen der hier enthaltenen Stoffe stammt, wurde Plasmid mit einem Substanzgemisch aus Tricin, SnCl_2 und ^{99m}Tc inkubiert. Die Aktivität des Pertechnetat wurde so gewählt, dass sie vergleichbar mit ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI und ^{99m}Tc war. Mit steigender Dosis nahm die sc-Fraktion ab und ESB konnten beobachtet werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass der induzierte Plasmidschaden nicht signifikant vom Schaden durch ^{99m}Tc abwich. ($p_{80\text{ Gy}} = sc: 0,2176$; $oc: 0,2150$). Wie auch schon bei Bestrahlung mit ^{99m}Tc beobachtet, konnten die Strangbrüche durch vorherige Zugabe von DMSO verhindert werden. Nach einer Energiedosis von 80 Gy +DMSO war noch keine signifikante Änderung der Plasmid-Konformation im Vergleich zu Kontrollprobe erkennbar ($p = sc: 0,4056$; $oc: 0,4340$). Die Befunde sprechen für eine indirekte Schädigung des Plasmids. Auch in diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass ohne die enge DNA Bindung durch ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI keine direkte DNA-Schädigung zu erwarten ist.

4.8 Übersicht Radionuklidbestrahlung und Vergleich mit externer Röntgenstrahlung

4.8.1 Vergleich der Reduktion der Supercoiled-Fraktion nach Bestrahlung

A



B

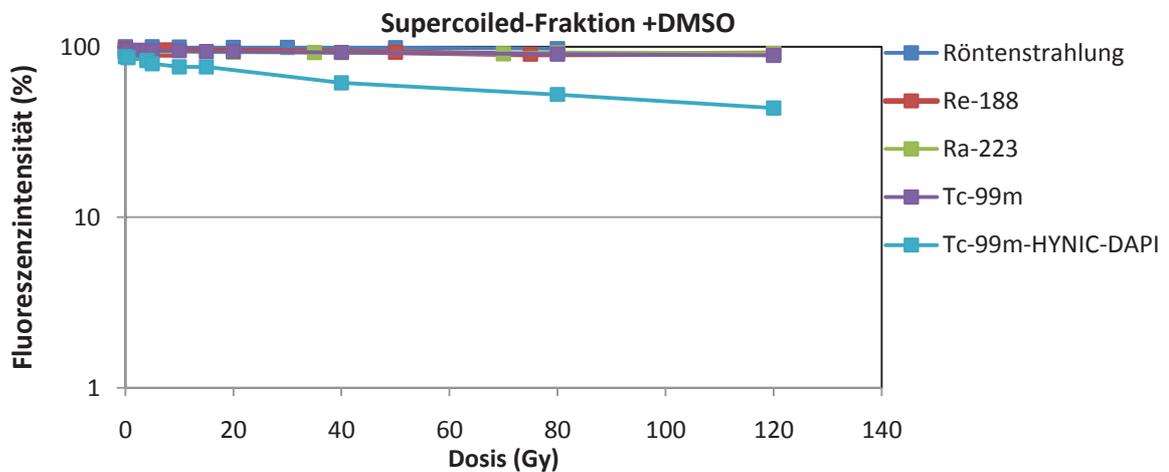


Abb. 37: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Supercoiled-Fraktion im Agarosegel nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten –DMSO (A) und +DMSO (B). Mittelwerte aus drei Versuchen

In Abb. 37 ist die Reduktion der Supercoiled-Fractionen nach Bestrahlung mit den unterschiedlichen Strahlenqualitäten dargestellt. Es wurde hierfür der Bereich zwischen 0 Gy und 120 Gy gewählt, da für diese Energiedosen Werte von allen verwendeten Strahlungsarten erhoben wurden. Abb. 37 A zeigt die steigende Abschwächung der Supercoiled-Bande mit ansteigender Dosis. Die größte Reduktion von Supercoiled-DNA durch Bestrahlung mit ^{223}Ra liegt vermutlich an der erhöhten RBW des α -Strahlers. Abb. 37 B zeigt die Fluoreszenzintensität

der Supercoiled-DNA nach Bestrahlung unter Anwesenheit von DMSO. Im hier gezeigten Bereich kann DMSO den Plasmidschaden bei allen Strahlenqualitäten außer ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI vollständig verhindern. Wie in Abschnitt 4.6.5 dargelegt wurde, wird dieser Effekt der direkten Schädigung durch Auger-Elektronen beimessen. Kassis et al. zeigen bei Ihren Versuchen mit ^{125}I einen ähnlichen Geradenverlauf. Bei nicht DNA-gebundenem ^{125}I zeigen, im Vergleich zu DNA-gebundenem ^{125}I , die Proben mit DMSO einen größeren Erhalt an Supercoiled-DNA (FIG. 3 und FIG. 4. (Kassis et al. 1999b)).

4.8.2 Vergleich der ESB:DSB Verhältnisse

Tabelle 20: Vergleich bei einer Energiedosis von 80 Gy

	Schadensqualität	ESB:DSB (-DMSO)	ESB:DSB (+DMSO)
Röntgenröhre	Indirekt	-	-
^{188}Re	Indirekt	18:1	-
^{223}Ra	Indirekt/Direkt	12:1	-
^{99m}Tc -Pertechnetat	Indirekt	18:1	-
^{99m}Tc -HYNIC-DAPI	Indirekt/Direkt	5:1	5:1

Tabelle 20 zeigt eine Übersicht der ESB:DSB Verhältnisse der unterschiedlichen Strahlenqualitäten bei einer Dosis von 80 Gy. Diese Dosis wurde gewählt, da sie für alle Strahlenqualitäten vorlag. Da durch Bestrahlung mit der Röntgenröhre keine DSB entstanden, konnte kein Verhältnis berechnet werden. Ebenso verhielt es sich bei fast allen Strahlenqualitäten bei Bestrahlung nach Zugabe von DMSO. Nur ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI konnte bei 80 Gy + DMSO DSB erzeugen. Das relativ hohe ESB:DSB von ^{188}Re und ^{99m}Tc (18:1) spricht für einen indirekten Strahlenschaden. Der hohe LET von ^{223}Ra und ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI produziert durch direkte Wirkung mehr DSB, welches sich durch ein niedrigeres ESB:DSB von 12:1 (^{223}Ra) und 5:1 (^{99m}Tc -HYNIC-DAPI) zeigt. Es scheint, dass ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI den größten Anteil an direkter Schädigung vorweist, weshalb das ESB:DSB auch nach Bestrahlung in Anwesenheit von DMSO auf dem niedrigen Niveau von 5:1 bleibt. Ein niedrigeres ESB : DSB Verhältnis nach direkter DNA-Schädigung durch einen plasmidgebundenen Auger-Emitter beschrieben schon Kassis et al. (Kassis et al. 1999a). Nach Bestrahlung von pUC 19 mit γ -Strahlung bestimmten sie pro Gy ein Relation ein ESB : DSB von 43,8 : 1. DNA-gebundenes ^{125}I hatte pro Zerfall nur ein ESB : DSB von 2,9 : 1. Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Messungen überein.

4.9 Methodische Limitationen

Einige Limitationen in der Interpretation der Experimente müssen beachtet werden. Die Agarose-Gelelektrophorese hat einige Ungenauigkeiten, welche aktuell in der Diskussion stehen. Es wird in der Literatur beschrieben, dass sich linearisierte DNA besser mit dem Farbstoff SYBR Green I anfärben lässt als die eng gepackte Supercoiled-DNA. Aufgrund der besseren Zugänglichkeit soll das linearisierte Plasmid überproportional stark fluoreszieren (Rezaee et al. 2013). Einige Testversuche diesbezüglich mit dem Farbstoff Ethidiumbromid von Frau Pauline Fritz, Doktorandin in der Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Dresden, ergaben allerdings nicht reproduzierbare Ergebnisse, so dass wir davon ausgingen, dass in der experimentellen Durchführung alle Plasmidkonformationen gleichmäßig angefärbt werden. Für eine endgültige Beurteilung dieses Phänomens sind weitere Untersuchungen vonnöten.

In der Diskussion wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Methode der Agarose-Gelelektrophorese nicht unterscheiden kann, ob ein DSB aus einem direkten Treffer oder durch zwei nahe ESB auf komplementären Strängen entsteht. Es wird somit nicht jeder ESB ein sc-Plasmid in ein oc-Plasmid umwandeln, sondern es kann auch ein oc-Plasmid in die linearisierte Form überführt werden. Weiterhin entstehen durch zusätzliche ESB in oc-Konformationen, keine neuen oc-Konformationen. Viele ESB bleiben deshalb unerkannt und es muss davon ausgegangen werden, dass die ESB durch die Fluoreszenzintensität der oc-Bande unterrepräsentiert sind. Zu diesem Ergebnis kommt auch ein Vergleich der Agarose-Gelelektrophorese mit dem TUNEL/ELISA-Assay (Smialek et al. 2009). Es könnte sein, dass die ESB um ein zehnfaches höher sind, als die Fluoreszenzintensität erwarten lässt (Balagurumoorthy et al. 2011).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind selbstverständlich nicht ohne weiteres auf Zellkulturen oder gar komplexe biologische Organismen übertragbar. In Zellen liegt die DNA durch Proteine stabilisiert und durch Zellmembranen geschützt vor. Es ist in vielen Versuchen gezeigt worden, dass es äußerst schwer ist, Auger-Emitter in den Zellkern zu transferieren. Außerdem verfügen Zellen über Reparatursysteme, welche DNA-Schäden reparieren können. Es führt deshalb nicht jeder Strangbruch direkt zum Zelltod. Um die Auswirkung von Strahlenschäden durch Auger-Emitter auf Zellen und Organismen genau zu beschreiben, sind weitere Versuche nötig.

4.10 Ausblick

Die in der Literatur beschriebenen und hier gezeigten Ergebnisse bezüglich Auger-Emittern und in dieser Arbeit im Speziellen ^{99m}Tc werfen zwei große Fragen auf, welchen durch weitere Forschung nachgegangen werden sollte. Zum einen ist ^{99m}Tc ein sehr häufig verwendetes Nuklid in der nuklearmedizinischen Diagnostik. Die niederenergetische γ -Strahlung wird als relativ geringe Strahlenbelastung für den menschlichen Körper angesehen. Es sollte in zukünftiger Begutachtung die potentielle Belastung durch Auger-Elektronen eine stärkere Beachtung finden. Desweiteren stellt sich die Frage einer therapeutischen Verwendung von Auger-Emittern beispielsweise im Bereich der Tumortherapie. Aufgrund ihrer sehr geringen Reichweite, wäre eine nebenwirkungsarme Therapie vorstellbar, bei der Normalgewebe geschont wird. Computerberechnungen zum DNA-Schaden von ^{99m}Tc zeigen ein therapeutisches Potential der Auger-Elektronen vergleichbar mit α -Teilchen bzw. β -Teilchen (Tavares und Tavares). Zum Einschleusen von Auger-Emittern in den Zellkern und zur Bindung dieser an die DNA sind bisher einige Systeme getestet worden. Zu diesen gehören DNA-bindende Farben wie Hoechst 33342 (Yasui et al. 2007) oder DAPI in der vorliegenden Arbeit, sowie Basenanaloga (Iodouridine) (Yasui et al. 2001) welche in die DNA eingebaut werden. Eine Aufgabe wird es sein, diese Transportsysteme weiterzuentwickeln, um Auger-Emitter in den Zellkern von Tumorzellen zu befördern. Dies könnte über Hormonrezeptoren (Yasui et al. 2001) oder sogenannte Antigenradiotherapie, bei der spezifische DNA-Sequenzen anvisiert werden (Sedelnikova et al. 2001) gelingen. Ebenfalls ist es gelungen, ^{99m}Tc -Bombesin (^{99m}Tc -BN) in den Zellkern von Gastrin-Releasing Peptid Rezeptor (GRP-R) positiven Zellen zu transportieren. Der GRP-R wird in Brust- und Prostatakrebszellen überexprimiert (Santos-Cuevas et al. 2011). Es wäre dabei vorrausichtlich nicht nötig, einen Auger-Emitter in jeder Tumorzelle zu platzieren. Der sogenannte Bystander Effekt (Xue et al. 2002) bewirkt, dass benachbarte Zellen ebenfalls Schaden nehmen.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Ein sehr häufig in der nuklearmedizinischen Diagnostik genutztes Radionuklid ist ^{99m}Tc . Es emittiert γ -Strahlung mit einer relativ niedrigen Energie (140 keV) und hat eine kurze Halbwertszeit von 6 h. Zusätzlich zur γ -Strahlung entstehen bei jedem Zerfall von ^{99m}Tc Auger-Elektronen. Diese niederenergetischen Elektronen, sehr kurzer Reichweite verfügen über einen hohen LET und erzeugen somit eine ausreichende Energiedeposition, um direkte DSB zu erzeugen.

Bei Untersuchungen zu Chemotoxizität und Radiotoxizität mit Zellexperimenten gilt es eine Vielzahl an verschiedenen Schutzmechanismen, Reparaturmechanismen und Signalkaskaden in Zellen zu beachten, welche häufig noch nicht vollständig erforscht sind. Um das schädigende Potential von unterschiedlichen Substanzen und Strahlenqualitäten auf die DNA zu untersuchen, wurde ein zellfreies System gewählt.

Ziel dieser Arbeit war es, neben den Strahlenqualitäten der α -, β -, γ - und Röntgenstrahlung die Auger-Elektronen des ^{99m}Tc auf ihr Potential zur Induktion von DNA-Strangbrüchen zu untersuchen. Hierfür stand die Substanz ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI zur Verfügung, welche ^{99m}Tc an das Plasmid binden und somit in direkte DNA-Nähe bringen kann.

Material und Methode: Alle Versuche wurden mit dem Plasmid pUC 19, einem künstlich hergestellten, bakteriellen Plasmid mit 2686 Basenpaaren, welches als nackte DNA ohne Proteine vorliegt, durchgeführt. Der Vergleich zwischen bestrahltem Plasmid in Ab- und Anwesenheit des Radikalfängers DMSO gibt Hinweise darauf, ob Strangbrüche direkt induziert oder nach Radikalbildung indirekt erzeugt werden. Bei radikalvermittelter Wirkung verhindert DMSO DNA-Strangbrüche und die ungeschädigte Supercoiled-Plasmid-Konformation bleibt erhalten. Nach Bestrahlung des Plasmids erfolgte der Nachweis von Strangbrüchen mittels Agarose-Gelelektrophorese. Bekommt ein Plasmid Einzel- oder Doppelstrangbrüche, so verändert sich seine Konformation zu einem ringförmigen/open circle (ESB) oder einem linearen Plasmid (DSB). Durch veränderte Laufeigenschaften im Agarosegel sind die verschiedenen Konformationen voneinander trennbar. Nach Anfärben der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid konnte das fluoreszierende Plasmid fotografiert und die Intensität der Konformationsbanden quantifiziert werden.

Ergebnisse: Zuerst wurde die Reproduzierbarkeit der Methodik überprüft und festgestellt, dass eine Korrelation zwischen Plasmidmasse und Fluoreszenzintensität besteht. Anschließend wurde in Vorversuchen gezeigt, dass die Inkubationstemperaturen, pH-Werte und der Radikalfänger DMSO keinen Einfluss auf die Plasmidintegrität haben. Bei Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, dem β -Strahler ^{188}Re und dem nicht DNA-gebundenen γ -Strahler und Auger-Emitter ^{99m}Tc konnte mit steigender Dosis eine Zunahme an ESB festgestellt werden. Vergleichsproben mit DMSO zeigten keinen Anstieg von ESB, was auf eine radikalvermittelte

DNA-Schädigung mittels Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hinweist. Ab einer Energiedosis von ca. 80 Gy konnten nach Bestrahlung mit ^{188}Re und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ zusätzlich zu den ESB auch DSB nachgewiesen werden. DMSO konnte in den Vergleichsproben sowohl die ESB als auch die DSB erfolgreich verhindern. Bei einer sehr hohen Dosis ≥ 600 Gy zeigte DMSO Kapazitätsgrenzen und es konnten nicht mehr alle Strangbrüche verhindert werden.

Die Bestrahlung mit dem α -Strahler (hoher LET) ^{223}Ra fügte, im Vergleich zu Strahlung mit niedrigem LET, dem Plasmid überproportional viele DSB zu. Einige dieser DSB konnten nicht durch DMSO verhindert werden, was auf einen direkten DNA-Schaden bzw. eine zu hohe Radikaldichte hinweist. Ein noch stärkerer direkter Effekt konnte beobachtet werden, wenn $^{99\text{m}}\text{Tc}$ über die Substanz $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI an DNA gebunden wurde. Dabei konnten schon ab einer Energiedosis von 4 Gy DSB erzeugt werden, welche trotz Radikalfänger nicht verhindert werden konnten.

Schlussfolgerung: Dieser bei $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI beobachtete Effekt wird den Auger-Elektronen zugeschrieben. Aufgrund ihrer kurzen Reichweite und ihres hohen LET sind sie in der Lage direkte DSB zu erzeugen, wenn sie DNA-gebunden sind oder sich in geringem Abstand zur DNA befinden.

Die Ergebnisse der Experimente weisen auf ein therapeutisches Potential von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ hin. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob eine Adressierung von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ an die DNA im Zellkern einer intakten Zelle zu verwirklichen ist und ob DNA-gebundenes $^{99\text{m}}\text{Tc}$ durch die Energie der Auger-Elektronen den Zelltod herbeiführen kann. Im nächsten Schritt sollte die Erforschung von Trägersubstanzen erfolgen, welche es ermöglichen Auger-Emitter spezifisch an die DNA von Tumorzellen zu koppeln.

6 Abstract

Introduction and aim of the study: A radionuclide commonly used in diagnostic nuclear medicine is ^{99m}Tc . It emits γ rays with a relatively low energy (140 keV) and has a short half-time (6h). In addition to γ rays, ^{99m}Tc radiates so called Auger-electrons with low energy, low range and high linear energy transfer. Due to the high-LET Auger-electrons have a sufficient energy deposition to induce direct double-strand breaks to the DNA.

In these experiments we used plasmid DNA to evaluate damage induced to biological systems by different chemotoxic substances and radionuclides as well as external radiation. By using plasmids instead of cell cultures we avoid lots of unexplored signal pathways in cells and it is possible to quantify chemotoxic and radiation damage to the DNA.

Materials and methods: The double-stranded plasmid pUC 19 with 2686 bp is used in all experiments. It is a synthetically produced bacterial plasmid without any proteins. To distinguish between directly and indirectly (radical induced) induced damage we used the radical scavenger DMSO. Indirectly induced damage via reactive oxygen species (ROS) can be prevented by DMSO. The quantification of supercoiled forms, single strand breaks (SSB) and double strand breaks (DSB) was measured by the method of agarose gel electrophoresis. After the electrophoresis, agarose gels are dyed in ethidium bromide and imaged with a ccd-camera using ultraviolet transillumination. The bands of the different plasmid forms were quantified through the FIJI computer program.

Results: First of all a correlation between plasmid mass and fluorescence intensity was shown. In a pretrial no damaging effect to the plasmid from incubation temperature, pH-value and radical scavenger DMSO appeared.

Afterwards we examined chemotoxic SnCl_2 , external x-rays, the α emitter ^{223}Ra , the β emitter ^{188}Re , γ - and Auger-emitter ^{99m}Tc and the DNA-bound ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI. The radical scavenger DMSO was used to differentiate between indirect (radical induced) and direct DNA-damage. All different radiation qualities showed an increasing DNA-damage with increasing energy dose. For the low-LET radiation qualities like chemotoxic SnCl_2 , external x-rays, the β emitter ^{188}Re and not DNA-bound ^{99m}Tc , DMSO showed the quality to prevent the damage. After the deposition of an energy dose ≥ 600 Gy DMSO showed a limitation in his scavenger capacity. During radiation with high-LET beams like ^{223}Ra or DNA-bound ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI DMSO showed less or nearly no ability to prevent DNA-damage. A 4 Gy dose of ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI was able to induce DSB into the plasmid. These DSB could not be prevented by DMSO. The lower ESB:DSB ratio for high-LET beams also displays that direct damage is more likely to create DSB than indirect damage.

Conclusion: In conclusion we can say that DNA-bound ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI was most appropriate to induce DSB via a direct effect. It was impossible to prevent this damage due to adding the

radical scavenger DMSO. We attribute this to low range, low-LET Auger-electrons and suppose that it may be possible to use DNA-bound ^{99m}Tc for therapeutic purpose. Further research has to show if ^{99m}Tc can be targeted to the DNA of intact cells and if suitable tracers can be found to safely target and kill tumor cells.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: 1 kbp Plus DNA-Leiter / Marker und Plasmid im Agarosegel (1,4 %)	3
Abb. 2: Strukturformel [^{99m} Tc]Tc(Tricin) ₂ HYNIC-DAPI; M = ^{99m} Tc	8
Abb. 3: Agarose-Gelelektrophorese mit Elektrophorese- und Stromversorgungseinheit	9
Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme verschiedener Plasmidkonformationen (Quelle: Wikimedia, Photograph sec11; Lizenz: Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported)	10
Abb. 5: Fluoreszenzintensität der Plasmid-DNA Konformationen auf einem Agarosegel. Plasmid-DNA wurde mit 10 MBq Re-188 bestrahlt und jeweils 10 µl der DNA-Lösungen auf 18 Spuren aufgetragen. (A) Die Spuren 1-18 zeigen die DNA-Konformationen als open circle (oc) und supercoiled (sc) DNA-Banden nach 1h Exposition und (B) nach 24 h Exposition als oc- und linearisierte (lin) DNA-Banden.	18
Abb. 6: Reproduzierbarkeit der relativen Fluoreszenzintensitäten auf einem Agarosegel (Abb.1). Plasmid-DNA wurde mit 10 MBq Re-188 bestrahlt und jeweils 10 µl der DNA-Lösungen in 18 Gelspuren aufgetragen. (A) Die Spuren 1-18 zeigen die Fluoreszenzintensitäten der DNA-Konformationen nach 1h Exposition open circle (oc) und supercoiled (sc) und (B) DNA-Konformationen nach 24 h Exposition oc- und linearisierte (lin) DNA-Banden. Mittelwerte aus drei Versuchen ± SEM.	19
Abb. 7: Spur 1-11: Agarosegel mit Darstellung der sc-Banden bei ansteigender Plasmidmasse. (5; 10; 15; 20; 25; 50; 75; 100; 125; 150 und 175 ng)	20
Abb. 8: Darstellung der Abhängigkeit der Plasmidmasse von der Fluoreszenzintensität (5; 10; 15; 20; 25; 50; 75; 100; 125; 150 und 175 ng). Mittelwerte aus drei Versuchen ±SEM	21
Abb. 9: Spur 1: Fluoreszenzintensität des Plasmides + 0,2 M DMSO für 1 h (A) und 24 h (B).	21
Abb. 10: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen ± 0,2 M DMSO im Agarosegel nach 1 h (A) und 24 h (B) Inkubationszeit. Mittelwerte aus drei Versuchen ±SEM	22
Abb. 11: Spuren 1-4: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation bei -20°C, +4°C, +20°C, +37°C nach 1 h (A) und 24 h (B) Inkubationszeit.	23
Abb. 12: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation bei -20°C, +4°C, +20°C, +37°C nach 1 h (A) und 24 h (B) Inkubationszeit. Mittelwerte aus drei Versuchen ±SEM	24

Abb. 13: Spuren 1-9: Fluoreszenzintensität der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation bei unterschiedlichen pH-Werten (5,8; 6,0; 6,2; 6,5; 7,0; 7,5; 7,8; 8,1; 8,2) nach 1h (A) und 24h (B) Inkubationszeit.	25
Abb. 14: Darstellung der Fluoreszenzintensität der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation bei unterschiedlichen pH-Werten (5,8; 6,0; 6,2; 6,5; 7,0; 7,5; 7,8; 8,1; 8,2) nach 1h (A) und 24h (B) Inkubationszeit. Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM	26
Abb. 15: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung bei unterschiedlichen pH-Werten. Bahn 1: Kontrolle (pH 7,4) +50 Gy Röntgen; Spuren 2-8: pH (5,8, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 9) + 50 Gy Röntgen Spuren 9-16: pH (5,8, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 9) + 50 Gy Röntgen + 0.2 M DMSO.....	27
Abb. 16: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung bei unterschiedlichen pH-Werten. 50 Gy Röntgen ohne DMSO (A) 50 Gy Röntgen + 0.2 M DMSO (B). Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM	28
Abb. 17: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach 1h Inkubation mit dem Sn-PYP-Kit. Spuren 1-5: Plasmid + PYP (10, 20, 40, 50, 100) μ g/ml SnCl ₂ Spuren 6-10: Plasmid + PYP (10, 20, 40, 50, 100) μ g/ml SnCl ₂ + 0.2 M DMSO.	29
Abb. 18: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach 1h Inkubation mit dem Sn-PYP-Kit \pm DMSO. Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM	29
Abb. 19: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit externer Röntgenstrahlung unterschiedlicher Dosen Spuren 1-6: Plasmid + Röntgendosis (5, 10, 20, 30, 50, 80) Gy ; Spuren 7-12: Plasmid + Röntgendosis (5, 10, 20, 30, 50, 80) Gy + 0.2 M DMSO.....	30
Abb. 20: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit externer Röntgenstrahlung unterschiedlicher Dosen \pm DMSO . Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM.....	31
Abb. 21: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem β -Strahler ¹⁸⁸ Re mit unterschiedlichen Dosen. Spur 1: Plasmid + 0.2 M DMSO ; Spuren 2-8: Plasmid + ¹⁸⁸ Re (7.5, 50, 75, 125, 150, 200) Gy ; Spuren 9-15: Plasmid + ¹⁸⁸ Re (7.5, 50, 75, 125, 150, 200) Gy + 0.2 M DMSO (A) Spuren 1: Plasmid + 0.2 M DMSO ; Spuren 2-8: Plasmid + ¹⁸⁸ Re (120, 600, 1200, 1800, 2400, 3000) Gy ; Spuren 9-15: Plasmid + ¹⁸⁸ Re (120, 600, 1200, 1800, 2400, 3000) Gy + 0.2 M DMSO (B).....	32
Abb. 22: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem β -Strahler ¹⁸⁸ Re mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B). Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM	33

Abb. 23: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem α -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen Spur 1: Plasmid + 0.2 M DMSO; Bahn 2-5: ^{223}Ra Dosis (20, 40, 80, 120) Gy; Spuren 6-9: ^{223}Ra Dosis (20, 40, 80, 120) + 0.2 M DMSO (A) Spur 1: Plasmid + 0.2 M DMSO; Spuren 2-5: ^{223}Ra Dosis (35, 70, 140, 210) Gy; Spuren 6-9: ^{223}Ra Dosis (35, 70, 140, 210) + 0.2 M DMSO (B).....	34
Abb. 24: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem α -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 24 h Inkubationszeit (A) und 48 h Inkubationszeit (B). Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM	35
Abb. 25: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem α -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen Spuren 1-3: ^{223}Ra Dosis (180, 540, 900) Gy; Spuren 4-6: ^{223}Ra Dosis (180, 540, 900) + 0.2 M DMSO (A) Spuren 1-3: ^{223}Ra Dosis (350, 1050, 1750) Gy; Spuren 4-6: ^{223}Ra Dosis (350, 1050, 1750) + 0.2 M DMSO (B)	36
Abb. 26: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem α -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 24 h Inkubationszeit (A) und 48 h Inkubationszeit (B) Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM	37
Abb. 27: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem γ -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen Spuren 1-5: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (0.5, 2.5, 5, 10, 15) Gy; Spuren 6-10: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (0.5, 2.5, 5, 10, 15) Gy + 0.2 M DMSO (A) Spuren 1-5: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (4, 20, 40, 80, 120) Gy; Spuren 6-10: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (4, 20, 40, 80, 120) Gy + 0.2 M DMSO (B)	37
Abb. 28: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem γ -Strahler ^{223}Ra mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B) Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM	38
Abb. 29: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI mit unterschiedlichen Dosen Spuren 1-4: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI (0.5, 5, 10, 15) Gy; Spuren 5-8: Plasmid + HYNIC-DAPI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (0.5, 5, 10, 15) Gy + 0.2 M DMSO (A) Spuren 1-4: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI (4, 40, 80, 120) Gy; Spuren 5-8: Plasmid + $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI (4, 40, 80,120) Gy + 0.2 M DMSO (B).....	39
Abb. 30: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI mit unterschiedlichen Dosen \pm DMSO nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B) Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM.	40
Abb. 31: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DAPI mit unterschiedlichen Konzentrationen Spuren 1-7: Plasmid +	

abgekl. Hynic-DAPI (0.5, 5, 10) Gy Äquivalent (A) Spuren 1-7: Plasmid + ⁹⁹ Tc-HYNIC-DAPI (4, 40, 80) Gy Äquivalent (B).	42
Abb. 32: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation mit ⁹⁹ Tc-HYNIC-DAPI mit unterschiedlichen Konzentrationen ±DMSO nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B). Mittelwerte aus drei Versuchen ±SEM	43
Abb. 33: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation mit HYNIC-DAPI in unterschiedlichen Konzentrationen Spuren 1-6: Plasmid + unmarkiertes HYNIC-DAPI (2,5 ;0,25; 0,125; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01) µg/20µl für 1 h (A) und 24 h (B).....	44
Abb. 34: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Inkubation mit HYNIC-DAPI in unterschiedlichen Konzentrationen nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B).....	45
Abb. 35: Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem Referenz-Kit mit unterschiedlichen Dosen Spuren 1-4: Plasmid + Referenzkit (0.5, 5, 10,15) Gy; Spuren 5-8: Plasmid + Referenzkit (0.5, 5, 10,15) Gy + 0.2 M DMSO (A) Spuren 1-4: Plasmid + Referenzkit (4, 40, 80,120) Gy; Spuren 5-8: Plasmid + Referenzkit (4, 40, 80,120) Gy + 0.2 M DMSO (B)	46
Abb. 36: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Plasmid-DNA Konformationen im Agarosegel nach Bestrahlung mit dem Referenz-Kit mit unterschiedlichen Dosen ±DMSO nach 1 h Inkubationszeit (A) und 24 h Inkubationszeit (B) Mittelwerte aus drei Versuchen ±SEM....	47
Abb. 37: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der Supercoiled-Fraktion im Agarosegel nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten –DMSO (A) und +DMSO (B). Mittelwerte aus drei Versuchen	62

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Emissionsspektrum von ^{99m} Tc. Dargestellt sind Emissionen mit einer Häufigkeit von > 1 %. Die Aufteilung der Rubriken erfolgte nach Howell, 1992.....	6
Tabelle 2: Aktivitäts-Zeit-Dosis Beziehung von ¹⁸⁸ Re, ^{99m} Tc, ²²³ Ra im verwendeten Inlubationsvolumen	14
Tabelle 3: Messung der an das Plasmid gebundenen Aktivität (1h).....	16

Tabelle 4: ^{99m}Tc /Plasmid Verhältnisse	17
Tabelle 5: Intra- und Inter-Assay-VK.....	20
Tabelle 6 p-Werte DMSO Einfluss	22
Tabelle 7: p-Werte Inkubationstemperatur.....	23
Tabelle 8 p-Werte Plasmidintegrität pH-Wert.....	26
Tabelle 9: p-Werte ohne DMSO (pH 7; pH 7,4) und mit DMSO (pH 5,8 und pH 7,5)	28
Tabelle 10 p-Werte PYP im Vergleich zur Kontrolle.....	30
Tabelle 11 p-Werte Röntgen im Vergleich zur Kontrolle	31
Tabelle 12: p-Werte ^{188}Re	33
Tabelle 13: p-Werte ^{223}Ra	35
Tabelle 14: p-Werte ^{99m}Tc im Vergleich zur Kontrolle	38
Tabelle 15: p-Werte ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI im Vergleich zur Kontrolle.....	41
Tabelle 16: p-Werte ^{99m}Tc -Pertechnetat im Vergleich mit ^{99m}Tc -HYNIC-DAPI.....	41
Tabelle 17: p-Werte ^{99}Tc -HYNIC-DAPI im Vergleich zur Kontrolle.....	43
Tabelle 18:p-Werte: HYNIC-DAPI im Vergleich zur Kontrolle	45
Tabelle 19: p-Werte Referenzkit.....	47
Tabelle 20: Vergleich bei einer Energiedosis von 80 Gy.....	63
Tabelle 21: Daten zu Abb. 6 (1h).....	77
Tabelle 22: Daten zu Abb. 6	78
Tabelle 23: Daten zu Abb. 8	79
Tabelle 24: Daten zu Abb. 10	80
Tabelle 25: Daten zu Abb. 10	80
Tabelle 26: Daten zu Abb. 12	80
Tabelle 27: Daten zu Abb. 12	81
Tabelle 28: Daten zu Abb. 14	81
Tabelle 29: Daten zu Abb. 14	82
Tabelle 30: Daten zu Abb. 16	83
Tabelle 31 zu Abb. 18	84
Tabelle 32: Daten zu Abb. 20	85
Tabelle 33: Daten zu Abb. Abb. 22.....	86
Tabelle 34: ESB:DSB Verhältnis ^{188}Re (1 h).....	87
Tabelle 35: Daten zu Abb. 22	88
Tabelle 36: ESB:DSB Verhältnis ^{188}Re (24 h).....	89
Tabelle 37: Daten zu Abb. 24	90
Tabelle 38 ESB:DSB Verhältnis ^{223}Ra (24 h).....	91
Tabelle 39: Daten zu Abb. 24	91
Tabelle 40 ESB:DSB Verhältnis ^{223}Ra (48 h).....	92

Tabelle 41: Daten zu Abb. 26	92
Tabelle 42: ESB:DSB Verhältnis ^{223}Ra (24 h)	93
Tabelle 43: Daten zu Abb. 26	93
Tabelle 44: ESB:DSB Verhältnis ^{223}Ra (48 h)	94
Tabelle 45: Daten zu Abb. 28	95
Tabelle 46: Daten zu Abb. 28	95
Tabelle 47: ESB:DSB Verhältnis $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (24 h)	96
Tabelle 48: Daten zu Abb. 30	97
Tabelle 49: ESB:DSB Verhältnis HYNIC-DAPI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (1h)	98
Tabelle 50: Daten zu Abb. 30	98
Tabelle 51: ESB:DSB Verhältnis HYNIC-DAPI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (24h)	99
Tabelle 52: Daten zu Abb. 32	100
Tabelle 53: Daten zu Abb. 32	100
Tabelle 54: Daten für Abb. 34	101
Tabelle 55: Daten für Abb. 34	102
Tabelle 56: Daten zu Abb. 36	102

7.3 Chemikalienliste

1 kbp Plus DNA-Leiter	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Gel Ladepuffer 10X BlueJuice™	Invitrogen-Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Phosphatpuffer	Selbsthergestellt
Plasmid pUC 19	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland Arbeitsgruppe Prof. Jessberger, Institut Physiologische Chemie TU Dresden, Deutschland
PYP	Mallickrodt Medical BV, Petten, Niederlande
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-EDTA-Puffer	Selbsthergestellt

7.4 Geräte und sonstige Materialien

Diana III Digital Imaging System	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Technetium Generator ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$)	Tyco Healthcare GmbH/Covidien 93333, Neustadt/Donau, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Aktivimeter	RPM 2005, MED Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Deutschland

7.5 Tabellen mit Daten zu den Abbildungen

7.5.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Tabelle 21: Daten zu Abb. 6 (1h)

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	37,3	3,1	39,13	3,2
Linear in %	2,3	0,0	2,61	0,1
OC in %	60,1	3,3	59,52	2,2

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	36,8	2,6	38,85	2,7
Linear in %	2,8	0,4	2,48	0,0
OC in %	59,9	3,4	59,64	1,3

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	37,9	2,5	38,46	2,6
Linear in %	2,6	0,4	2,31	0,2
OC in %	59,5	2,3	59,23	2,5

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	40,1	2,8	37,82	2,3
Linear in %	2,4	0,2	2,38	0,3
OC in %	57,5	2,6	59,79	2,1

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	37,9	1,1	39,35	1,3
Linear in %	2,2	0,2	2,28	0,2
OC in %	59,9	1,0	58,37	1,2

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	39,9	2,1	39,45	2,1
Linear in %	2,4	0,5	2,37	0,4
OC in %	57,6	1,6	58,18	1,8

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
--------	---------------	--------------	---------------	--------------

SC in %	39,3	2,5	39,35	1,7
Linear in %	2,5	0,2	2,01	0,1
OC in %	58,2	2,3	58,64	1,5

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	36,7	1,6	37,47	0,3
Linear in %	2,1	0,2	2,23	0,3
OC in %	61,3	1,4	60,31	0,3

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	37,8	0,3	38,05	0,5
Linear in %	1,9	0,2	2,23	0,1
OC in %	60,3	0,3	59,72	0,6

Tabelle 22: Daten zu Abb. 6

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	0,0	0,00	0,0	0,00
Linear in %	48,4	3,34	50,3	6,89
OC in %	51,8	3,42	50,7	7,22

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	0,0	0,00	0,0	0,00
Linear in %	48,6	8,08	47,5	7,07
OC in %	50,4	7,65	50,5	6,14

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	0,0	0,00	0,0	0,00
Linear in %	50,6	5,28	49,1	6,06
OC in %	49,4	5,28	50,9	6,06

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	0,0	0,00	0,0	0,00
Linear in %	48,1	6,12	47,9	6,23

OC in %	51,9	6,12	52,1	6,23
---------	------	------	------	------

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	0,0	0,00	0,0	0,00
Linear in %	47,1	5,64	45,0	7,88
OC in %	52,9	5,64	55,0	7,88

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	0,0	0,0	0,0	0,00
Linear in %	45,5	5,36	47,4	7,28
OC in %	53,5	4,96	52,6	7,28

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	0,0	0,00	0,0	0,00
Linear in %	48,7	5,90	48,6	6,96
OC in %	51,3	5,90	51,4	6,96

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	0,0	0,00	0,0	0,00
Linear in %	46,2	5,59	47,8	7,41
OC in %	53,8	5,59	52,2	7,41

pUC 19	10 MBq Re-188	+/- SEM in %	10 MBq Re-188	+/- SEM in %
SC in %	0,0	0,00	0,0	0,00
Linear in %	48,1	6,73	46,8	7,09
OC in %	51,9	6,73	53,2	7,09

7.5.2 Untersuchung der Intensitätsänderung der Banden bei unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen

Tabelle 23: Daten zu Abb. 8

Form	5 ng	10 ng	15 ng	20 ng	25 ng	50 ng	75 ng
------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

SC	363.799	708.456	945.638	1.159.491	1.567.194	2.212.776	2.671.783
+/- SEM	+/- 4121	+/- 125707	+/- 131475	+/- 153207	+/- 323837	+/- 253388	+/- 145755

Form	100 ng	125 ng	150 ng	175 ng	200 ng	225 ng	250 ng
SC	3.252.026	3.574.326	4.109.390	4.669.804	3.653.437	3.992.194	4.909.047
+/- SEM	+/- 419641	+/- 46918	+/- 324382	+/- 211924	+/- 340075	+/- 67640	+/- 872510

7.5.3 Einfluss von DMSO auf die Plasmid-DNA

Tabelle 24: Daten zu Abb. 10

Form	Plasmid	+/- SEM in %	Plasmid + 0,2 M DMSO	+/- SEM in %
SC in %	97,1	0,06	97,1	0,34
Linear in %	0,0	0	0,0	0
OC in %	2,9	0,06	2,9	0,34

Tabelle 25: Daten zu Abb. 10

Form	Plasmid	+/- SEM in %	Plasmid + 0,2 M DMSO	+/- SEM in %
SC in %	96,1	0,8	94,7	1,4
Linear in %	0,0	0	0,0	0
OC in %	3,9	0,8	5,3	1,3

7.5.4 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Plasmidintegrität

Tabelle 26: Daten zu Abb. 12

Form	Plasmid -20°C	+/- SEM in %	Plasmid +4°C	+/- SEM in %
------	---------------	--------------	--------------	--------------

SC in %	91,1	3,6	90,6	3,7
Linear in %	0,0	0	0,0	0
OC in %	8,9	3,6	9,4	3,7

Form	Plasmid +20°C	+/- SEM in %	Plasmid +37°C	+/- SEM in %
SC in %	90,6	3,8	90,4	3,5
Linear in %	0,0	0	0,0	0
OC in %	9,4	3,8	9,6	3,5

Tabelle 27: Daten zu Abb. 12

Form	Temp. -20°C	+/- SEM in %	Temp. +4°C	+/- SEM in %
SC in %	91,8	3,3	91,9	4,0
Linear in %	0,0	0	0,0	0
OC in %	8,2	3,3	8,1	4,0

Form	Temp. +20°C	+/- SEM in %	Temp. +37°C	+/- SEM in %
SC in %	91,0	3,9	88,2	3,6
Linear in %	0,0	0	0,0	0
OC in %	9,0	3,9	11,8	3,6

7.5.5 Einfluss des pH-Wertes auf die Plasmidintegrität

Tabelle 28: Daten zu Abb. 14

Form	Plasmid pH 7,4	+/- SEM in %	Plasmid pH 5,8	+/- SEM in %
SC in %	97,8	0,3	97,0	0,9
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	2,2	0,3	3,0	0,9

Form	Plasmid pH 6	+/- SEM in %	Plasmid pH 6,2	+/- SEM in %
SC in %	96,6	0,8	97,5	0,4
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	3,4	0,8	2,5	0,4

Form	Plasmid pH 6,5	+/- SEM in %	Plasmid pH 7	+/- SEM in %
SC in %	95,5	1,6	98,0	0,3
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	4,5	1,6	2,0	0,3

Form	Plasmid pH 7,5	+/- SEM in %	Plasmid pH 7,8	+/- SEM in %
SC in %	97,3	0,0	97,6	0,0
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	2,7	0,0	2,4	0,0

Form	Plasmid pH 8,1	+/- SEM in %	Plasmid pH 8,2	+/- SEM in %
SC in %	98,1	0,2	98,0	0,2
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	1,9	0,2	2,0	0,2

Tabelle 29: Daten zu Abb. 14

Form	Plasmid pH 7,4	+/- SEM in %	Plasmid pH 5,8	+/- SEM in %
SC in %	97,1	0,1	97,2	0,2
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	2,9	0,1	2,8	0,2

Form	Plasmid pH 6	+/- SEM in %	Plasmid pH 6,2	+/- SEM in %
SC in %	97,8	0,3	96,4	1,1
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	2,2	0,3	3,6	1,1

Form	Plasmid pH 6,5	+/- SEM in %	Plasmid pH 7	+/- SEM in %
SC in %	94,8	3,0	97,3	0,2
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	5,2	3,0	2,7	0,2

Form	Plasmid pH 7,5	+/- SEM in %	Plasmid pH 7,8	+/- SEM in %
SC in %	97,6	0,1	97,9	0,2

Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	2,4	0,1	2,1	0,2

Form	Plasmid pH 8,1	+/- SEM in %	Plasmid pH 8,2	+/- SEM in %
SC in %	98,2	0,1	98,2	0,1
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	1,8	0,1	1,8	0,1

7.5.6 Bestrahlung der Plasmid-DNA bei unterschiedlichen pH-Werten

Tabelle 30: Daten zu Abb. 16

Form	Plasmid + 50 Gy	SEM in %	pH 5,8 + 50 Gy	SEM in %
SC in %	51,9	4,7	42,3	5,8
Linear in %	1,6	0,2	2,5	0,5
OC in %	46,5	4,9	55,1	5,4

Form	pH 6 + 50 Gy	SEM in %	pH 6,5 + 50 Gy	SEM in %
SC in %	41,6	5,1	43,5	5,0
Linear in %	2,7	0,6	1,9	0,3
OC in %	55,7	4,7	54,6	4,8

Form	pH 7 + 50 Gy	SEM in %	pH 7,5 + 50 Gy	SEM in %
SC in %	41,2	3,9	46,4	3,1
Linear in %	2,2	0,1	1,7	0,4
OC in %	56,6	4,0	51,9	3,4

Form	pH 8 + 50 Gy	SEM in %	pH 9 + 50 Gy	SEM in %
SC in %	45,9	2,5	43,6	4,6
Linear in %	1,7	0,3	1,6	0,1
OC in %	52,4	2,6	54,7	4,6

Form	Plasmid + 50 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	pH 5,8 + 50 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	92,7	0,9	91,5	0,9
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0

OC in %	7,3	0,9	8,5	0,9
---------	-----	-----	-----	-----

Form	pH 6 + 50 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	pH 6,5 + 50 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	92,3	1,0	92,6	0,8
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	7,7	1,0	7,4	0,8

Form	pH 7 + 50 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	pH 7,5 + 50 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	92,2	1,1	93,6	0,7
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	7,8	1,1	6,4	0,7

Form	pH 8 + 50 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	pH 9 + 50 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	92,6	0,9	91,9	1,2
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	7,4	0,9	8,1	1,2

7.5.7 Schädigung der Plasmid-DNA durch SnCl₂ im TechneScan PYP-Kit

Tabelle 31 zu Abb. 18

Form	Plasmid	SEM in %	10 µg/ml SnCl ₂	SEM in %
SC in %	99,7	0,3	90,3	1,2
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	0,3	0,3	9,7	1,2

Form	20 µg/ml SnCl ₂	SEM in %	40 µg/ml SnCl ₂	SEM in %
SC in %	81,1	3,1	64,8	3,0
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	18,9	3,1	35,2	3,0

Form	50 µg/ml SnCl ₂	SEM in %	100 µg/ml SnCl ₂	SEM in %
SC in %	55,7	5,4	22,6	0,2
Linear in %	0,0	0,0	0,6	0,5
OC in %	44,3	5,4	76,8	0,3

Form	10 µg/ml SnCl ₂ + 0,2 M DMSO	SEM in %	20 µg/ml SnCl ₂ + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	100,0	0,0	100,0	0,0
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	0,0	0,0	0,0	0,0

Form	40 µg/ml SnCl ₂ + 0,2 M DMSO	SEM in %	50 µg/ml SnCl ₂ + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	100,0	0,0	100,0	0,0
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	0,0	0,0	0,0	0,0

Form	100 µg/ml SnCl ₂ + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	97,6	1,2
Linear in %	0,0	0,0
OC in %	2,4	1,2

7.5.8 Bestrahlung des Plasmides mit Röntgenstrahlung

Tabelle 32: Daten zu Abb. 20

Form	Plasmid	SEM in %	5 Gy	SEM in %
SC in %	100,0	0,0	94,8	0,3
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	0,0	0,0	5,2	0,3

Form	10 Gy	SEM in %	20 Gy	SEM in %
SC in %	92,2	1,8	82,6	1,2
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0

OC in %	7,8	1,8	17,4	1,2
---------	-----	-----	------	-----

Form	30 Gy	SEM in %	50 Gy	SEM in %
SC in %	74,6	0,7	58,4	1,5
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	25,4	0,7	41,6	1,5

Form	80 Gy	SEM in %
SC in %	39,8	1,1
Linear in %	0,0	0,0
OC in %	60,2	1,1

Form	5 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	10 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	100,0	0,0	99,6	0,4
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	0,0	0,0	0,4	0,4

Form	20 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	30 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	99,5	0,5	99,3	0,7
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	0,5	0,5	0,7	0,7

Form	50 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	80 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	98,6	0,7	97,4	2,1
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	1,4	0,7	2,6	2,1

7.5.9 Bestrahlung mit dem β -Strahler Rhenium-188 (^{188}Re)

Tabelle 33: Daten zu Abb. Abb. 22

Form	Plasmid	SEM in %	10 Gy	SEM in %
SC in %	97,1	0,1	77,6	2,0
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0

OC in %	2,9	0,1	22,4	2,0
---------	-----	-----	------	-----

Form	50 Gy	SEM in %	75 Gy	SEM in %
SC in %	49,2	0,3	30,2	3,2
Linear in %	1,3	0,3	3,8	0,7
OC in %	49,5	0,5	66,0	2,4

Form	125 Gy	SEM in %	150 Gy	SEM in %
SC in %	14,9	5,3	9,3	2,6
Linear in %	5,7	1,2	7,4	2,0
OC in %	79,4	4,1	83,3	0,6

Form	200 Gy	SEM in %
SC in %	5,2	3,0
Linear in %	8,3	2,7
OC in %	86,5	0,2

Form	10 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	50 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	95,8	0,7	93,0	1,3
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	4,2	0,7	7,0	1,3

Form	75 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	125 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	90,4	0,9	88,6	0,6
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	9,6	0,9	11,4	0,6

Form	150 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	200 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	87,2	1,0	84,3	0,2
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	12,8	1,0	15,7	0,2

Tabelle 34: ESB:DSB Verhältnis ¹⁸⁸Re (1 h)

Verhältnis	Plasmid	SEM	10 Gy	SEM
------------	---------	-----	-------	-----

ESB :	-	-	-	-
DSB				

Verhältnis	50 Gy	SEM	75 Gy	SEM
ESB :	38,2	7,5	17,9	2,8
DSB	1		1	

Verhältnis	125 Gy	SEM	150 Gy	SEM
ESB :	14,3	2,2	12,1	3,25
DSB	1		1	

Verhältnis	200 Gy	SEM
ESB :	11,6	3,8
DSB	1	

Tabelle 35: Daten zu Abb. 22

Form	Plasmid	SEM in %	120 Gy Re-188	SEM in %
SC in %	94,6	2,3	46,5	6,8
Linear in %	0,0	0,0	1,8	0,2
OC in %	5,4	2,3	51,7	6,6

Form	600 Gy Re-188	SEM in %	1200 Gy Re-188	SEM in %
SC in %	8,2	7,4	0,3	0,3
Linear in %	15,2	4,3	36,4	4,0
OC in %	76,5	3,1	63,2	4,3

Form	1800 Gy Re-188	SEM in %	2400 Gy Re-188	SEM in %
SC in %	1,4	1,4	0,0	0,0
Linear in %	36,8	8,1	40,2	9,3
OC in %	61,8	7,6	59,8	9,3

Form	3000 Gy Re-188	SEM in %
SC in %	0,0	0,0
Linear in %	9,4	9,4
OC in %	23,9	23,9

Form	120 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM in %	600 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM in %
------	----------------------------	----------	----------------------------	----------

SC in %	91,2	2,4	80,8	4,2
Linear in %	0,0	0,0	0,3	0,2
OC in %	8,8	2,4	18,8	4,0

Form	1200 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM in %	1800 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	68,7	4,1	60,0	5,1
Linear in %	1,1	0,3	1,6	0,2
OC in %	30,2	4,0	38,5	4,8

Form	2400 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM in %	3000 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	51,6	6,7	49,4	6,3
Linear in %	1,9	0,2	2,4	0,6
OC in %	46,5	6,6	48,2	5,8

Tabelle 36: ESB:DSB Verhältnis ¹⁸⁸Re (24 h)

Verhältnis	Plasmid	SEM	120 Gy Re-188	SEM
ESB :	-	-	28,9	1,2
DSB			1,0	

Verhältnis	600 Gy Re-188	SEM	1200 Gy Re-188	SEM
ESB :	6,2	2,2	1,8	0,3
DSB	1,0		1,0	

Verhältnis	1800 Gy Re-188	SEM	2400 Gy Re-188	SEM
ESB :	1,9	0,5	1,7	0,5
DSB	1,0		1,0	

Verhältnis	3000 Gy Re-188	SEM
ESB :	-	-
DSB		

Verhältnis	120 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM	600 Gy + 0,2 M DMSO	SEM
ESB :	-	-	-	-
DSB				

Verhältnis	1200 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM	1800 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM
------------	-----------------------------	-----	-----------------------------	-----

ESB :	30,2	8,3	25,0	1,9
DSB	1,0		1,0	

Verhältnis	2400 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM	3000 Gy Re-188 + 0,2 M DMSO	SEM
	ESB :	24,6	3,0	21,4
DSB	1,0		1,0	

7.5.10 Bestrahlung mit dem α -Strahler Radium-223 (^{223}Ra)

Tabelle 37: Daten zu Abb. 24

Form	Plasmid	SEM in %	20 Gy Ra-223	SEM in %
SC in %	93,4	1,3	57,6	5,9
Linear in %	0,0	0,0	0,9	0,6
OC in %	6,6	1,3	41,6	5,6

Form	40 Gy Ra-223	SEM in %	80 Gy Ra-223	SEM in %
SC in %	39,2	7,1	15,4	5,7
Linear in %	2,4	0,4	6,9	1,2
OC in %	58,4	6,8	77,8	4,6

Form	120 Gy Ra-223	SEM in %
SC in %	6,0	2,2
Linear in %	9,5	1,2
OC in %	84,5	1,3

Form	20 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %	40 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	93,1	1,3	92,7	1,1
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	6,9	1,3	7,3	1,1

Form	80 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %	120 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	92,4	1,0	91,6	0,5
Linear in %	0,7	0,7	0,0	0,0
OC in %	6,9	0,8	8,4	0,5

Tabelle 38 ESB:DSB Verhältnis ^{223}Ra (24 h)

Verhältnis	Plasmid	SEM	20 Gy Ra-223	SEM
ESB :			41,8	14,5
DSB			1,0	

Verhältnis	40 Gy Ra-223	SEM	80 Gy Ra-223	SEM
ESB :	25,3	2,0	11,9	1,4
DSB	1,0		1,0	

Verhältnis	120 Gy Ra-223	SEM
ESB :	9,3	1,3
DSB	1,0	

Tabelle 39: Daten zu Abb. 24

Form	Plasmid	SEM in %	35 Gy Ra-223	SEM in %
SC in %	93,4	1,6	41,1	8,6
Linear in %	0,0	0,0	3,4	0,9
OC in %	6,6	1,6	55,4	7,7

Form	70 Gy Ra-223	SEM in %	140 Gy Ra-223	SEM in %
SC in %	20,7	8,4	2,2	2,2
Linear in %	7,1	1,4	17,5	2,3
OC in %	72,2	7,1	80,4	0,6

Form	210 Gy Ra-223	SEM in %
SC in %	0,0	0,0
Linear in %	23,2	1,4
OC in %	76,8	1,4

Form	35 Gy Ra-223 + 0,2 M	SEM in %	70 Gy Ra-223 + 0,2 M	SEM in %
------	----------------------	----------	----------------------	----------

	DMSO		DMSO	
SC in %	92,7	1,8	91,1	1,5
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	7,3	1,8	8,9	1,5

Form	140 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %	210 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	89,2	1,7	86,1	2,1
Linear in %	0,4	0,4	1,1	0,6
OC in %	10,4	1,3	12,8	1,9

Tabelle 40 ESB:DSB Verhältnis ²²³Ra (48 h)

Verhältnis	Plasmid	SEM	35 Gy Ra-223	SEM
ESB :			17,1	1,9
DSB			1,0	

Spalte1	70 Gy Ra-223	SEM	140 Gy Ra-223	SEM
ESB :	10,6	1,2	4,8	0,7
DSB	1,0		1,0	

Spalte1	210 Gy Ra-223	SEM
ESB :	3,3	0,2
DSB	1,0	

Tabelle 41: Daten zu Abb. 26

Form	Plasmid	SEM in %	180 Gy Ra-223	SEM in %
SC in %	95,5	0,3	0,3	0,3
Linear in %	0,0	0,0	25,4	5,6
OC in %	4,5	0,3	74,3	5,3

Form	540Gy Ra-223	SEM in %	900 Gy Ra-223	SEM in %
------	--------------	----------	---------------	----------

SC in %	0,0	0,0	0,0	0,0
Linear in %	39,6	4,6	39,7	4,0
OC in %	60,4	4,6	60,3	4,0

Form	180 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %	540 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	87,0	4,5	72,3	8,3
Linear in %	0,9	0,8	3,2	1,3
OC in %	12,0	3,7	24,5	6,9

Form	900 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	64,0	8,4
Linear in %	4,9	1,5
OC in %	31,1	7,0

Tabelle 42: ESB:DSB Verhältnis ²²³Ra (24 h)

Verhältnis	Plasmid	SEM in %	180 Gy Ra-223	SEM
ESB :	-	-	3,2	0,9
DSB			1,0	

Verhältnis	540 Gy Ra-223	SEM in %	900 Gy Ra-223	SEM
ESB :	1,6	0,3	1,6	0,3
DSB	1,0		1,0	

Verhältnis	180 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %	540 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM
ESB :	-		8,5	1,4
DSB			1,0	

Verhältnis	900 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM
ESB :	6,6	0,6
DSB	1,0	

Tabelle 43: Daten zu Abb. 26

Form	Plasmid	SEM in %	350 Gy Ra-223	SEM in %
SC in %	95,9	0,8	0,0	0,0
Linear in %	0,0	0,0	32,9	0,6

OC in %	4,1	0,8	67,1	0,6
---------	-----	-----	------	-----

Form	1050 Gy Ra-223	SEM in %	1750 Gy Ra-223	SEM in %
SC in %	0,0	0,0	0,0	0,0
Linear in %	48,0	2,7	51,1	6,6
OC in %	52,0	2,7	48,9	6,6

Form	350 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %	1050 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	83,3	1,7	66,0	3,9
Linear in %	1,7	0,2	4,8	0,0
OC in %	15,0	1,6	29,2	3,8

Form	1750 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	58,9	5,2
Linear in %	6,6	0,2
OC in %	34,6	5,1

Tabelle 44: ESB:DSB Verhältnis ^{223}Ra (48 h)

Verhältnis	Plasmid	SEM	350 Gy Ra-223	SEM
ESB :			2,0	0,1
DSB			1,0	

Verhältnis	1050 Gy Ra-223	SEM	1750 Gy Ra-223	SEM
ESB :	1,1	0,1	1,0	0,3
DSB	1,0		1,0	

Verhältnis	350 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM	1050 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM
ESB :	9,0	0,0	6,1	0,7
DSB	1,0		1,0	

Verhältnis	1750 Gy Ra-223 + 0,2 M DMSO	SEM
ESB :	5,3	0,6
DSB	1,0	

7.5.11 Bestrahlung mit Tc-99m

Tabelle 45: Daten zu Abb. 28

Form	Plasmid	SEM in %	0,5 Gy	SEM in %
SC in %	93,6	3,5	93,8	3,0
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	6,4	3,5	6,2	3,0

Form	2,5 Gy	SEM in %	5 Gy	SEM in %
SC in %	90,8	2,7	84,6	1,1
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	9,2	2,7	15,4	1,1

Form	10 Gy	SEM in %	15 Gy	SEM in %
SC in %	76,0	1,1	72,3	1,5
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	24,0	1,1	27,7	1,5

Form	0,5 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	95,1	2,9
Linear in %	0,0	0,0
OC in %	4,9	2,9

Form	2,5 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	5 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	95,3	2,6	94,6	2,9
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	4,7	2,6	5,4	2,9

Form	10 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	15 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	94,8	2,6	93,9	2,5
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	5,2	2,6	6,1	2,5

Tabelle 46: Daten zu Abb. 28

Form	Plasmid	SEM in %	4 Gy	SEM in %
------	---------	----------	------	----------

SC in %	94,6	3,2	89,1	2,5
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	5,4	3,2	10,9	2,5

Form	20 Gy	SEM in %	40 Gy	SEM in %
SC in %	77,4	1,8	61,5	6,4
Linear in %	0,0	0,0	1,6	0,6
OC in %	22,6	1,8	36,9	6,0

Form	80 Gy	SEM in %	120 Gy	SEM in %
SC in %	43,7	11,2	34,3	9,6
Linear in %	3,2	1,2	4,7	2,3
OC in %	53,1	10,0	61,0	7,2

Form	4 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	94,6	2,6
Linear in %	0,0	0,0
OC in %	5,4	2,6

Form	20 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	40 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	93,9	2,0	92,8	2,1
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	6,1	2,0	7,2	2,1

Form	80 Gy + 0,2 M DMSO	SEM	120 Gy + 0,2 M DMSO	SEM
SC in %	90,6	2,8	89,1	2,2
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	9,4	2,8	10,9	2,2

Tabelle 47: ESB:DSB Verhältnis ^{99m}Tc (24 h)

Verhältnis	Plasmid	SEM	4 Gy Tc-99m	SEM
ESB :	-	-	-	-
DSB				

Verhältnis	20 Gy Tc-99m	SEM	40 Gy Tc-99m	SEM
ESB :	-	-	33,6	27,7

DSB			1,0	
-----	--	--	-----	--

Verhältnis	80 Gy Tc-99m	SEM	120 Gy Tc-99m	SEM
ESB :	18,8	5,0	17,6	8,3
DSB	1,0		1,0	

7.5.12 Bestrahlung mit der Substanz Tc-99m-HYNIC-DAPI

Tabelle 48: Daten zu Abb. 30

Form	Plasmid	SEM in %	0,5 Gy	SEM in %
SC in %	87,4	0,6	85,2	1,6
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	12,6	0,6	14,8	1,6

Form	5 Gy	SEM in %	10 Gy	SEM in %
SC in %	76,9	3,4	72,7	3,4
Linear in %	2,1	1,0	2,7	1,2
OC in %	21,0	2,4	24,5	2,4

Form	15 Gy	SEM in %
SC in %	75,8	0,0
Linear in %	1,9	0,0
OC in %	22,2	0,0

Form	0,5 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	5 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	86,5	1,4	79,7	2,8
Linear in %	0,1	0,1	1,2	0,8
OC in %	13,4	1,5	19,2	2,2

Form	10 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	15 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	76,4	2,7	76,3	0,0
Linear in %	2,2	0,8	1,9	0,0
OC in %	21,5	2,0	21,9	0,0

Tabelle 49: ESB:DSB Verhältnis HYNIC-DAPI-^{99m}Tc (1h)

Verhältnis	Plasmid	SEM	0,5 Gy H-D-Tc-99m	SEM
ESB :	-	-	-	-
DSB				

Verhältnis	5 Gy H-D-Tc-99m	SEM	10 Gy H-D-Tc-99m	SEM
ESB :	14,0	6,7	12,3	3,9
DSB	1,0	1,0	1,0	1,0

Verhältnis	15 Gy H-D-Tc-99m	SEM
ESB :	-	-
DSB		

Verhältnis	0,5 Gy H-D-Tc-99m + 0,2 M DMSO	SEM	5 Gy H-D-Tc-99m + 0,2 M DMSO	SEM
ESB :	-	-	14,9	6,7
DSB			1,0	1,0

Verhältnis	10 Gy H-D-Tc-99m + 0,2 M DMSO	SEM	15 Gy H-D-Tc-99m + 0,2 M DMSO	SEM
ESB :	12,3	3,4	11,6	-
DSB	1,0	1,0	1,0	

Tabelle 50: Daten zu Abb. 30

Form	Plasmid	SEM in %	4 Gy	SEM in %
SC in %	86,7	1,7	75,3	2,6
Linear in %	0,0	0,0	1,9	0,5
OC in %	13,3	1,7	22,8	2,9

Form	40 Gy	SEM in %	80 Gy	SEM in %
SC in %	51,1	8,5	35,0	5,1
Linear in %	8,5	1,0	11,3	1,7
OC in %	40,4	9,5	53,8	6,7

Form	120 Gy	SEM in %

SC in %	23,6	0,0
Linear in %	8,7	0,0
OC in %	67,6	0,0

Form	4 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	40 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	83,1	1,6	61,5	2,0
Linear in %	1,1	0,8	6,6	1,2
OC in %	15,8	2,3	32,0	2,9

Form	80 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	120 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	52,5	2,3	43,8	0,0
Linear in %	8,0	1,4	6,1	0,0
OC in %	39,4	3,4	50,1	0,0

Tabelle 51: ESB:DSB Verhältnis HYNIC-DAPI-^{99m}Tc (24h)

Verhältnis	Plasmid	SEM	4 Gy H-D-Tc-99m	SEM
ESB :	-	-	14,4	4,2
DSB			1,0	

Verhältnis	40 Gy H-D-Tc-99m	SEM	80 Gy H-D-Tc-99m	SEM
ESB :	5,0	2,1	5,2	1,4
DSB	1,0		1,0	

Verhältnis	120 Gy H-D-Tc-99m	SEM
ESB :	7,8	-
DSB	1,0	

Verhältnis	4 Gy H-D-Tc-99m + 0,2 M DMSO	SEM	40 Gy H-D-Tc-99m + 0,2 M DMSO	SEM
ESB :	12,8	8,4	5,4	1,5
DSB	1,0		1,0	

Verhältnis	80 Gy H-D-Tc-99m + 0,2 M DMSO	SEM	120 Gy H-D-Tc-99m + 0,2 M DMSO	SEM
ESB :	5,4	1,5	8,2	-
DSB	1,0		1,0	

7.5.13 Inkubation mit Tc-99-HYNIC-DAPI

Tabelle 52: Daten zu Abb. 32

Form	Plasmid	SEM in %	0,5 Gy Äquiv.	SEM in %
SC in %	94,0	2,2	93,9	2,4
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	6,0	2,2	6,1	2,4

Form	5 Gy Äquiv.	SEM in %	10 Gy Äquiv.	SEM in %
SC in %	93,9	1,9	94,2	2,3
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	6,1	1,9	5,8	2,3

Form	0,5 Gy + 0,2 M DMSO Äquiv.	SEM in %	5 Gy + 0,2 M DMSO Äquiv.	SEM in %
SC in %	93,4	3,1	93,9	2,3
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	6,6	3,1	6,1	2,3

Form	10 Gy + 0,2 M DMSO Äquiv.	SEM in %
SC in %	94,7	1,9
Linear in %	0,0	0,0
OC in %	5,3	1,9

Tabelle 53: Daten zu Abb. 32

Form	Plasmid	SEM in %	4 Gy Äquiv.	SEM in %
SC in %	93,4	1,9	93,2	2,4
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	6,7	2,0	6,8	2,4

Form	40 Gy Äquiv.	SEM in %	80 Gy Äquiv.	SEM in %
SC in %	91,8	2,0	92,7	2,8
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	8,2	2,0	7,3	2,8

Form	4 Gy + 0,2 M DMSO Äquiv.	SEM in %	40 Gy + 0,2 M DMSO Äquiv.	SEM in %
------	--------------------------	----------	---------------------------	----------

SC in %	93,5	2,3	93,7	2,6
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	6,5	2,3	6,3	2,6

Form	80 Gy + 0,2 M DMSO Äquiv.	SEM in %
SC in %	93,1	2,3
Linear in %	0,0	0,0
OC in %	6,9	2,3

7.5.14 Inkubation mit HYNIC-DAPI Substanz

Tabelle 54: Daten für Abb. 34

Form	Plasmid	SEM in %	HYNIC-DAPI unmark. 0,01 µg	SEM in %
SC in %	96,5	0,6	96,7	0,6
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	3,5	0,6	3,3	0,6

Form	HYNIC-DAPI unmark. 0,025 µg	SEM in %	HYNIC-DAPI unmark. 0,05 µg	SEM in %
SC in %	96,9	0,5	96,8	0,4
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	3,1	0,5	3,2	0,4

Form	HYNIC-DAPI unmark. 0,1 µg	SEM in %	HYNIC-DAPI unmark. 0,125 µg	SEM in %
SC in %	96,6	0,4	95,7	0,4
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	3,4	0,4	4,3	0,4

Form	HYNIC-DAPI unmark. 0,25 µg	SEM in %	HYNIC-DAPI unmark. 2,5 µg	SEM in %
SC in %	95,3	0,6	0,0	-
Linear in %	0,0	0,0	0,0	-

OC in %	4,7	0,6	0,0	-
---------	-----	-----	-----	---

Tabelle 55: Daten für Abb. 34

Form	Plasmid	SEM in %	HYNIC-DAPI unmark. 0,01 µg	SEM in %
SC in %	95,9	0,7	96,2	0,7
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	4,1	0,7	3,8	0,7

Form	HYNIC-DAPI unmark. 0,025 µg	SEM in %	HYNIC-DAPI unmark. 0,05 µg	SEM in %
SC in %	95,9	1,1	96,2	0,5
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	4,1	1,1	3,8	0,5

Form	HYNIC-DAPI unmark. 0,1 µg	SEM in %	HYNIC-DAPI unmark. 0,125 µg	SEM in %
SC in %	95,6	1,5	94,9	1,0
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0
OC in %	4,4	1,5	5,1	1,0

Form	HYNIC-DAPI unmark. 0,25 µg	SEM in %	HYNIC-DAPI unmark. 2,5 µg	SEM in %
SC in %	93,8	0,5	0,0	-
Linear in %	0,0	0,0	0,0	-
OC in %	6,2	0,5	0,0	-

7.5.15 Bestrahlung mit Referenzkit

Tabelle 56: Daten zu Abb. 36

Form	Plasmid	SEM in %	0,5 Gy	SEM in %
SC in %	92,8	5,8	95,8	-
Linear in %	0,0	0,0	0,0	-
OC in %	7,2	5,8	4,2	-

Form	5 Gy	SEM in %	10 Gy	SEM in %
SC in %	87,9	1,2	83,9	1,0
Linear in %	0,0	0,0	0,0	0,0

OC in %	12,1	1,2	16,1	1,0
---------	------	-----	------	-----

Form	15 Gy	SEM in %
SC in %	83,5	-
Linear in %	0,0	-
OC in %	16,5	-

Form	0,5 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	5 Gy +0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	98,4	-	93,7	4,1
Linear in %	0,0	-	0,0	0,0
OC in %	1,6	-	6,3	4,1

Form	10 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	15 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	92,3	4,2	97,7	-
Linear in %	0,0	0,0	0,0	-
OC in %	7,7	4,2	2,3	-

Form	Plasmid	SEM in %	4 Gy	SEM in %
SC in %	92,3	7,7	90,4	0,0
Linear in %	0,0	7,7	0,0	0,0
OC in %	7,7	7,7	9,6	0,0

Form	40 Gy	SEM in %	80 Gy	SEM in %
SC in %	70,8	1,0	66,4	2,6
Linear in %	0,5	1,1	0,9	2,8
OC in %	28,7	1,1	32,6	2,8

Form	120 Gy	SEM in %
SC in %	59,5	0,0
Linear in %	1,4	0,0
OC in %	39,1	0,0

Form	4 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %	40 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	96,7	0,0	88,8	2,0
Linear in %	0,0	0,0	0,0	2,0
OC in %	3,3	0,0	11,2	2,0

Form	80 Gy. + 0,2 M DMSO	SEM in %	120 Gy + 0,2 M DMSO	SEM in %
SC in %	84,1	1,5	82,1	0,0
Linear in %	0,5	1,9	1,3	0,0
OC in %	15,4	1,9	16,6	0,0

8 Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

Technische Universität Dresden
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
Promotionsordnung vom 24. Juli 2011

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Prof. Dr. Jörg Kotzerke, Dr. Roswitha Runge, Prof. Dr. Gerd Wunderlich, Sandra Ferl,
Dr. Robert Freudenberg, Rita Oertel, Dr. Liane Oehme

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgen der Form veröffentlicht:

Teile des Inhaltes wurden auf der 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin 2013 in einer Posterpräsentation vorgestellt.

Ich bestätige, dass es keine erfolglosen Promotionsverfahren gab.

Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.

Dresden, den 06.09.2013

Robert Punzet

9 Erklärung zur Einhaltung gesetzlicher Vorgaben

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation:

das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen.

Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission: nicht zutreffend

die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes

Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung:
nicht zutreffend

die Einhaltung des Gentechnikgesetzes

Projektnummer: nicht zutreffend

die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät
und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden, den 06.09.2013

Robert Punzet

11 Literaturverzeichnis

Adelstein SJ, Kassis AI (1996) Strand breaks in plasmid DNA following positional changes of Auger-electron-emitting radionuclides. *Acta Oncol* 35:797-801

Arruda-Neto JD, Nieto L, Righi H, Cotta MA, Carrer H, Rodrigues TE, Genofre GC (2012) Fragmentation of extracellular DNA by long-term exposure to radiation from uranium in aquatic environments. *J Environ Monit* 14:2108-2113

Assis ML, Caceres MR, De Mattos JC, Caldeira-de-Araujo A, Bernardo-Filho M (1998) Cellular inactivation induced by a radiopharmaceutical kit: role of stannous chloride. *Toxicol Lett* 99:199-205

Baidoo KE, Yong K, Brechbiel MW (2013) Molecular pathways: targeted alpha-particle radiation therapy. *Clin Cancer Res* 19:530-537

Balagurumoorthy P, Adelstein SJ, Kassis AI (2011) Novel method for quantifying radiation-induced single-strand-break yields in plasmid DNA highlights 10-fold discrepancy. *Anal Biochem* 417:242-246

Balagurumoorthy P, Chen K, Bash RC, Adelstein SJ, Kassis AI (2006) Mechanisms underlying production of double-strand breaks in plasmid DNA after decay of ¹²⁵I-Hoechst. *Radiat Res* 166:333-344

Balagurumoorthy P, Wang K, Adelstein SJ, Kassis AI (2008) DNA double-strand breaks induced by decay of (¹²³I)-labeled Hoechst 33342: role of DNA topology. *Int J Radiat Biol* 84:976-983

Balagurumoorthy P, Xu X, Wang K, Adelstein SJ, Kassis AI (2012) Effect of distance between decaying (¹²⁵I) and DNA on Auger-electron induced double-strand break yield. *Int J Radiat Biol* 88:998-1008

Begusova M, Spothem-Maurizot M, Michalik V, Charlier M (2000) Effect of ethidium bromide intercalation on DNA radiosensitivity. *Int J Radiat Biol* 76:1-9

Berger V. 2012. Quantifizierung von DNA-Schäden durch die Auger-Elektronen-Emitter ^{99m}Tc und ¹²³I in PC Cl3-Zellen. Technische Universität, Medizinische Fakultät Dresden, Dissertation.

Bishayee A, Rao DV, Bouchet LG, Bolch WE, Howell RW (2000) Protection by DMSO against cell death caused by intracellularly localized iodine-125, iodine-131 and polonium-210. *Radiat Res* 153:416-427

Bolivar F, Betlach MC, Heyneker HL, Shine J, Rodriguez RL, Boyer HW (1977) Origin of replication of pBR345 plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5265-5269

Brezeanu M, Trager F, Hubenthal F (2009) Scanning force microscopy studies of X-ray-induced double-strand breaks in plasmid DNA. *J Biol Phys* 35:163-174

Cabral RE, Leitao AC, Lage C, Caldeira-de-Araujo A, Bernardo-Filho M, Dantas FJ, Cabral-Neto JB (1998) Mutational potentiality of stannous chloride: an important reducing agent in the Tc-99m-radiopharmaceuticals. *Mutat Res* 408:129-135

Cheetham PJ, Petrylak DP (2012) Alpha particles as radiopharmaceuticals in the treatment of bone metastases: mechanism of action of radium-223 chloride (Alpharadin) and radiation protection. *Oncology (Williston Park)* 26:330-337, 341

Croke J, Leung E, Segal R, Malone S (2012) Clinical benefits of alpharadin in castrate-chemotherapy-resistant prostate cancer: case report and literature review. *BMJ Case Rep* 2012:

Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P (2002) Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull* 25:1600-1603

Dantas FJ, de Mattos JC, Moraes MO, Boasquevisques E, Rodrigues MP, Lage CA, Cabral-Neto JB, Leitao AC, Bernardo-Filho M, Bezerra RJ, Carvalho JJ, Caldeira-de-Araujo A (2002) Dna damage in peripheral blood nuclear cells assessed by comet assay from individuals submitted to scintigraphic examinations. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48:789-791

Dantas FJ, Moraes MO, Carvalho EF, Valsa JO, Bernardo-Filho M, Caldeira-de-Araujo A (1996) Lethality induced by stannous chloride on *Escherichia coli* AB1157: participation of reactive oxygen species. *Food Chem Toxicol* 34:959-962

Dantas FJ, Moraes MO, de Mattos JC, Bezerra RJ, Carvalho EF, Filho MB, Caldeira de Araujo A (1999) Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. *Toxicol Lett* 110:129-136

de Mattos JC, Dantas FJ, Bezerra RJ, Bernardo-Filho M, Cabral-Neto JB, Lage C, Leitao AC, Caldeira-de-Araujo A (2000) Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA. *Toxicol Lett* 116:159-163

De Mattos JC, Dantas FJ, Caldeira-de-Araujo A, Moraes MO (2004) Agarose gel electrophoresis system in the classroom: Detection of DNA strand breaks through the alteration of plasmid topology. *Biochem Mol Biol Educ* 32:254-257

de Mattos JC, Lage C, Dantas FJ, Moraes MO, Nunes AP, Bezerra RJ, Faria MV, Leitao AC, Caldeira-de-Araujo A (2005) Interaction of stannous chloride leads to alteration in DNA, triphosphate nucleotides and isolated bases. *Mol Cell Biochem* 280:173-179

DeSombre ER, Hughes A, Landel CC, Greene G, Hanson R, Schwartz JL (1996) Cellular and subcellular studies of the radiation effects of Auger electron-emitting estrogens. *Acta Oncol* 35:833-840

Doly M, Chassagne J, Demeocq F, Finat-Duclos F, Doly A, Plagne R, Veyre A, Besse G, Gaillard G, Meyniel G (1982) Labeling of human lymphocytes with ^{99m}Tc by means of stannous pyrophosphate. *Scintigraphic applications. Eur J Nucl Med* 7:397-404

Franken NA, Hovingh S, Ten Cate R, Krawczyk P, Stap J, Hoebe R, Aten J, Barendsen GW (2012) Relative biological effectiveness of high linear energy transfer alpha-particles for the induction of DNA-double-strand breaks, chromosome aberrations and reproductive cell death in SW-1573 lung tumour cells. *Oncol Rep* 27:769-774

Goddu SM, Narra VR, Harapanhalli RS, Howell RW, Rao DV (1996) Radioprotection by DMSO against the biological effects of incorporated radionuclides in vivo--Comparison with other radioprotectors and evidence for indirect action of Auger electrons. *Acta Oncol* 35:901-907

Guedes AP, Cardoso VN, De Mattos JC, Dantas FJ, Matos VC, Silva JC, Bezerra RJ, Caldeira-de-Araujo A (2006) Cytotoxic and genotoxic effects induced by stannous chloride associated to nuclear medicine kits. *Nucl Med Biol* 33:915-921

Hafliger P, Agorastos N, Spingler B, Georgiev O, Viola G, Alberto R (2005) Induction of DNA-double-strand breaks by auger electrons from ^{99m}Tc complexes with DNA-binding ligands. *ChemBiochem* 6:414-421

Howell RW (1992) Radiation spectra for Auger-electron emitting radionuclides: report No. 2 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Med Phys* 19:1371-1383

Humm JL, Charlton DE (1989) A new calculational method to assess the therapeutic potential of Auger electron emission. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 17:351-360

Humm JL, Howell RW, Rao DV (1994) Dosimetry of Auger-electron-emitting radionuclides: report no. 3 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Med Phys* 21:1901-1915

Kalfas CA, Sideris EG, Martin PW (1984) Perturbed gamma-gamma angular correlation studies of ^{111}In bound to double and single stranded DNA. *Int J Appl Radiat Isot* 35:889-893

Kassis AI, Harapanhalli RS, Adelstein SJ (1999a) Comparison of strand breaks in plasmid DNA after positional changes of Auger electron-emitting iodine-125. *Radiat Res* 151:167-176

Kassis AI, Harapanhalli RS, Adelstein SJ (1999b) Strand breaks in plasmid DNA after positional changes of Auger electron-emitting iodine-125: direct compared to indirect effects. *Radiat Res* 152:530-538

Kassis AI, Walicka MA, Adelstein SJ (2000) Double-strand break yield following ^{125}I decay--effects of DNA conformation. *Acta Oncol* 39:721-726

Knapp FF, Jr., Beets AL, Gohlke S, Zamora PO, Bender H, Palmedo H, Biersack HJ (1997) Availability of rhenium-188 from the alumina-based tungsten-188/rhenium-188 generator for preparation of rhenium-188-labeled radiopharmaceuticals for cancer treatment. *Anticancer Res* 17:1783-1795

Kotzerke J, Wendisch M, Freudenberg R, Runge R, Oehme L, Meyer GJ, Kunz-Schughart LA, Wunderlich G (2012) Sodium-iodide symporter positive cells after intracellular uptake of $(^{99\text{m}}\text{Tc})$ versus alpha-emitter ^{211}At . Reduction of clonogenic survival and characterization of DNA damage. *Nuklearmedizin* 51:170-178

Lassmann M, Nosske D (2013) Dosimetry of ^{223}Ra -chloride: dose to normal organs and tissues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 40:207-212

Le Pecq JB, Paoletti C (1966) A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem* 17:100-107

Liepe K, Hliscs R, Kropp J, Runge R, Knapp FF, Jr., Franke WG (2003) Dosimetry of ¹⁸⁸Re-hydroxyethylidene diphosphonate in human prostate cancer skeletal metastases. *J Nucl Med* 44:953-960

Lin-Chao S, Chen WT, Wong TT (1992) High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol Microbiol* 6:3385-3393

Lobachevsky PN, Martin RF (2004) Plasmid DNA breakage by decay of DNA-associated auger emitters: experiments with ¹²³I/¹²⁵I-iodoHoechst 33258. *Int J Radiat Biol* 80:915-920

Lobrich 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

McLean JR, Blakey DH, Douglas GR, Bayley J (1989) The Auger electron dosimetry of indium-111 in mammalian cells in vitro. *Radiat Res* 119:205-218

McMahon SJ, Currell FJ (2011) A robust curve-fitting procedure for the analysis of plasmid DNA strand break data from gel electrophoresis. *Radiat Res* 175:797-805

Milligan JR, Aguilera JA, Paglinawan RA, Ward JF, Limoli CL (2001) DNA strand break yields after post-high LET irradiation incubation with endonuclease-III and evidence for hydroxyl radical clustering. *Int J Radiat Biol* 77:155-164

Milligan JR, Ng JY, Wu CC, Aguilera JA, Fahey RC, Ward JF (1995) DNA repair by thiols in air shows two radicals make a double-strand break. *Radiat Res* 143:273-280

Nilsson S, Franzen L, Parker C, Tyrrell C, Blom R, Tennvall J, Lennernas B, Petersson U, Johannessen DC, Sokal M, Pigott K, O'Bryan-Tear CG, Thuresson M, Bolstad B, Bruland OS (2013) Two-Year Survival Follow-Up of the Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Study of Radium-223 Chloride in Patients With Castration-Resistant Prostate Cancer and Bone Metastases. *Clin Genitourin Cancer* 11:20-26

Nilsson S, Strang P, Aksnes AK, Franzen L, Olivier P, Pecking A, Staffurth J, Vasanthan S, Andersson C, Bruland OS (2012) A randomized, dose-response, multicenter phase II study of

radium-223 chloride for the palliation of painful bone metastases in patients with castration-resistant prostate cancer. *Eur J Cancer* 48:678-686

Palmedo H, Gohlke S, Bender H, Sartor J, Schoeneich G, Risse J, Grunwald F, Knapp FF, Jr., Biersack HJ (2000) Dose escalation study with rhenium-188 hydroxyethylidene diphosphonate in prostate cancer patients with osseous metastases. *Eur J Nucl Med* 27:123-130

Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fossa SD, Chodacki A, Wiechno P, Logue J, Seke M, Widmark A, Johannessen DC, Hoskin P, Bottomley D, James ND, Solberg A, Syndikus I, Kliment J, Wedel S, Boehmer S, Dall'Oglio M, Franzen L, Coleman R, Vogelzang NJ, O'Bryan-Tear CG, Staudacher K, Garcia-Vargas J, Shan M, Bruland OS, Sartor O (2013) Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 369:213-223

Pastwa E, Neumann RD, Mezhevaya K, Winters TA (2003) Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks is dependent upon radiation quality and the structural complexity of double-strand breaks. *Radiat Res* 159:251-261

Pinto M, Prise KM, Michael BD (2002) Double strand break rejoining after irradiation of human fibroblasts with X rays or alpha particles: PFGE studies and numerical models. *Radiat Prot Dosimetry* 99:133-136

Pouget JP, Mather SJ (2001) General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur J Nucl Med* 28:541-561

Rezaee M, Sanche L, Hunting DJ (2013) Cisplatin enhances the formation of DNA single- and double-strand breaks by hydrated electrons and hydroxyl radicals. *Radiat Res* 179:323-331

Riquier H, Wera AC, Heuskin AC, Feron O, Lucas S, Michiels C (2013) Comparison of X-ray and alpha particle effects on a human cancer and endothelial cells: survival curves and gene expression profiles. *Radiother Oncol* 106:397-403

Roots R, Holley W, Chatterjee A, Irizarry M, Kraft G (1990) The formation of strand breaks in DNA after high-LET irradiation: a comparison of data from in vitro and cellular systems. *Int J Radiat Biol* 58:55-69

Runge R, Wendisch M, Wunderlich G, Freudenberg R, Kotzerke J (2009) [DNA damage in lymphocytes after irradiation with ²¹¹At and ¹⁸⁸Re]. *Nuklearmedizin* 48:221-226

Sahu SK, Kassis AI, Makrigiorgos GM, Baranowska-Kortylewicz J, Adelstein SJ (1995) The effects of indium-111 decay on pBR322 DNA. *Radiat Res* 141:193-198

Santos-Cuevas CL, Ferro-Flores G, Rojas-Calderon EL, Garcia-Becerra R, Ordaz-Rosado D, Arteaga de Murphy C, Pedraza-Lopez M (2011) ^{99m}Tc-N2S2-Tat (49-57)-bombesin internalized in nuclei of prostate and breast cancer cells: kinetics, dosimetry and effect on cellular proliferation. *Nucl Med Commun* 32:303-313

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682

Sedelnikova OA, Luu AN, Karamychev VN, Panyutin IG, Neumann RD (2001) Development of DNA-based radiopharmaceuticals carrying Auger-electron emitters for antigene radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49:391-396

Smialek MA, Moore SA, Mason NJ, Shuker DE (2009) Quantification of radiation-induced single-strand breaks in plasmid DNA using a TUNEL/ELISA-based assay. *Radiat Res* 172:529-536

Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD (1992) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31:3103-3112

Tavares AA, Tavares JM Evaluating ^{99m}Tc Auger electrons for targeted tumor radiotherapy by computational methods. *Med Phys* 37:3551-3559

Terato H, Tanaka R, Nakaarai Y, Furusawa Y, Ide H (2004) Analysis of DNA damage generated by high-energy particles. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 10.1093/nass/48.1.145145-146

Weinstein MB, Eckelman WC, Richards P, Hauser W, Atkins H (1971) Technetium-labeled red blood cells. *J Nucl Med* 12:577-578

Wunderlich G, Wendisch M, Aurich D, Runge R, Freudenberg R, Kotzerke J (2012) Preincubation with Sn-complexes causes intensive intracellular retention of (^{99m}Tc) in thyroid cells in vitro. *Nuklearmedizin* 51:179-185

Xue LY, Butler NJ, Makrigiorgos GM, Adelstein SJ, Kassis AI (2002) Bystander effect produced by radiolabeled tumor cells in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 99:13765-13770

Yasui L, Hughes A, DeSombre E (2001) Relative biological effectiveness of accumulated ^{125}I U and ^{125}I -estrogen decays in estrogen receptor-expressing MCF-7 human breast cancer cells. Radiat Res 155:328-334

Yasui LS, Chen K, Wang K, Jones TP, Caldwell J, Guse D, Kassis AI (2007) Using Hoechst 33342 to target radioactivity to the cell nucleus. Radiat Res 167:167-175

Zierold S. 2012. Bestimmung von DNA-Schäden durch den Auger-Elektronen-Emitter $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in vitro. Technische Universität, Medizinische Fakultät Dresden, Dissertation.