



Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz
und Reaktorsicherheit

SCHRIFTENREIHE

REAKTORSICHERHEIT UND STRAHLENSCHUTZ

BMU - 2008 - 712

**Untersuchungen der Auger-Emitter abhängigen
biologischen Wirksamkeit zur Ermittlung des Strahlungs-
Wichtungsfaktors für Auger-Elektronen**

Forschungszentrum Jülich GmbH

IMPRESSUM

Dieser Band enthält einen Abschlussbericht über ein vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) gefördertes Vorhaben. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BMU übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Eigentümer behält sich alle Rechte an der weiteren Nutzung oder Vervielfältigung des Berichts vor.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BMU übereinstimmen.

Herausgeber:

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit

Referat RS I 2

Postfach 12 06 29

53048 Bonn

ISSN 1612-6386

Erscheinungsjahr: 2008

Untersuchung der Auger-Emitter abhängigen biologischen Wirksamkeit zur Ermittlung des Strahlungswichtungsfaktors für Auger-Elektronen

Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben StSch 4421

Dezember 2003 - Mai 2006

Forschungszentrum Jülich

Geschäftsbereich Sicherheit und Strahlenschutz

Verantwortlich für den Inhalt:

Experimenteller Teil: Dr. F.H.A. Schneeweiss und Dipl.-Ing. A. Turtoi

Modell-theoretischer Teil: Dr. E. Pomplun und Dr. G. Sutmann (FZJ, ZAM-NIC)

Inhaltsverzeichnis

1	Aufgabenstellung und Zielsetzung	4
2	Stand der Wissenschaft	6
2.1	Experimentelle Befunde	6
2.2	Computer-gestützte Modellierung	7
3	Experimentelle Untersuchungen	8
3.1	Einleitung	8
3.2	Material und Methoden	9
3.2.1	Herstellung und Inkorporation von $^{123}\text{IUdR}$ und $^{125}\text{IUdR}$	10
3.2.2	Experimentelle Methoden zur Untersuchungen verschiedener biologischer Endpunkte	11
3.2.2.1	Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Analyse von Apoptose und Nekrose	11
3.2.2.2	Bestimmung der Gesamt- und Einzel-Caspasenaktivität	11
3.2.2.3	TUNEL-Assay	12
3.2.2.4	COMET-Assay	12
3.2.2.5	Mikronuklei-Assay	13
3.2.2.6	Zellzyklusverteilung	13
3.3	Ergebnisse und Diskussion	14
3.3.1	Apoptose und Nekrose	14
3.3.2	Gesamt- und Einzel-Caspasenaktivität	14
3.3.3	DNA-Schäden	18
3.3.4	COMET-Assay	18
3.3.5	Mikronuklei-Assay	20
3.3.6	Zellzyklusverteilung	21
3.4	Schlussfolgerung	23
4	Modell-theoretische Untersuchungen	25
4.1	Einleitung	25
4.2	Methode	26
4.3	Ergebnisse und Diskussion	27
4.4	Schlussfolgerung	29
5	Zusammenfassung	31
6	Summary	32
7	Literatur	33

1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die große radiotoxische Effektivität von Auger-Elektronen emittierenden Radionukliden beruht im Wesentlichen darauf, dass beim Zerfall nicht nur - wie bei reinen Beta-Strahlern - ein einziges Elektron, sondern eine Vielzahl sehr niederenergetischer Elektronen das Nuklid verlässt. In unmittelbarer Nähe des Zerfallsortes wirken diese Elektronen wie eine Hoch-LET-Strahlung. Obwohl mittlerweile einige dieser Nuklide auch in der diagnostischen Nuklearmedizin eingesetzt werden, gibt es für sie gegenwärtig keine allgemein akzeptierten Strahlungswichtungsfaktoren. Basierend auf den Erfahrungen aus den vorangegangenen Untersuchungen mit ^{125}I [BMU05], sollen jetzt weitere Auger-Elektronen-Emitter eingesetzt werden, um die Konsequenzen ihrer Inkorporation bzw. ihres Zerfalls in Form von DNA-Schäden mit modernen experimentellen Assays (z.B. COMET, TUNEL) zu studieren sowie Veränderungen auf zellulärer Ebene zu untersuchen.

In bisherigen Studien zur Radiotoxizität von Auger-Elektronen emittierenden Radionukliden wurde stets ein einziges Isotop im Vergleich mit Niedrig-LET-Strahlung betrachtet. In diesem Vorhaben sollen erstmals verschiedene Isotope, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Elektronen-Emissionsspektren auch Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit erwarten lassen, in derselben Experimentreihe unter denselben Laborbedingungen untersucht werden. Idealerweise bieten sich hierzu die beiden Isotope ^{123}I und ^{125}I an, die wohl prominentesten Vertreter der Auger-Elektronen-Emitter. Da beide Nuklide chemisch gleich sind, können bei einem Vergleich mögliche Transmutations-Effekte ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus sind die kinetischen Energien der emittierten Auger-Elektronen dieser beiden Nuklide gleich, da auch die an den

Auger-Übergängen beteiligten Elektronen-Energie-Niveaus die gleichen sind. Somit sollten Unterschiede in der biologischen Wirkung lediglich auf die unterschiedliche Anzahl der im Mittel emittierten Elektronen und damit auf die Dosis bzw. auf die Dosisrate infolge der stark unterschiedlichen Halbwertszeiten (^{123}I : 13,2 h; ^{125}I : 60,1 d) zurückzuführen sein. Beide Nuklide lassen sich chemisch auf Grund ähnlicher Größe wie die Methylgruppe des Thymins relativ einfach in ein Thymidinmolekül einbauen, um so als Ioddesoxyuridin (IUdR) anstelle des Thymins in die DNA inkorporiert zu werden (s. Abbn. 1 und 2).

Radionuklide, die über Elektronen-Einfang zerfallen, emittieren ein komplexes Spektrum von Auger-, Coster-Kronig- und Konversions-Elektronen sowie Gamma- und Röntgenstrahlen. Während die Elektronen Energien im Bereich weniger Kiloelektronenvolt besitzen und somit eine äußerst kurze Reichweite im biologischen Gewebe (Absorption innerhalb einer bzw. sehr weniger Zellen) aufweisen, sorgen die Photonen für ein *Crossfire* in den umliegenden Zellen. Diese besondere Energie-Emissions-Charakteristik lässt einen direkten Vergleich mit reiner Photonenstrahlung, wie sie zur Bestimmung von Strahlungswichtungsfaktoren erforderlich ist, nicht zu.

Strahlenbiologisch besonders interessant sind Auger-Elektronen emittierende Nuklide u.a. deshalb, weil sie mittels verschiedener Träger-Moleküle gezielt in unterschiedliche Zellkompartimente eingeschleust werden können. Eingebaut in die DNA zeigen sie Hoch-LET-ähnliche biologische Wirkungen. Dabei kann auch ein nicht-strahlungsbedingter Schadensmechanismus, z.B. eine sogenannte Coulomb-Explosion, nicht ausgeschlossen werden. Ein solcher Mechanismus ist bereits seit den ersten experimentellen strahlenbiologischen Untersuchungen mit Auger-Elektronen-Emittern immer wieder diskutiert worden. Grundlage hierfür waren Verteilungen von Molekül-Fragmenten,

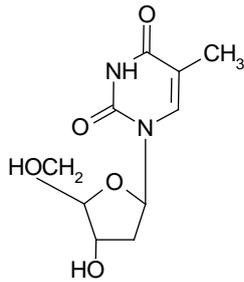


Abbildung 1: Thymin

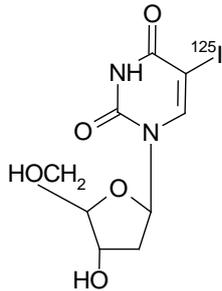


Abbildung 2: ^{125}I UdR

wie sie nach Photonen-Bestrahlung kleiner Iod-markierter Moleküle gefunden worden waren.

Die Identität der kinetischen Auger-Elektronen-Energien sollte es ermöglichen, die biologische Wirkung in Abhängigkeit von der Anzahl der jeweiligen Zerfälle zu vergleichen und somit eine relative Wirksamkeit zwischen den beiden Nukliden ^{123}I und ^{125}I zu bestimmen. Das Problem der Dosisbestimmung könnte auf diese Weise zunächst umgangen werden.

Experimentelle Schwerpunkte sollen hier die Analyse von apoptotischen und nekrotischen Schadensverläufen, die Caspaseaktivitäten, DNA-Strangbrüche sowie Mikronuklei-Bildung nach Applikation und Zerfall der beiden Iodisotope sein.

Im Mittelpunkt der modell-theoretischen Arbeiten stehen Untersuchungen zur Coulomb-Explosion innerhalb des Thymin-Moleküls mit semi-empirischen quantenmechanischen Methoden.

2 Stand der Wissenschaft

Mit Auger-Elektronen emittierenden Nukliden und ihrer Bedeutung für die Biologie befassen sich seit mehr als 30 Jahren sowohl Physiker als auch Radiobiologen. Auf eine ausführliche Darstellung zum gegenwärtigen Erkenntnisstand über alle Facetten des Gebietes der Auger-Elektronen-Emitter wird hier verzichtet. Stattdessen soll im folgenden auf bisherige, in der Literatur beschriebene Vergleiche zwischen ^{123}I und ^{125}I eingegangen werden. Dies schließt sowohl die physikalischen Aspekte, wie z.B. die Emissionsspektren, wie auch die relativ wenigen direkten strahlenbiologischen experimentellen Untersuchungen ein. Umfassende allgemeine und neuere Arbeiten über das ganze Spektrum der Auger-Elektronen-Emitter in der Strahlenbiologie und der experimentellen Tumorbiologie liefern gleichsam als Überblick die Tagungsbände der letzten Auger-Symposien [RRQ77, Bav88, How92b, Act96, Act00, IJR04]. Darüber hinaus sei an dieser Stelle auf das entsprechende Kapitel im vorangegangenen Projekt verwiesen [BMU05].

Beide genannten Iodisotope finden ein zunehmendes Interesse in der Strahlenbiologie. Für einen möglichen Einsatz in der Tumorthherapie werden beide Nuklide gleichermaßen in Erwägung gezogen. Unter Strahlenschutz-Aspekten ist insbesondere auf ^{123}I zu achten, das bereits in der diagnostischen Nuklearmedizin u.a. wegen seiner relativ geringen Halbwertszeit sowie seiner gut detektierbaren Gammalinie eingesetzt wird. Insbesondere hier ist ein Strahlungswichtungsfaktor von großer Bedeutung. Dies gilt im übrigen auch für ^{99m}Tc (s. hierzu [Pom06]). Physikalisch unterscheiden sich beide Iodnuklide in sehr charakteristischer Weise. Während für ^{125}I die Halbwertszeit (HWZ) 60 Tage und die Anzahl der emittierten Auger Elektronen pro Zerfall ca. 15 betragen, liegen die entsprechenden Werte für ^{123}I bei 13,2 Stunden und ca. 8 Elektronen.

Diese Unterschiede machen einen biologischen Vergleich sehr schwierig und eine entsprechende Interpretation relativ komplex. Modellrechnungen [Pom02] ergaben, dass die Schädigung der DNA in Form von komplexen Doppelstrangbrüchen nach Inkorporation von ^{125}I um den Faktor 2,3 stärker ist im Vergleich zu ^{123}I .

2.1 Experimentelle Befunde

Die meisten experimentellen Studien über Auger-Elektronen emittierende Nuklide beschränken sich auf die Untersuchung eines einzigen Nuklides im Vergleich zu Niedrig-LET-Photonenstrahlung oder zu Beta-Strahlern wie ^3H oder ^{131}I . Ein direkter Vergleich zweier Auger-Emitter im selben Zeitraum innerhalb desselben Zell-Labors ist nicht bekannt. Lediglich in einer Arbeit [Mak89] werden die Ergebnisse von zwei Überlebensexperimenten, die zu verschiedenen Zeiten mit ^{125}I und ^{123}I im selben Labor durchgeführt worden waren, zusammen betrachtet. In diesen Arbeiten wurden die Zellen eingefroren, sodass die Zerfälle akkumulieren konnten, ohne dass sofort biologische Antwortprozesse einsetzten. Aus diesen Daten ergibt sich eine etwa 2,3-fach größere Effizienz von ^{125}I gegenüber ^{123}I . Lobachevsky und Martin [Lob05] vergleichen Doppelstrangbrüche im Plasmid pBR322 nach DNA-nahem Zerfall von ^{123}I und ^{125}I nach einer Inkubationszeit von 3 - 4 Wochen und finden eine entsprechende Effizienz von 0,62 pro Zerfall für ^{123}I im Vergleich zu 0,82 für ^{125}I . In Gegenwart des Radikalfängers DMSO verringern sich diese Werte auf 0,54 bzw. 0,65. Darüber hinaus liegen für beide Iodisotope erst seit kurzem weitere vergleichende experimentelle Befunde vor. So sehen Kishikawa et al. [Kis06] einen stimulierenden Bystander-Effekt nach ^{123}I -Applikation und einen inhibierenden nach ^{125}I -Applikation. Urashima et al. [Ura04] finden nach Einbau von $^{125}\text{IUdR}$ in zwei menschliche Tumorzelllinien (TE671 und MCF7) keine DNA-

Fragmentation und schließen daraus auf Zelltod ausschließlich infolge Nekrose.

2.2 Computer-gestützte Modellierung

Für die im Rahmen dieser Studie experimentell untersuchten Nuklide ^{123}I und ^{125}I liegen in der Literatur verschiedene Elektronen-Emissionsspektren vor. Alle entstammen Monte-Carlo-Simulationen, wobei diese sich hinsichtlich der Berechnung der kinetischen Elektronen-Energien unterscheiden. Während die Simulationen nach Humm [Hum84] und Howell [How92a] die Energie semi-empirisch nach der sog. (Z+1)-Methode berechnen, werden in der Simulation nach Pomplun [Pom92] jeweils die Gesamtenergien der beteiligten Elektronen-Konfigurationen vor und nach einem Auger-Übergang bestimmt und aus der Differenz die kinetische Energie des emittierten Auger-Elektrons abgeleitet. Dieses Verfahren führt zu einer ausgeglichenen Gesamtenergiebilanz für das Zerfallsereignis. Aus diesen Unterschieden resultieren unterschiedliche Werte hinsichtlich der Anzahl der pro Zerfall emittierten Elektronen (s. Tab. 1). Für alle drei Verfahren gilt aber, dass die Zahl der Auger-Elektronen im Falle von ^{125}I etwa doppelt so groß ist wie im Falle von ^{123}I bei gleichen kinetischen Energien. Die physikalische Ursache hierfür ist in den unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten für einen strahlungslosen Übergang vom angeregten Te-Zustand nach Elektronen-Einfang in den Grundzustand zu sehen. Während

ein solcher Übergang beim ^{125}I in 93% aller Zerfälle auftritt und somit Anlass für eine zweite Auger-Kaskade gibt, beträgt diese Wahrscheinlichkeit beim ^{123}I lediglich 16%. Somit deponiert ein ^{125}I -Zerfall im Mittel etwa doppelt soviel Energie in seiner unmittelbaren Umgebung wie ein ^{123}I -Zerfall.

Die Simulation von DNA-Schäden mittels Bahnschäden und deren Überlagerung mit DNA-Modellen hat bei einem Vergleich beider Nuklide [Pom02] gezeigt, dass das Verhältnis komplexer Doppelstrangbrüche ($^{125}\text{I} / ^{123}\text{I} = 2,3$) gut korreliert mit dem Verlust des Proliferationsvermögens, wie es Makrigiorgos et al. [Mak89] beschrieben haben. Diese Autoren kommen zu einem Verhältnis der D_0 -Werte bei Überlebensexperimenten von ebenfalls 2,3 von ^{125}I gegenüber ^{123}I .

Zur Coulomb-Explosion liegt bisher lediglich ein Ergebnis aus semi-empirischen quantenmechanischen Berechnungen für ein IUdR-Molekül vor [Pom00]. Eine ansteigende Ladung in den Valenz-Schalen des Iod lässt kaum strukturelle Veränderungen erkennen, solange die Ladung kleiner als +5e ist. Bei einer Ladung gleich +5e wachsen die Bindungslängen um mehr als 20 % an, und bei einer Ladung von +6e stellt sich bei den Rechnungen keine Konvergenz mehr ein, d.h. eine stabile Struktur ist nicht mehr möglich. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass diese Rechnungen zum einen lediglich ein isoliertes IUdR-Molekül berücksichtigen und nicht einmal einen Teil eines DNA-Stranges, und zum anderen viele physikalische Effekte auf der molekularen Ebene nicht bzw. nicht hinreichend genau erfassen.

Tabelle 1: Mittlere Anzahl emittierter Elektronen pro Zerfall

Monte-Carlo-Simulationen	^{123}I	^{125}I
Humm [Hum84]	12,3	21,1
Howell [How92a]	14,9	24,9
Pomplun [Pom92, Pom00]	7,6	15

3 Experimentelle Untersuchungen

3.1 Einleitung

Da ein Wirkungsfaktor von 2,3 für Zellüberleben zwischenzeitlich auch mit modelltheoretischen Untersuchungen zur Effizienz von Doppelstrangbruchinduktion [Pom02] bestätigt worden war, wurden aus den Experimenten Resultate in ähnlicher Größenordnung erwartet, die in etwa auch die Unterschiede in der deponierten Energie zwischen beiden Isotopen widerspiegeln.

Überraschenderweise zeigten sich aber keine allzu großen Differenzen im Ausmaß der Schadenswirkungen, stattdessen ergab sich ein ganz anderes Bild, das auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen schließen lässt (s.u.). Ursache hierfür können einzig die unterschiedlichen Dosisraten sein, die sich aus dem Zerfall der beiden Iodisotope ergeben. Unterstützt werden diese Befunde durch jüngere Arbeiten [Ura04, Kis06], die ebenfalls diese Fakten erwähnen.

Unter physiologischen Bedingungen (37°C) ist ein Wirkungsvergleich nur zulässig, wenn die benutzten Methoden hierfür geeignet sind, d.h. dass nur solche biologischen Endpunkte miteinander verglichen werden können, die die unterschiedlichen Zerfallszeiten und die daraus resultierenden unterschiedlichen Dosisraten entsprechend berücksichtigen. So vergehen z.B. bei den Messungen von Überlebenskurven zwischen der Inkorporation und der Bildung geeigneter Kolonien mehrere Tage bis Wochen, währenddessen ^{125}I weiter zerfällt, während ^{123}I , das infolge seiner geringen HWZ bereits völlig zerfallen ist, keinen weiteren strahleninduzierten Effekt mehr liefert.

Biologisch relevanter sind daher die o.g., von Urashima et al. [Ura04] und von Kishikawa et al. [Kis06] durchgeführten Untersuchungen. Hierbei handelte es sich sowohl um sog. Bystander-Effekte nach ^{123}I - und

^{125}I -Inkorporation als auch um Untersuchungen der Apoptoseinduktion nach ^{125}I -Einbau. Interessanterweise zeigten Kishikawa et al., dass die mit einer lethalen ^{123}I -Dosis behandelten Tumorzellen eine deutliche Proliferation und die mit lethaler ^{125}I -Dosis behandelten eine Inhibition der umgebenden, ebenfalls in Nacktmäusen coinjizierten unbehandelten Tumorzellen bewirkten, verglichen mit den Kontrollen. Diese als stimulierend bzw. inhibierend bezeichneten Bystander-Effekte beobachteten sie auch bei *in-vitro*-Versuchen mit Adenocarcinom-Zellen nach Inkorporation von ^{123}I bzw. ^{125}I in die zelluläre DNA [Kis06]. Die Autoren erklärten dieses Verhalten mit der Tatsache, dass nach 11 - 15 Tagen ^{123}I bereits total zerfallen und somit wirkungslos gegenüber den überlebenden unbehandelten und ebenfalls injizierten Zellen war. Die mit ^{123}I behandelten Zellen setzten proliferative Botenstoffe in ihre Umgebung frei und regten somit die nicht mit ^{123}I behandelten Tumorzellen zum Wachstum an. Diese neuen Erkenntnisse lassen bisherige Ergebnisse, die sich auf dosimetrische Betrachtungen nach radiopharmazeutischen Applikationen beziehen, in einem differenzierteren Licht erscheinen und verlangen u.U. nach zusätzlichen Untersuchungen der zellulären Abläufe, insbesondere bezogen auf die Apoptose.

Apoptose ist ein hoch konservierter Ablauf, der zur Embryogenese, Homeostase und Entfernung geschädigter Zellen führt [Alb04]. Dieser Prozess stellt neben der Nekrose eine der zwei möglichen Formen des zellulären Absterbens dar. Im Gegensatz zur Apoptose verläuft die Nekrose schnell und häufig entzündlich. Im Allgemeinen tritt die Nekrose dann auf, wenn die Zelle entweder extrem geschädigt ist oder wenn der Energiebedarf für die Apoptose nicht gedeckt werden kann. Aus diesen Gründen bezeichnet man die Nekrose als 'unphysiologische' Form des Zelltodes. Die Apoptoseinduktion verläuft über unterschiedliche Signalketten, die sich an die Aktivierung oder Neusynthese von verschiedenen Proteinen anschlie-

ßen, mit dem Ergebnis, dass Zellmembranen verändert, DNA degradiert und insgesamt die zelluläre Integrität zerstört werden.

Zu diesen, die Apoptose induzierenden Enzymen, gehören die Caspasen 1 - 10. Die Signalketten, die zur Apoptose führen, können sowohl extrinsisch als auch intrinsisch ausgelöst werden. Ein Beispiel für die extrinsische Auslösung der Apoptose ist z.B. die durch Killer-Lymphozyten verursachte. Dieser Lymphozyt besitzt an seiner Oberfläche einen Liganden (Fas-Ligand), der mit einem geeigneten Rezeptor (Fas-Protein) an der Zielzelle reagiert [Alb04] und dadurch eine komplexe Signalkaskade zur Aktivierung bestimmter Caspasen (z.B. 2 und 8) auslöst und somit die Apoptose hervorrufen kann.

Im Gegensatz zum Rezeptorweg kann die Apoptose auch intrinsisch ausgelöst werden. Die Schädigung der DNA ist dafür ein Beispiel. Im Falle einer lethalen, irreparablen Schädigung sollte eine Zelle über Aktivierung von bestimmten Genen (z.B. p53) die Apoptose intrinsisch auslösen. Die Signalkette kann hierbei über das Mitochondrium erfolgen, das als eine Art 'Schnittstelle' eine wichtige Rolle bei der Apoptoseregulierung spielt [Ver00]. Dabei kommt es zu einer frühen Ausscheidung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium. Cytochrom C reagiert zuerst mit dem Adaptorprotein (Apaf-1), das dann an Procaspase-9 bindet, das damit aktiviert wird und sich in eine aktive Form (Caspase-9) umwandelt. Caspase-9 aktiviert andere Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3, -6 und/oder -7), die direkt zur Apoptose führen [Ver00].

Da in einer Zelle nicht nur pro-apoptotische Proteine, sondern auch anti-apoptotische vorhanden sind (z.B. Bcl 2), wird die Apoptose durch ein Gleichgewicht zwischen diesen Proteinen reguliert. Eine funktionierende Zelle versucht nach einer Schädigung zuerst ihre Reparaturmechanismen zu aktivieren, bevor die Apoptose beginnt. Die Koordination dieser Mechanismen wird von verschiedenen Genen (z.B. p53, p21) übernom-

men, die u.a. den Zellzyklus steuern.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen die Auswirkung von ^{123}I - und $^{125}\text{IUdR}$, eingebaut in die DNA menschlicher Nieren-T1-Zellen, auf die apoptotischen Vorgänge. Es wurden sowohl die Gesamtaktivität aller Caspasen als auch die Einzelaktivitäten der Caspasen-2, -3, -8 und -9 gemessen, die zur Aufklärung der Signalwege beitragen sollen. Dabei gewonnene Erkenntnisse wurden zusammen mit dem COMET- und Mikronuklei-Assay zum Vergleich der biologischen Wirkung dieser Iodnuklide herangezogen. Als Bezugswert für einen geeigneten Vergleich wurde die gleiche Anzahl radioaktiver Zerfälle pro Zelle nach 30-stündiger Inkorporationsdauer angestrebt.

Generell lässt sich die Problematik, die sich beim Vergleich der biologischen Wirkung beider Iodnuklide aufgrund einer 109-fach längeren Halbwertszeit von ^{125}I gegenüber ^{123}I ergibt, nicht mit jeder experimentellen Methode so berücksichtigen, dass vertrauenswürdige Aussagen über die unterschiedliche Zytotoxizität unmittelbar erhalten werden können. Das ist der Grund, warum hier die zeitlich sehr lange dauernde Koloniebildungsmethode zur Erstellung von Dosis-Effekt-Beziehungen nicht in Betracht kam.

3.2 Material und Methoden

Die experimentellen Untersuchungen erfolgten mit menschlichen Nieren-T1-Zellen in Kultur. Diese waren 1957 von der gesunden Niere eines 8-jährigen Jungen isoliert worden und seitdem in Kultur gehalten [Vee57]. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO_2 -Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das verwendete Wachstumsmedium war BME-Earl mit 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin und 1% L-Glutamin. Alle Chemikalien wurden von Fa. Fluka bezogen, nur die Zellkulturreagenzien von Fa. Biochrom.

3.2.1 Herstellung und Inkorporation von $^{123}\text{IUdR}$ und $^{125}\text{IUdR}$

$^{123}\text{IUdR}$ und $^{125}\text{IUdR}$ wurden nach einer modifizierten Vorschrift nach Baranowska et al. [Bar94] hergestellt. Zuerst erfolgte die Synthese des Zwischenprodukts 5-Trimethylstanyl-2-deoxyuridin und anschließend die radioaktive Markierung mit ^{123}I zu $^{123}\text{IUdR}$ bzw. ^{125}I zu $^{125}\text{IUdR}$ unter Verwendung wasserfreien Dioxans. Die Markierung verlief unter oxidativen Bedingungen und Ultraschallbehandlung (Ausbeute ca. 90%). Die Qualitätskontrolle wurde mittels Dünnschichtchromatographie (80% Chloroform und 20% Methanol) szintigraphisch durchgeführt. Nur vollständig markiertes und nicht zerfallenes IUdR wurde für die anschließende Inkorporation in zelluläre DNA herangezogen.

Im Detail wurde die Synthese des radioaktiven IUdR folgendermaßen realisiert: In einem Dreihalskolben wurden 493,4 mg (1,4 mmol) IUdR mit 45 ml wasserfreiem Dioxan bei 60°C im Wasserbad unter ständigem Rühren weitgehend gelöst, nach 4 h der nicht gelöste Rückstand mittels Faltenfilter abgetrennt und gewogen. Zum gelösten IUdR wurden 1 g (750 μL = 6,1 mmol) Hexamethyldizinn und als Katalysator 26,1 mg Bis[triphenylphosphin]palladium(II)dichlorid gegeben. Anschließend reagierte die Mischung unter N_2 -Atmosphäre am Rückfluss bei ca. 110°C für 3-5 h, bis IUdR mittels Dünnschichtchromatographie (DC) nicht mehr nachweisbar war.

Die nach Abkühlung auf 40°C verbleibende dunkelbraune Lösung wurde mit einem Rotationsverdampfer eingeeengt. Das getrocknete Zwischenprodukt wurde mit ca. 3 g Kieselgel 60 (Fa. Fluka) gemischt, in 4 mL Chloroform / Methanol (80/20, v/v) gelöst und anschließend das Zwischenprodukt mit Flash-Chromatographie ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ = 80/20, v/v) über eine Kieselgelsäule (12 g) vorgereinigt. Die Flash-Chromatographie erfolgte bei der Vortrennung nach folgen-

den Schritten: Equilibrieren der Säule mit 3-fachem Säulenvolumen bei einer Flussrate von 40 mL/min. Anschließend wurde die Probe bei 40 mL/min durch die Säule gedrückt und die ersten 100 mL Eluat (Erfahrungswert) zusammen in einer Fraktion aufgefangen. Diese Fraktion (Vorfraktion) wurde auf 10 mL eingeeengt. Je 300 μL der Vorfraktion wurden über eine 12 g Kieselgelsäule mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (80:20, v/v) per Flash-Chromatographie getrennt. Die Flash-Chromatographie erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend wurde die Probe bei einer Flussrate von 6 mL/min über die Säule gegeben.

Nach mehreren Läufen und DC-Tests wurde festgestellt, dass die ersten 24 mL Eluat verworfen und nur die nächsten 14 mL gesammelt werden mussten. In diesem 14-mL-Eluat befand sich die Vorläufersubstanz, die einen Retentionfaktor (Rf) von 0,388 ergab. Die Säule wurde mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (80/20, v/v) und bei einer Flussrate von 40 mL/min für 2 Minuten gespült (ca. 4 Säulenvolumina). Nach dem Spülvorgang konnten die nächsten 300 μL der Fraktion aus der Vortrennung aufgetragen werden. Das gereinigte 5-Trimethylstanyl-2-deoxyuridin wurde eingeeengt und in Fraktionen zu je 0,5 mL aufgeteilt. Einige Fraktionen wurden unter N_2 zur Trockene eingedampft und gewogen, um die Konzentration an Vorläufersubstanz festzustellen. In einem 1,5-mL-Glasgefäß wurden nun 23 μL 5-Trimethylstanyl-2-deoxyuridin-Lösung, die 100 μg 5-Trimethylstanyl-2-deoxyuridin entsprachen, gegeben, zur Trockene unter N_2 eingedampft und in 100 μL Chloroform gelöst. Diese Lösung wurde zu 50 μL Na^{123}I -Lösung (2 mCi Na^{123}I bzw. Na^{125}I , gelöst in 0,05 M NaOH) gegeben, vermischt und 5 μL einer $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_3\text{COOH}$ -Lösung (1:3, v/v) hinzugefügt. Die Probe wurde für 10 Sekunden mit Ultraschall (Schallkopf direkt in die Lösung eingetaucht) behandelt, um die chemische Austauschreaktion zu erleichtern. Nach der Beschallung wurde die Chloroformphase von

der wässrigen Phase getrennt, unter N₂ eingedampft und das verbliebene ¹²³IUdR mit PBS auf 100 µL aufgefüllt und mit der zuvor abgetrennten wässrigen Phase vereint.

Die Inkorporationsversuche erfolgten mit dem Ziel, den Einbau des ¹²³IUdR bzw. ¹²⁵IUdR in die zelluläre T1-DNA möglichst optimal zu gestalten. Dazu wurde während der exponentiellen Wachstumsphase den T1-Zellen im Wachstumsmedium (lt. Wachstumskurve ca. 30 h nach Einsaat) ¹²³IUdR bzw. ¹²⁵IUdR mit einbaufördernden Additiven (10⁻⁸ M FUdR und 10⁻⁸ M CdR) gegeben. Da es sich um asynchrone Zellkulturen handelte, wurde anschließend für weitere 30 Stunden eine Inkorporation von ¹²³IUdR bzw. ¹²⁵IUdR durchgeführt, um zu gewährleisten, dass möglichst alle Zellen die S-Phase durchliefen, in der der eigentliche Einbau in die DNA erfolgte. Während der Inkubationsdauer wurde das radioaktive Medium alle 8 Stunden ausgetauscht, um einer Einbausättigung vorzubeugen [Zer01]. Nach dieser Zeit erfolgte die Auswertung. Zur Berechnung der Zerfälle pro Zelle wurde ein separates Programm entwickelt, das die unterschiedlichen HWZ's der Iodnuklide, die Einbauraten von ¹²³IUdR und ¹²⁵IUdR sowie die Vermehrung der T1-Zellen berücksichtigt [Küm06].

3.2.2 Experimentelle Methoden zur Untersuchung verschiedener biologischer Endpunkte

3.2.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Analyse von Apoptose und Nekrose

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die Nieren-T1-Zellen hinsichtlich apoptotischer bzw. nekrotischer Zustände nach radioaktiver Exposition untersucht. Diese Methode beruht auf der Benutzung der Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid und Hoechst H 33342 einschließlich DAPI Filter (360/460 nm). Etwa 200.000 Zellen wurden mit 1 µL Propidiumiodid (5 mg/mL) und

1 µL Hoechst-Farbstoff (Calbiochem) (0,1 mg/mL) vermischt. 50 µL dieses Gemisches wurden auf einem Objekträger mit dem Fluoreszenzmikroskop (10 x 16, Filter BP 546, FT 580, LP 590, Zeiss) analysiert. Bei 630-facher Vergrößerung wurden 300 Zellen charakterisiert.

3.2.2.2 Bestimmung der Gesamt- und Einzel-Caspasenaktivität

Die Gesamt-Caspasenaktivität wurde mittels FITC-VAD-FMK-Marker bestimmt. VAD (Valin, Alanin und Aspartat) ist ein synthetisches Tripeptid, gekoppelt an Fluoromethylketon (FMK). VAD besitzt eine ausgeprägte Affinität zu aktiven Caspasen in apoptotischen Zellen. Es kann in die Zelle frei diffundieren. Wenn keine Apoptose vorliegt, verweilt der Marker nicht lange in der Zelle. Er kann zu 90% mit PBS ausgewaschen werden [Bel01]. Zur Analyse wurden etwa 0,7 mL Zellsuspension (ca. 250.000 Zellen) bei 1100 UpM für 5 min zentrifugiert, in 0,5 mL PBS suspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 200 µL eines Gemisches aus FITC-VAD-FMK (Fa. Promega) und PBS (999 µL PBS auf 1 µL VAD) resuspendiert und bei Raumtemperatur für 20 min in der Dunkelheit inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 200 µL PBS suspendiert und mittels Durchflusszytometer gemessen.

Zur Aktivitätsbestimmung der Einzelcaspasen-2, -3, -8 und -9 wurde der ApoAlert Caspase Assay Kit der Fa. BD Biosciences verwendet. Diese Bestimmungsmethode nutzt die Fähigkeit der aktiven Caspasen, die für bestimmte Caspasen spezifischen und fluoreszenzmarkierten Substrate zu spalten. Das dabei freigesetzte Fluorochrom erzeugt ein optisches Signal, dessen Intensität der relativen Menge der Caspase entspricht. Der Versuch wurde in einer vom Hersteller mit dem entsprechenden Fluoreszenzsubstrat beschichteten Microtiterplatte durchgeführt, wobei etwa 200.000 Zellen/Well lysiert, für 2 h bei

37°C inkubiert und anschließend mit dem Microtiterplatten-Leser Sirius HT (MWG) analysiert wurden.

3.2.2.3 TUNEL-Assay

Der TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)-Assay wurde für die Bestimmung der strahleninduzierten DNA-Strangbrüche unter Verwendung des Apo-Direct Kits von BD Biosciences herangezogen. Hierbei koppelte FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) markiertes dUTP an 3'-OH Gruppen, die durch DNA-Strangbrüche entstanden waren. Zellsuspensionen von je $1 \cdot 10^6$ T1-Zellen in BME wurden für 5 min bei 1100 U/min zentrifugiert, das Zellpellet in 1 mL mit PBS verdünnter Fixierlösung (1% Formaldehyd aus Stocklösung von 10% Cellfix, BD Biosciences) aufgenommen und für 60 min auf Eis gelagert. Danach wurde die Fixierlösung von den Zellen abzentrifugiert, das Pellet in 5 mL PBS resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen in 260 mL PBS aufgenommen, 700 mL 96% Ethanol (Endkonzentration 70%) hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur möglichst vollständigen Fixierung und Permeabilisierung lagerten die Zellen für 16 h bei -20°C. Auf diese Weise wurde jegliche Weiterentwicklung der Zellen nahezu vollständig unterbunden. Nach Entfernung der Ethanollösung (Zentrifugation und Aspiration) wurden die Zellen zweimal mit 1 mL *Wash buffer* zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 μ L Lösung (10 μ L *Reaction buffer*, 8 μ L FITC-dUTP und 0,75 μ L TdT Enzym, gelöst in 32,25 μ L destilliertem Wasser) resuspendiert. Nach Inkubation von 60 min bei 37°C wurde der Zelllösung 1 mL *Rinse buffer* hinzugefügt und zentrifugiert, bevor die Fluoreszenzmessung der T1-Zellen mit dem Durchflusszytometer erfolgen konnte.

3.2.2.4 COMET-Assay

Der COMET-Assay bietet die Möglichkeit, DNA-Schäden einer einzelnen Zelle nach horizontaler Gelelektrophorese quantitativ zu erfassen. Die für die Versuche benötigten Objektträger (Menzler-Gläser, Super-Frost, fettfrei) wurden mit 100 μ L 1% *normal melting point* Agarose gleichmäßig beschichtet, um die nachfolgende Zellsuspension einbetten zu können. Auf diese Agaroseschicht wurden 100 μ L einer Suspension, bestehend aus $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL Zellen und 1% *low melting point* Agarose im Verhältnis 1:10, aufgegeben und sofort mit Deckgläsern bedeckt. Dies führte zu einer gleichmäßigen Verteilung der Suspension und zu einer glatten Oberfläche der Agarose. Nach 10-minütiger Inkubation der beschichteten Objektträger auf Eis verfestigte sich die Agarose. Dann wurden die Deckgläser vorsichtig entfernt und die auf den Objektträgern befindlichen Zellen mit Lysepuffer bei 4°C für 60 min lysiert. Danach wurde der Puffer abgesaugt und die Objektträger in der Elektrophoresekammer für 25 min mit alkalischem Elektrophoresepuffer inkubiert, wodurch die DNA denaturierte. Anschließend wurde die Horizontal-Elektrophorese (DNA Sub Gel; BioRad) für 25 min bei 0,8 V/cm durchgeführt (BioRad Power Supply Model 160/1.6). Hierbei wanderten die strahleninduzierten DNA-Fragmente schneller zur Anode als die intakte doppelsträngige DNA. Die Objektträger wurden anschließend dreimal für fünf Minuten mit Tris-HCl-Puffer gewaschen. Nach kurzer Lufttrocknung erfolgte die Färbung mit Propidiumiodid (100 μ L Färbelösung = 20 μ g/mL). Die Auswertung der Kometen geschah innerhalb von 24 Stunden mit dem Softwareprogramm *Komet 3.1*, wobei auf der Grundlage von 200 Zellen pro Objektträger das Olive-Tail-Moment (OTM) berechnet wurde.

Der alkalische COMET-Assay, der hier zur Anwendung kam, basierte v.a. auf der Messung von Olive-Tail-Moment-Werten (OTM), die sich hauptsächlich auf DNA-Einzelstrangbrüche (ESB's) beziehen, sie je-

doch nicht quantifizieren. Es sind stets Relativmessungen, bezogen auf nicht-bestrahlte Kontrollen. Bis heute gibt es keine geeignete Methode zur Quantifizierung von DNA-Schäden in Form von ESB's oder auch von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB's) bei neutralen Versuchsbedingungen, die mit dem COMET-Assay gemessen werden können. Aufgrund vieler Parameter, die anhand der Software *Komet 3.1* ermittelt werden konnten, wurde das oben erwähnte OTM als biologischer Endpunkt herangezogen. Dazu wurde die Differenz aus den Leuchtmittelschwerpunkten von Kopf und Schweif des sichtbar gemachten Kometen ermittelt und mit dem prozentualen DNA-Anteil des Schweifes multipliziert. Somit detektiert das OTM zwei Komponenten, nämlich die Wanderungsstrecke zwischen Kopf und Schweif sowie die DNA-Konzentration im Schweif. Beide Komponenten nahmen quantitativ mit steigender Schädigung zu.

Um den biologischen Effekt beider Isotope vergleichen zu können, wurde nach der Bestimmung der Einbaukurve jeweils so viel an Nuklidaktivität zugegeben, dass die zu erwartenden OTM-Werte im linearen und somit vergleichbaren Bereich lagen. Zusätzlich wurde darauf geachtet, eine möglichst gleiche Anzahl an Zerfällen pro Zelle (d/c) für beide Isotope zu erzielen.

3.2.2.5 Mikronuklei-Assay

Mittels der Mikronuklei-Methode ist es möglich, zytogenetische Schäden an Zellen zu messen. Dabei werden proliferierende Zellen durch die Zugabe des Cytochalasin-B so gestört, dass zwar eine Kern- aber keine Zellteilung erfolgen kann. So entstehen doppelkernige Zellen, die geschädigte DNA in Form von Mikrokernen aus den Hauptkernen entfernen.

Der Mikronuklei-Test wurde hier wie folgt durchgeführt: die Zellsuspension wurde für 10 min bei 1000 UpM zentrifugiert und das

Pellet mit ca. 7 mL frischem eiskaltem Fixativ I (Methanol : 0,9% NaCl : Essigsäure = 10 : 11 : 1) heftig geschüttelt (Vortex), bei Raumtemperatur für 6 min inkubiert und schließlich abzentrifugiert. Die Zellen wurden nun mit ca. 4 mL frischem eiskaltem Fixativ II (Methanol : Essigsäure = 10 : 1) *gevortext* und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Vorgang wurde erneut wiederholt, um anschließend die Zellen auf Objektträgern zu je 100 μ L aufzutragen. Die Trocknung erfolgte bei RT mit der anschließenden Färbung für 20 min mittels 50 mL Hepes-, 1,6 ml Azur- und 400 μ L Eosin Y-Lösung. Die Hepeslösung setzte sich aus 27 mL Lösung A (Hepes säurefrei - Fa. Serva 25245; 0,12 g/mL) und 3 mL Lösung B (Hepes Na-Salz - Fa. Serva 25249; 0,13 g/mL). Zum Mikroskopieren wurden die so gefärbten Objektträger mittels DPX Lösung und Deckglas versehen. Während der mikroskopischen Auswertung wurden 500 doppelkernige Zellen berücksichtigt und die Anzahl der Zellen, die Mikrokerne aufwiesen, gezählt.

3.2.2.6 Zellzyklusverteilung

Die Bestimmung der sich in den einzelnen Zellzyklusphasen (G_0/G_1 , S, G_2/M) befindlichen Zellen erfolgte mittels Durchflußzytometer nach Anfärbung des für die einzelnen Phasen charakteristischen DNA-Gehalts mit Propidiumiodid, dessen Fluoreszenzintensität proportional zur DNA-Menge ist.

Durchführung im Detail: Die verwendete Propidiumiodid-Stammlösung (Fa. Fluka) hatte eine Konzentration von 5 mg/mL H_2O . Die Herstellung der Färbelösung erfolgte durch Zugabe von 5 ml 0,1% Natriumcitrat-Lösung (Fa. Merck) zu 50 μ L 10%-iger Triton-X-100-Lösung (Fa. Sigma) und 50 μ L PI-Stammlösung. Etwa 1,5 mL Zellsuspension (ca. 750.000 Zellen) wurden mit 500 μ L Färbelösung und 50 μ L RNase (0,1 mg/mL) (Fa. Sigma) suspendiert. Die Zellsuspension inkubierte für 1 h bei RT

in Dunkelheit. Nach der Inkubation wurde die zellkernhaltige Lösung auf DNA-Gehalt der verschiedenen Zellzyklusphasen mit dem Durchflußzytometer analysiert.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Apoptose und Nekrose

Die hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumjodid (PI) und Hoechst H 33342, die auf Grund ihrer unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsmaxima und unter Verwendung eines entsprechenden DAPI-Filters gleichzeitig verwendet werden können, erlauben die optische Darstellung strahleninduzierter struktureller Veränderungen von Zellen. Während PI ausschließlich für die Anfärbung membrangeschädigter Zellen verantwortlich ist, färbt H 33342 alle Zellbestandteile, unabhängig, ob geschädigt oder nicht. Bei einer 650- bis 900-fachen Vergrößerung ließen sich folgende Zellsituationen eindeutig bestimmen: Nicht-geschädigte Zelle mit intaktem Zellkern, früh-apoptotische Zelle mit Zellkernfragmenten und intakter Plasmamembran, spät-apoptotische Zelle mit Zellkernfragmenten und geschädigter Plasmamembran, nekrotische Zelle mit intaktem Zellkern und geschädigter Plasmamembran. Die in den Abbildungen 3 und 4 sowie Tabelle 2 zusammengestellten Ergebnisse weisen daraufhin, dass im Falle des ^{123}I der prozentuale Anteil an früh-apoptotischen Zellen mit zunehmenden Zerfällen/Zelle ansteigt, während der Anteil an spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen bei 1% bzw. 4-5% stagniert. Demgegenüber sind ^{125}I -Zerfälle vorwiegend für die Bildung spät-apoptotischer und vor allem nekrotischer Zellen verantwortlich; letztere bis zu 10% der gesamten untersuchten Zellen ($n = 300$). Der Vergleich der durch die Iodnuklide induzierten zellulären Konsequenzen deutet daraufhin, dass ^{125}I infolge seines erhöhten Anteils an Nekrose für mindestens 10% (gegenüber 5% der Zellen nach ^{123}I -Einwirkung) der

untersuchten T1-Zellen einen lethalen Prozess repräsentiert. Dieser stellt gegenüber der für die Abwehr- bzw. Immunreaktion bedeutsamen Früh-Apoptose, die nach ^{123}I -Exposition überwiegt, ein besonders negatives Ereignis, bezogen auf den Gesamtorganismus, dar.

3.3.2 Gesamt- und Einzel-Caspasenaktivität

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, spielen Caspasen bei der durch ionisierende Strahlung induzierten Apoptose eine dominierende Rolle. Die Abbildungen 5 - 7 geben die prozentuale Aktivität sowohl der Gesamt- als auch der Einzel-Caspasen als Funktion steigender Zerfallszahlen (Zerfälle/Zelle) wieder, bezogen auf die nicht-exponierten Kontrollen (100%). Die Steigung des Kurvenverlaufs nach ^{123}I -Exposition (Inkorporation und Inkubation) war um den Faktor 1,9 stärker als nach ^{125}I -Behandlung (s. Abb. 5). Diese Aussage wird allerdings durch das geringe Bestimmtheitsmaß von 0,465 bzw. 0,576 sehr abgeschwächt. Aus diesem Grund wurde das Verhalten der Einzel-Caspasen-2, -3, -8 und -9 für eine individuelle Aussage herangezogen. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede im Kurvenverlauf. Während ^{125}I für Caspase-2 ein ausgeprägtes Maximum bei 2000 d/c und ein 180%-Plateau zwischen 3000 und 4500 d/c zeigt (s. Abb. 7), verursacht ^{123}I für alle Einzelcaspasen ein Maximum zwischen 3200 und 5700 d/c, das besonders für die Caspase-2 (240%), -8 und -9 (200%) stark ausgeprägt ist (s. Abb. 6). Die Aktivität der Einzel-Caspasen unterstützt die Aussage eines stärkeren Anstiegs der Gesamt-Caspasen nach ^{123}I -Exposition (s. Abb. 5). Offensichtlich spielt im hier betrachteten Bereich der Zerfallszahlen die stärkere Dosisleistung des ^{123}I infolge der deutlich kleineren Halbwertszeit eine größere Rolle als der Einfluss der doppelten Anzahl emittierter Auger-Elektronen beim ^{125}I -Zerfall.

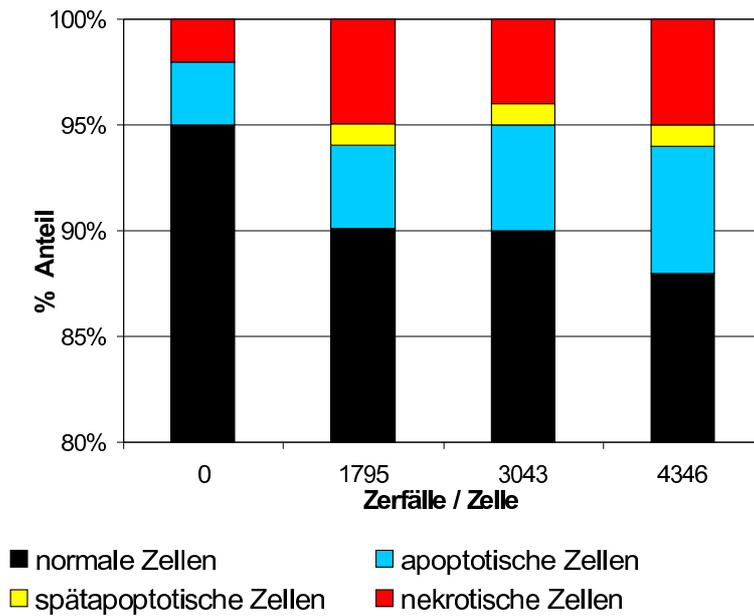


Abbildung 3: Prozentuale Verteilung der apoptotischen und nekrotischen Zellfraktionen nach ^{123}I -Zerfall

Besonders auffällig ist die deutliche Aktivitätszunahme der Caspase-2 sowohl nach ^{123}I - als auch nach ^{125}I -Zerfall. Hier bewirkt ^{125}I bereits nach 2000 Zerfällen/Zelle gegenüber ^{123}I bei 3000 Zerfällen/Zelle einen sprunghaften Anstieg der Aktivität.

Da Caspase-2 ebenso wie Caspase-8 durch verschiedene Plasmamembranrezeptoren (z.B. Apo3-L, Fas-L oder TNF) extrinsisch aktiviert werden kann, scheinen offensichtlich sog. Bystander-Effekte eine Rolle zu spielen [Kis06].

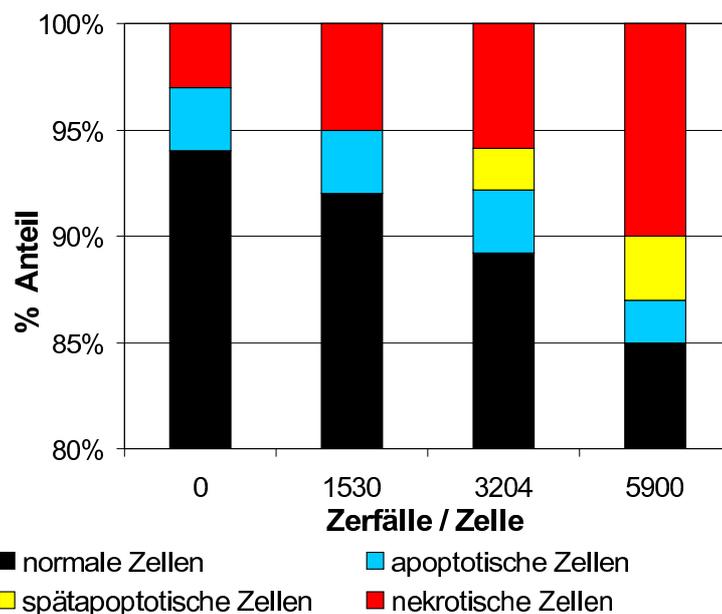


Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der apoptotischen und nekrotischen Zellfraktionen nach ^{125}I -Zerfall

Tabelle 2: Anzahl intakter, apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Zerfall von ^{123}I und ^{125}I

Zerfälle / Zelle	Intakte Zellen	Früha apoptotische Zellen	Späta apoptotische Zellen	Nekrotische Zellen
I-123				
I-125				
0	95	3	0	2
0	94	3	0	3
1795	90	4	1	5
1530	92	3	0	5
3043	90	5	1	4
3204	89	3	2	6
4346	88	6	1	5
5900	85	2	3	10

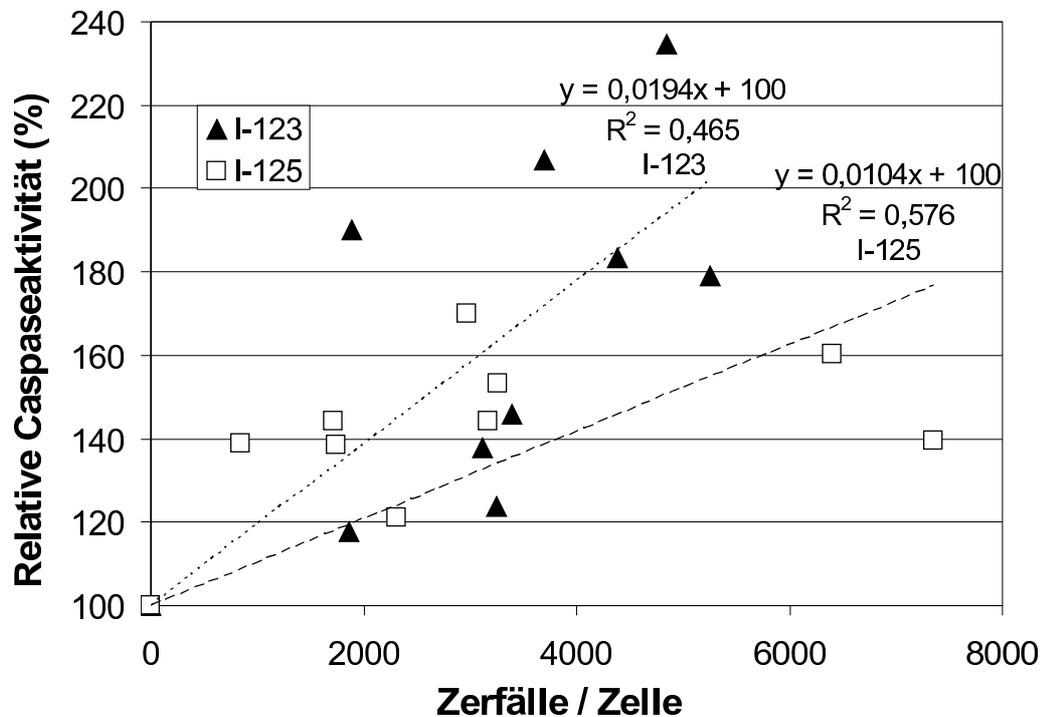


Abbildung 5: Relative Aktivität der gesamten Caspasen als Funktion ansteigender Zerfallszahlen von ^{123}I und ^{125}I , inkorporiert in die DNA menschlicher Nieren-T1-Zellen, bezogen auf nicht-exponierte DNA (Kontrolle = 100%)

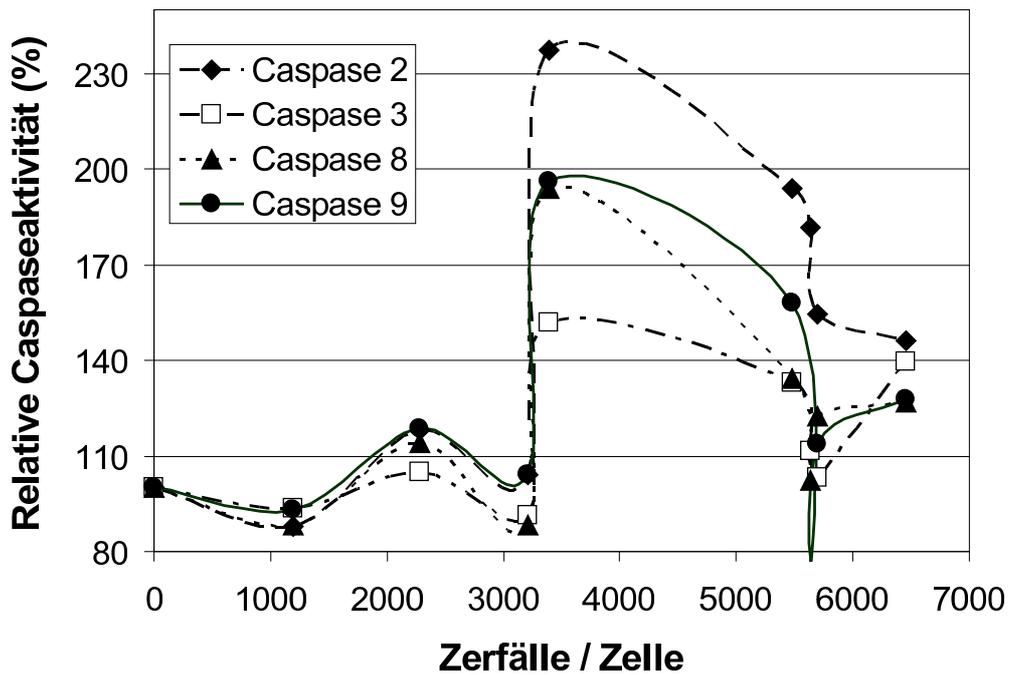


Abbildung 6: Relative Aktivität der Einzel-Caspasen (Caspasen-2, -3, -8 und -9) als Funktion steigender Zerfälle/Zelle von ^{123}I , inkorporiert in die DNA menschlicher Nieren T1-Zellen, bezogen auf nicht-exponierte DNA (Kontrolle = 100%)

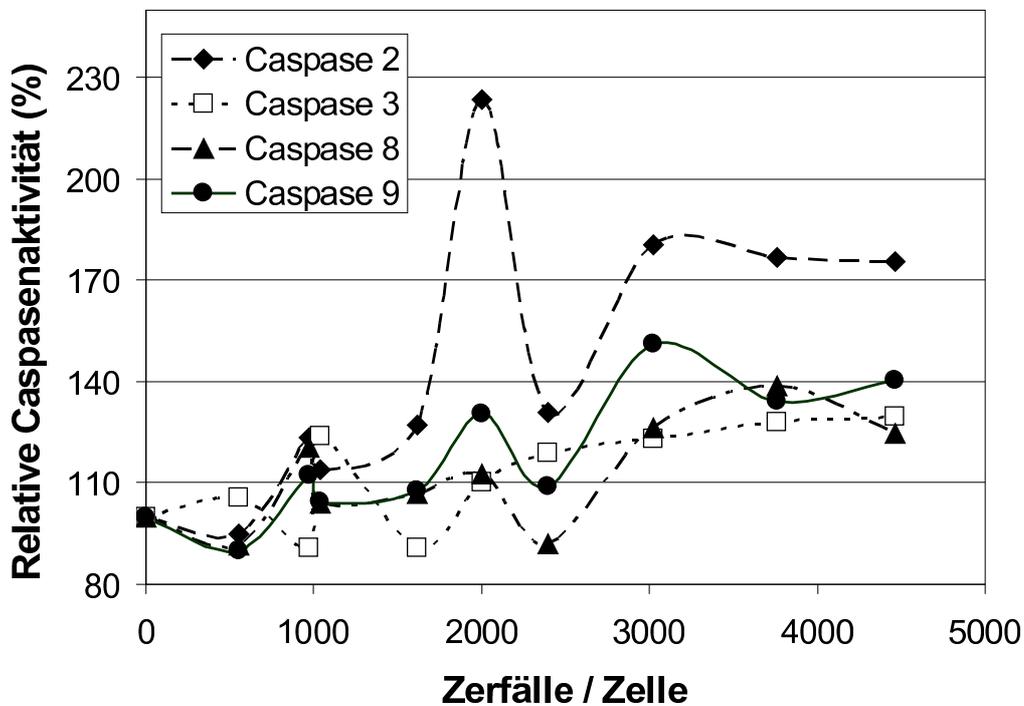


Abbildung 7: Relative Aktivität der Einzel-Caspasen (Caspasen-2, -3, -8 und -9) als Funktion steigender Zerfälle/Zelle von ^{125}I , inkorporiert in die DNA menschlicher Nieren T1-Zellen, bezogen auf nicht-exponierte DNA (Kontrolle = 100%)

3.3.3 DNA-Schäden

Die in Abbildung 8 dargestellten Kurven weisen im Bereich bis zu 5000 Zerfälle/Zelle auf eine unterschiedliche biologische Wirkung der in die DNA inkorporierten Radionuklide ^{123}I und ^{125}I hin. Im Bereich bis zu 1000 Zerfällen/Zelle zeigt die ^{125}I -Kurve einen steileren Anstieg und im Bereich zwischen 1000 und 5000 Zerfällen/Zelle einen stärkeren Abfall gegenüber der ^{123}I -Kurve. Wie erwartet, bestätigt dieser steilere Anstieg eine vermehrte Strangbruchbildung nach Inkorporation von ^{125}I UdR. Kassis et al. [Kas03] stellten in ihren Experimenten fest, dass ^{123}I weniger effektiv ist als ^{125}I , da ^{125}I fast die doppelte Menge an Auger-Elektronen pro Zerfall emittiert und somit mehr Energie in V-79-Zellen deponierte. Dies führte zu einer 1,3- bis 2,2-fach größeren Bildung von DSB's durch ^{125}I im Vergleich zu ^{123}I .

Da bei zunehmenden Zerfällen pro Zelle mit einer größeren Anzahl der induzierten Strangbrüche und dadurch größerer Bindungshäufigkeit des FITC-dUTP Markers mit freien 3'-OH-Gruppen des DNA-Targets zu rechnen war, sollte daraus ein steigendes Fluoreszenzsignal resultieren. Damit konnte allerdings das Absinken der Kurven ab ca. 1000 Zerfälle/Zelle nicht geklärt werden. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals bei höheren Zerfällen pro Zelle könnte aber in einem Verlust von DNA-Fragmenten begründet sein. Durch erhöhte Bestrahlung und somit vermehrte Strangbrüche wurden diese Fragmente immer kleiner und konnten nicht ausreichend in den Zellen fixiert werden. Ähnliche Probleme diskutierten bereits Darzynkiewicz et al. [Gor93]. Sie benutzten die gleiche Fixierungsmethode bei Ihrer Untersuchung von HL-60-Zellen. Wenn diese Begründung zutrifft, dann würde der steilere Abfall der Fluoreszenzwerte durch von ^{125}I für eine stärkere Schädigung der DNA und somit für kleinere Bruchstücke sprechen.

3.3.4 COMET-Assay

Die Daten des prozentualen OTM, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, ergaben im ungesättigten Bereich eine linear steigende Funktion bei zunehmender Dosis (s. Abb. 9).

Die stärkere Geradensteigung im Fall von ^{125}I gegenüber ^{123}I deutet auf den Einfluss der grösseren Anzahl vom emittierten ^{125}I -Auger-Elektronen pro Zerfall hin. Die Unterschiede im Bestimmtheitsmaß R^2 mit 0,9052 für ^{123}I und 0,7872 für ^{125}I relativieren die Aussagekraft des Vergleichs allerdings stark. Die Standardabweichungen von 1,44 für ^{125}I und 1,04 für ^{123}I weisen auch hier auf einen deutlichen Unterschied hin. Die Schwankungen der Werte für ^{125}I waren deutlich größer. Berechnungen auf Unterschiedlichkeit beider Geraden ergaben keine Signifikanz auf dem 95%-Niveau. Daher erfolgte eine genauere Betrachtung der zur Berechnung des OTM-Gesamtwertes führenden Einzelwerte sowie der unterschiedlichen Schweiflängen als Charakteristika für die DNA-Strangbruchparameter: $\text{OTM} = (\text{Tail mean} - \text{Head mean}) \times (\text{Tail \% DNA} / 100)$. Zur Berechnung des OTM's wurde die Differenz der Leuchtmittelschwerpunkte von Kopf und Schweif mit dem prozentualen Anteil der DNA im Schweif (Tail % DNA) multipliziert. Beim Vergleich der Einzelwerte beider Nuklide wurde deutlich, dass die Leuchtmittelschwerpunkte bei ^{125}I wesentlich höher lagen als bei ^{123}I . Das bedeutet, dass die Intensität der PI-Fluoreszenz dort intensiver war. Eine befriedigende Begründung dafür konnte nicht gefunden werden, da sonst alle anderen Werte im gleichen Rahmen lagen und keine weiteren Unterschiede aufwiesen. Da in der Formel zur Berechnung des OTM's nur die Differenzen der Leuchtmittelschwerpunkte berücksichtigt werden und diese Differenzen bei beiden Nukliden ähnliche Werte hatten, konnte auch da kein Unterschied festgestellt werden. Die Differenzen der Leuchtmittelschwerpunkte zeigten keine direkte

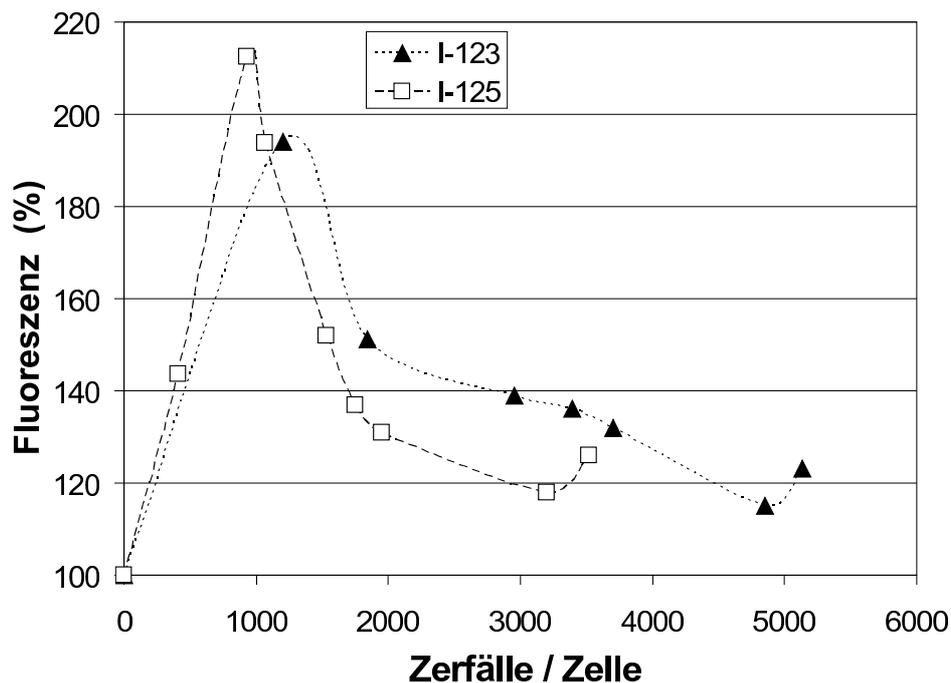


Abbildung 8: Fluoreszenzsignal von DNA-Bruchstücken, versehen mit FITC-dUTP-Markern, in Abhängigkeit steigender ^{123}I - und ^{125}I -Zerfälle/Zelle, die auf akkumulierten I-Nuklid-Zerfällen nach Inkorporation von ^{123}I - bzw. ^{125}I -IUDR in die zelluläre DNA menschlicher Nieren T1-Zellen beruhen, bezogen auf 100% der unbestrahlten Kontrollprobe

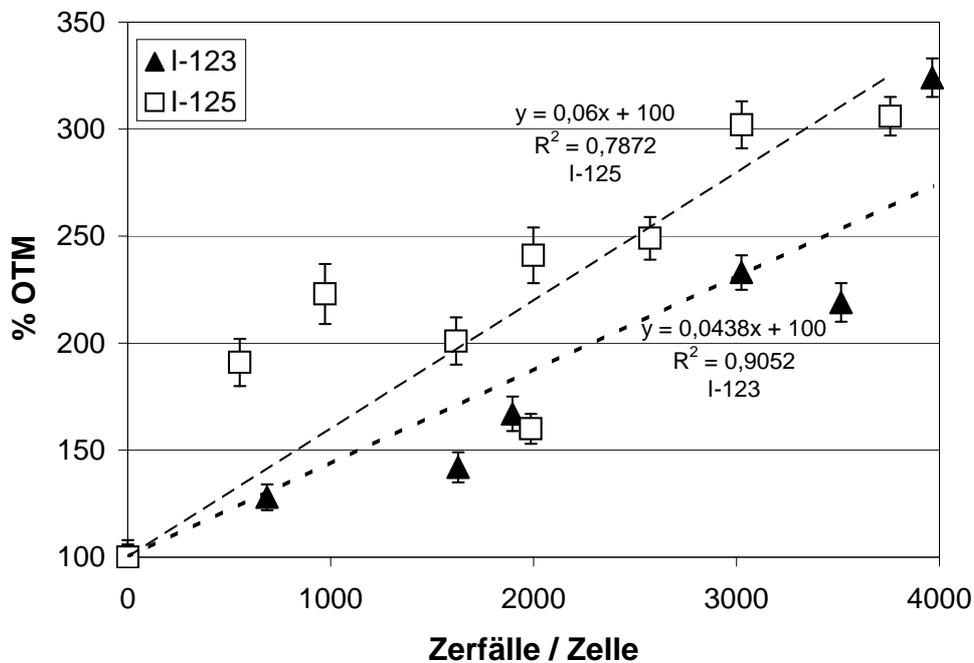


Abbildung 9: Olive-Tail-Momente (OTM) als Funktion akkumulierter ^{123}I - bzw. ^{125}I -Zerfälle/Zelle nach Inkorporation von ^{123}I UDR bzw. ^{125}I UDR in die zelluläre DNA menschlicher Nieren-T1-Zellen, bezogen auf 100% der unbestrahlten Kontrollprobe ($n = 200 \pm \text{SEM}$)

Dosisabhängigkeit. Die Werte lagen bei ^{125}I durchschnittlich bei 21,4 und bei ^{123}I durchschnittlich bei 19,5. Auch der zweite Wert, der das OTM beeinflusst, der prozentuale Anteil der DNA im Schweif, zeigte keinen nuklidabhängigen Unterschied. Er war dosisabhängig, was durch steigende Fluoreszenzwerte der DNA im Schweif deutlich wurde. Das entspricht der zunehmenden Anzahl an DNA-Bruchstücken als Funktion steigender Nuklidzerfälle.

Bei der Betrachtung aller Einzelwerte wurde der für die Schweiflänge der Kometen bestimmte Wert nicht in die Berechnung des OTM's mit einbezogen. Gerade bei der Beurteilung dieses Wertes bei vergleichbaren Iodnuklid-Zerfällen pro Zelle ergaben sich deutliche Differenzen zugunsten der Schweiflänge nach $^{125}\text{IUdR}$ -Inkorporation. Die Schweiflängen der ^{125}I -Kometen waren wesentlich grösser als die von ^{123}I . Bei 1618 d/c für ^{125}I und 1628 d/c für ^{123}I wurde ein Verhältnis von 21,79 zu 6,65 = 3,3 und bei 3026 d/c für ^{125}I und 3024 d/c für ^{123}I von 17,01 zu 8,7 = 2,0. Die Länge des Schweifes ist ein Indiz dafür, wie stark die DNA geschädigt wurde. Anhand dieser beiden Wertepaare kann festgestellt werden, dass ^{125}I gegenüber ^{123}I eine wesentlich höhere Schädigung der zellulären DNA erzeugte, als es durch die Auswertung des OTM's deutlich wurde. Da die Daten für die Schweiflängen jedoch bei anderen akkumulierten Zerfällen pro Zelle auf keine eindeutige Dosisabhängigkeit schließen ließen, muss die Beobachtung der strahleninduzierten Schweifvergrößerung als Maß für steigende DNA-Schäden mit der gebotenen Vorsicht betrachtet werden.

Um ausschließen zu können, dass unterschiedliche Handhabungen der Einzelversuche oder verschiedene Zellansätze der Grund für die Unterschiede waren, wurde zusätzlich ein Versuch mit $^{123}\text{IUdR}$ und $^{125}\text{IUdR}$ parallel mit derselben Zellsuspension und unter identischen Bedingungen zeitgleich durchgeführt. Auch hier ergab sich, wie vorher schon ermittelt, dass $^{125}\text{IUdR}$ ei-

ne größere Schädigung in der DNA hervorruft als $^{123}\text{IUdR}$, und zwar signifikant unterschiedlich. Bei einem Freiheitsgrad von 2 und einer zweiseitigen Betrachtung ergab der Tabellenwert 9,925 für eine 99%ige Signifikanz und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von nur 1% [Sac86]. Somit wurde festgestellt, dass die Ergebnisse nicht von der Passage der Zellkultur abhängig waren. Die Zellkultur zeigte also im Laufe der gesamten Versuchszeit keine Veränderung in Bezug auf die Inkorporation und die Schädigung der DNA durch die beiden $^{123/125}\text{IUdR}$ -Aktivitäten.

Desweiteren wurden bei diesem Einzelversuch ebenfalls die Kometen-Sweiflängen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die durch $^{125}\text{IUdR}$ erzeugten länger waren als die durch $^{123}\text{IUdR}$ hervorgerufenen. Ein direkter Vergleich zweier Wertepaare war aufgrund von unterschiedlichen Zerfällen pro Zelle nicht möglich. Dies bestätigten die TUNEL-Untersuchungen, bei denen $^{125}\text{IUdR}$ mehr und kleinere Bruchstücke verursachte (siehe TUNEL-Daten). Basierend auf allen OTM-Ergebnissen scheint der COMET-Assay für die Aussage geeignet zu sein, dass ^{125}I als $^{125}\text{IUdR}$, covalent in der DNA eingebunden, eine größere Schädigung des DNA-Moleküls verursacht als ^{123}I .

3.3.5 Mikronuklei-Assay

Der Mikronuklei-Test als quantitatives Maß von Schädigungen der zellulären DNA durch inkorporierte $^{123/125}\text{I}$ -IUdR wurde hier nach sorgfältiger Anpassung an die experimentellen Erfordernisse benutzt. Jeweils 500 binukleierte Zellen wurden in drei unabhängigen Versuchen auf ihre Mikrokernbildung in Abhängigkeit steigender Iodnuklid-Konzentrationen getestet. Das Ergebnis dokumentieren die zwei übereinanderliegenden Kurven in Abbildung 10.

Die hinter der Bildung der Mikronuklei stehenden molekular-biologischen Prozesse sind weitgehend unklar. Als Konsequenz

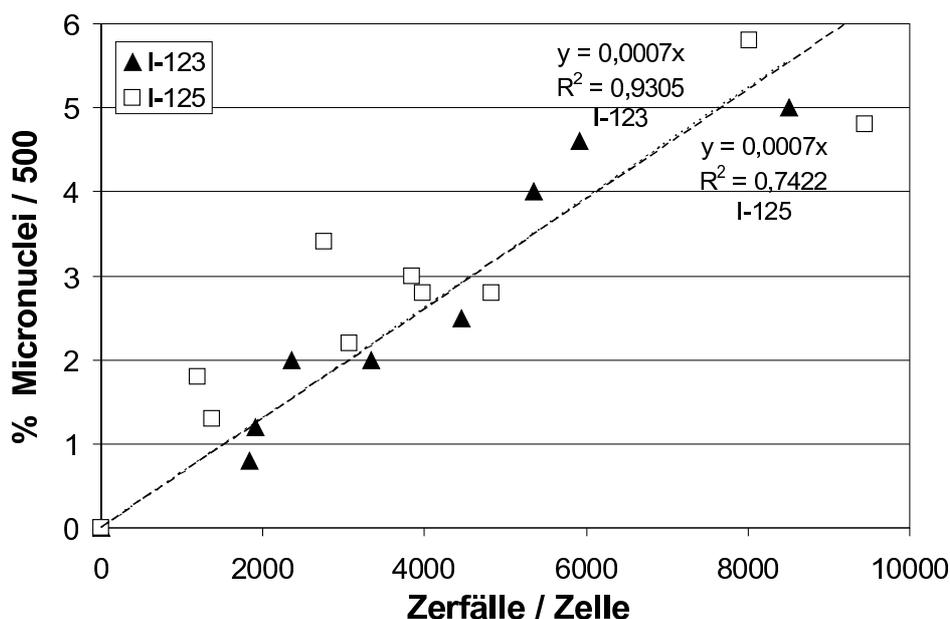


Abbildung 10: Prozentualer Anteil der Mikrokerne in 500 binukleierten Zellen als Funktion akkumulierter ^{123}I - bzw. ^{125}I -Zerfälle nach Inkorporation von $^{123}\text{IUdR}$ bzw. $^{125}\text{IUdR}$ in die zelluläre DNA menschlicher Nieren-T1-Zellen

dieser Prozesse steht die Ausschleusung der geschädigten DNA aus dem Kern der betroffenen strahlenexponierten Zelle. Somit kann der Mikronuklei-Assay als ein Maß für den kumulativen Effekt nach z.B. cytotoxischer Wirkung der ^{123}I - bzw. ^{125}I -Zerfälle betrachtet werden. Abbildung 10 dokumentiert eine lineare Abhängigkeit der Mikronuklei-Bildung mit steigenden Zerfallzahlen. Allerdings wurde hier kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Iodisotopen festgestellt. Dieses gilt zumindest für den Bereich von 0 - 9000 Zerfälle/Zelle 30 h nach der Inkorporation und Inkubation.

3.3.6 Zellzyklusverteilung

Die Analyse von Zellzyklusdaten kann einen Hinweis auf die biologische Strahlenschädigung geben, da der Zellzyklus strahlenabhängig ist, d.h. je nach Strahlenart können Verzögerungen auftreten, die sich auf die einzelnen Phasen unterschiedlich auswirken. So kann es z.B. während des Durchlaufens des Zellzyklus zu einem Auflaufen der Zellen in der G_2 -Phase kommen

(„ G_2 -Block“). Damit wird den geschädigten Zellen Zeit für eine Reparatur gegeben, bevor sie in die Teilungsphase übergehen. Das bedeutet, je mehr Zellen geschädigt wurden, desto größer ist ihre Anzahl in der G_2 -Phase.

Die graphische Darstellung der Zellzyklusphasenverteilung ergab einen aus drei Peaks bestehenden Verlauf, wobei der erste Peak die Anzahl der Zellen in der G_0/G_1 -Phase und der zweite Peak die in der G_2/M -Phase repräsentiert. Zwischen beiden Peaks liegen die Zellen, die zur S-Phase gehören. Der dritte Peak repräsentiert den Anteil an tetraploiden (T) Zellen. Messungen nach Exposition durch inkorporiertes ^{123}I bzw. ^{125}I ergaben, dass 54 und 78 Stunden nach Bestrahlungsende ^{123}I gegenüber der Kontrollverteilung (hier nicht gezeigt) eine Zunahme des prozentualen G_2/M -Phasenanteils von 30 auf 55% und von 22 auf 55% bzw. ^{125}I eine Zunahme von 32 auf 36% bzw. von 31 auf 53% bewirkte (siehe Abbildungen 11 und 12). Das weist darauf hin, dass bei den mit ^{123}I behandelten Zellen ($n = 3$) es zu einer deutlichen G_2 -Blockade nach 54 Stunden kommt. Im Gegensatz dazu verur-

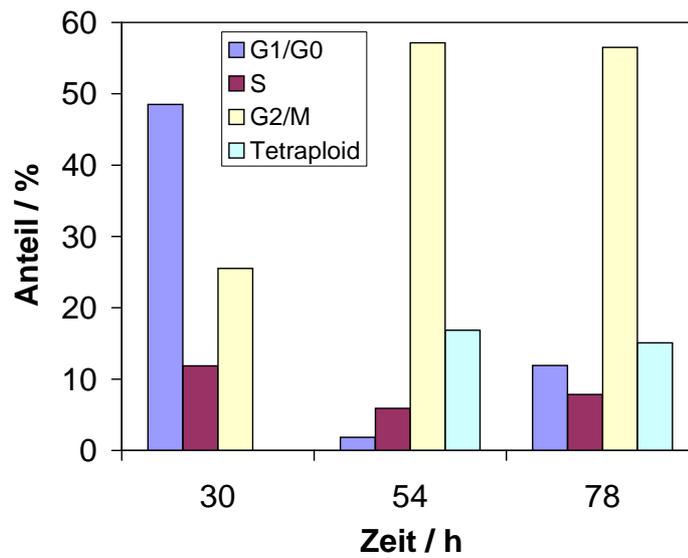


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen nach Inkorporation von ¹²³IUdR in die DNA

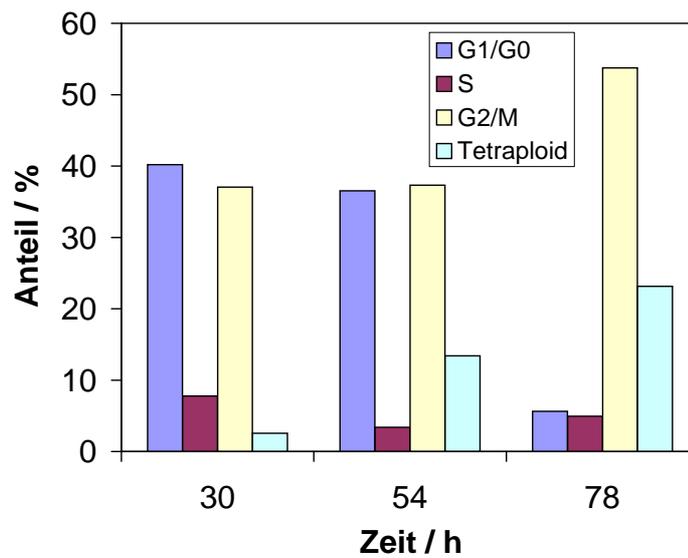


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen nach Inkorporation von ¹²⁵IUdR in die DNA

Tabelle 3: Anzahl der Zerfälle/Zelle (d/c), die nach jeweils 30, 54 und 78 h in den mit ¹²³I- und ¹²⁵IUdR behandelten Nieren-T1-Zellen akkumuliert worden sind

Nuklid	d/c	d/c	d/c
	nach 30 h	nach 54 h	nach 78 h
¹²³ IUdR	1976	3027	3378
¹²⁵ IUdR	3097	6493	10180

sacht ^{125}I eine vergleichbare Reaktion erst nach 78 Stunden, woraus geschlossen werden kann, dass die durch ^{123}I belasteten Zellen sich offensichtlich eher und in größerer Anzahl zwecks eventueller Reparatur in der G₂-Phase ansammeln.

Die Beurteilung des oben erwähnten Vergleichs der Zellzyklusverteilungsmuster nach Exposition mit ^{123}I und ^{125}I berücksichtigt nur die gleiche Inkubationszeit von 54 Stunden und nicht die in dieser Zeit akkumulierten Nuklidzerfälle (siehe Tab. 3), die für ^{123}I 3027 d/c und für ^{125}I dagegen 6493 d/c betragen. Trotzdem scheint ein Unterschied in den biologischen Wirkungen erkennbar zu sein. Zukünftige Untersuchungen sollten darauf achten, dass diese Diskrepanz vermieden wird und für beide Nuklide möglichst die gleiche Anzahl an Zerfällen pro Zelle berücksichtigt wird.

3.4 Schlussfolgerung

Hinsichtlich der Aussagekraft der hier vorgestellten Methoden ist darauf hinzuweisen, dass zwar sowohl COMET- als auch TUNEL-Assay eine DNA-Schädigung detektieren, die vor allem auf strahleninduzierten Strangbrüchen beruht, dass aber auch die enzymatische Zerstörung der DNA (als der Endpunkt der Apoptose) berücksichtigt werden muss.

Den mikroskopischen Untersuchungen nach zu urteilen erleiden die mit ^{125}I inkorporierten Zellen vorwiegend den nekrotischen Tod, während die mit ^{123}I behandelten eher dem physiologischen Absterben der Apoptose unterliegen. Die beiden Iodisotope, eingebaut als $^{123}\text{IUdR}$ bzw. $^{125}\text{IUdR}$ in die zelluläre DNA, bewirken somit unterschiedliche biologische Reaktionen.

Diese Ergebnisse werden zumindest in ihrer qualitativen Aussage durch die Untersuchungen bestätigt, die sowohl die Gesamt-Caspaseaktivität als auch die Aktivitäten der einzelnen Caspasen im Bereich bis 5000

bzw. 6000 Zerfälle pro Zelle betrachten.

Während ^{125}I die durch vorwiegend extrinsische Faktoren ausgelöste Caspase-2 aktiviert, scheint ^{123}I eine stärkere Aktivierung intrinsischer Caspasen auszulösen, wie z.B. Caspase-9. Das bedeutet für die v.a. durch ^{125}I -Zerfälle induzierte Nekrose, dass hier ein relativ hoher DNA-Schaden erzeugt werden muß, um die intrinsisch ausgelöste Apoptose stärker zu hemmen, als das bei ^{123}I durch die zusätzliche Caspase-9-Aktivierung der Fall ist.

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine Zelle nur dann den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten kann, wenn möglichst wenig nekrotisch zerstörte DNA vorliegt. Dieses durch Einbau von ^{125}I sich ergebende Schadensbild schließt allerdings nicht aus, dass diese geschädigten Zellen Botenstoffe freisetzen können, die wiederum die für die Apoptose wichtigen Rezeptoren benachbarter Zellen anregen, und somit die Aktivierung von membrangebundenen Caspasen (z.B. Caspase-2) bewirken. Eine auf diesem Wege ausgelöste Reaktion sollte in einer noch funktionierenden Zelle schließlich die Caspase-3 triggern, die endgültig die Zelle in die Apoptose führt.

Generell ist zu bemerken, dass sowohl die Funktion als auch der detaillierte Mechanismus von Caspase-2 noch unklar sind [Bon06, Cer03]. Auf Grund dieser Tatsache sind obige Schlussfolgerungen solange als nicht abschließende Interpretationen zu betrachten, als nicht wesentlich mehr experimentelle Daten vorliegen. Wie auch aus den Abbildungen 6 und 7 ersichtlich, ist der Anstieg der Caspase-3 nach Einbau von ^{123}I stärker ausgeprägt als nach ^{125}I -Einbau.

Aus dem Vergleich der beiden Isotope mittels TUNEL-Assay können nur begrenzt Rückschlüsse gezogen werden. Bis zu 1000 Zerfällen/Zelle scheint eine lineare Abhängigkeit zwischen den steigenden Zerfällen/Zelle und dem Fluoreszenzsignal bei beiden Nukliden vorhanden zu sein. In

diesem Abschnitt ist die Schädigung der DNA durch ^{125}I größer als durch ^{123}I .

Mit dem COMET-Assay konnte eine stärkere Schädigung der DNA infolge von ^{125}I -Zerfällen gegenüber denen von ^{123}I gesehen werden. Die Steigung lag für ^{125}I bei 0,06, wohingegen bei ^{123}I nur eine Steigung von 0,04 vorlag. Diese Unterschiede konnten allerdings nicht auf dem 95%-Signifikanzniveau statistisch bestätigt werden, obwohl die Tendenz bei allen durchgeführten Versuchen ($n = 4 - 5$) auf eine größere Schädigung nach ^{125}I gegenüber ^{123}I -Behandlung hinwies. Diese Ergebnisse bestätigen die aus dem TUNEL-Assay gewonnenen Aussagen, allerdings ist die COMET- gegenüber der TUNEL-Methode hier eindeutiger und robuster. Die tendenziell größere Schädigung der DNA nach ^{125}I UdR-Inkorporation kann in der doppelten Anzahl an emittierten Auger-Elektronen pro ^{125}I -Zerfall begründet sein. Da bei beiden Nukliden apoptotische Vorgänge eine Rolle spielen und diese bei dem ^{123}I ausgeprägter sind, wird der hierdurch gemessene Unterschied offensichtlich verringert. Gerade deshalb, weil ^{123}I weniger Auger-Elektronen pro Zerfall produziert und die DNA nicht zu stark schädigt, sind die angeregten apoptotischen Reaktionen in der Lage, die Zerstörung der DNA auf enzymatischen Wegen zu unterstützen.

Abschließend ist festzuhalten, dass unter physiologischen Bedingungen, einer gleichen Anzahl an akkumulierten Zerfällen/Zelle und in einem Zeitfenster bis zu 30 Stunden der schädigende Effekt von ^{123}I insgesamt auf die Zelle nicht signifikant unterschiedlich von dem des ^{125}I ist. Allerdings kann wohl zwischen den molekularen Reaktionen im einzelnen unterschieden werden. Während ^{125}I hauptsächlich physikalisch die DNA schädigt und dabei eine ausgeprägte Apoptose nicht zulässt, wirkt ^{123}I synergistisch unter Anwendung der apoptotischen Reaktionssabläufe und leitet dabei einen eher deterministischen Tod der Zelle ein. Aufgrund seiner relativen Kurzlebig-

keit und des eher physiologischen Vernichtens der Zellen empfiehlt sich ^{123}I als geeigneter zum Einsatz in z.B. zeitlich beschränkten Radiotherapien und weist zusätzlich auf eine bessere Strahlenhygiene hin.

4 Modell-theoretische Untersuchungen

4.1 Einleitung

Der starke biologische Effekt, den DNA-inkorporiertes ^{125}I hervorruft, wird im Wesentlichen der Lawine niederenergetischer, kurzreichweitiger Auger-Elektronen zugeschrieben, die während des Iod-Zerfalls emittiert werden. Seit den ersten Versuchen, den Schadensmechanismus zu erklären, wird jedoch auch die Möglichkeit einer Coulomb-Explosion - zusätzlich zu den Auger-Elektronen - in Erwägung gezogen [Fei71, Hof71, Bur73, Bra75]. Ein solcher Mechanismus wurde von Carlson und White [Car63] vorgeschlagen. Diese Autoren bestrahlten kleine Iod-markierte Moleküle (CH_3I and $\text{C}_2\text{H}_5\text{I}$) mit Röntgenstrahlen geeigneter Energie (8.0 keV), um das Iodatome in seiner L-Schale zu ionisieren. Solch eine Vakanz in einer inneren Schale bewirkt in gleicher Weise eine Elektronen-Kaskade, wie sie durch Elektronen-Einfang im Falle des instabilen ^{125}I hervorgerufen wird. In einem zweiten Experiment [Car66] wurden die radioaktiv-markierten Moleküle $\text{CH}_3^{125}\text{I}$ und $\text{C}_2\text{H}_5^{125}\text{I}$ untersucht. Die gemessenen Verteilungen der Ionenfragmente und Rückstoß-Energien in beiden Experimenten erlauben den Schluss, dass alle beteiligten Atome ionisiert und das Molekül durch eine Coulomb-Explosion fragmentiert wurde. Monte-Carlo-Simulationen des ^{125}I -Zerfalls zur Generierung von Elektronen-Emissionsspektren zeigten, dass die Auger-Übergangskaskade ein mehrfach ionisiertes Atom mit einer potentiellen Energie von etwa 1 keV [Pom87] zurücklässt.

Im Falle von DNA-gebundenem ^{125}I in Form von $^{125}\text{IUdR}$ (s. Abb. 2) wurde angenommen, dass das ionisierte Tochternuklid ^{125}Te durch Elektronen aus der Umgebung neutralisiert wird. Hierbei ist es jedoch völlig offen, ob diese Elektronen aus dem die DNA umgebenden Wasser stammen oder

aus den DNA-Basen, z.B. aus dem Thymin, in das das $^{125}\text{I}/^{125}\text{Te}$ eingebaut ist. Aus ersten Molekular-Model-Berechnungen zur Abschätzung der Thymin-Stabilität mit wachsender Ladung [Pom00] ergab sich keine stabile Geometrie für $^{125}\text{TeUdR}$ mit einer Ladung größer $+5e$. Darüber hinaus wurde kürzlich demonstriert, dass neben direkten und indirekten Strahleneffekten eine dritte, nicht-strahlungsbedingte Komponente eine signifikante Rolle bei der Strangbruch-Induktion spielt. Als diese Komponente wird die Ladungs-Neutralisation vermutet [Lob00].

In diesem Zusammenhang ist die Zeitskala des Zerfallsprozesses wie auch des Ladungstransfers innerhalb der DNA ein entscheidender Parameter. Der ^{125}I -Zerfall ist ein Zwei-Stufen-Prozess, der über einen kurzlebigen Zwischenzustand zum ^{125}Te -Grundzustand führt. Die erste Übergangskaskade wird durch Elektronen-Einfang initiiert. Diese Kaskade läuft in ungefähr 10^{-16} bis 10^{-14} s ab, und das Molekül sieht sich schlagartig mit einer Ladung von im Mittel $+7e$ (bei einer Streuung zwischen $+1e$ und $+15e$) konfrontiert (s. Abb. 13). Neutralisationen innerhalb der DNA sind möglich über Elektronentransfer innerhalb des π -Elektronen-Systems oder durch Hopping-Prozesse (siehe z.B. [Jor98, Gie00]). Der schnellste Ladungstransfer jedoch benötigt wenigstens ungefähr 10^{-12} s [Wan99]. Bereits in der ersten Monte-Carlo-Simulation des ^{125}I -Zerfalls wiesen Charlton und Booz [Cha81] darauf hin, dass eine Neutralisation während der Kaskade physikalisch nur schwer erklärbar sei, da ein ultraschneller Ladungstransfer existieren müsste. Der Zwischenzustand besitzt eine ausreichend lange Lebensdauer ($1.6 \cdot 10^{-9}$ s), um einen intramolekularen Ladungstransfer zu ermöglichen. Der zweite Zerfallsschritt beginnt somit bei diesem Zustand in einem neutralen Atom. Dabei finden im Prinzip dieselben Übergänge statt wie beim ersten Schritt, diesmal ausgelöst durch interne Konversion. In dieser Untersuchung

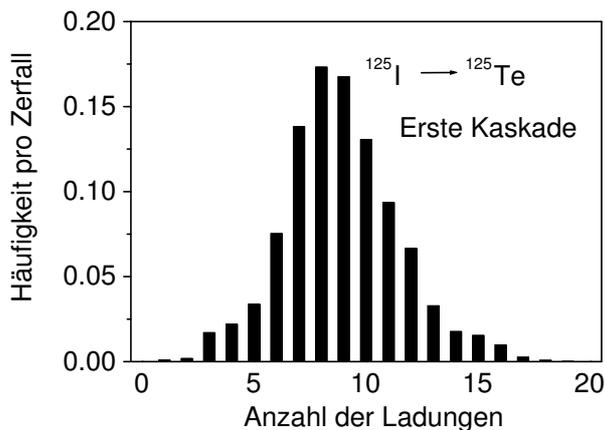


Abbildung 13: Ladungsverteilung nach der ersten Auger-Kaskade beim ^{125}I -Zerfall (Daten aus einer retrospektiven Analyse einer früheren Studie [Pom00])

soll der Ladungstransfer-Prozess innerhalb des Thymin-Moleküls am Ende der ersten Übergangskaskade im ^{125}Te näher betrachtet werden, um stabile Molekülkonfigurationen und deren Energieverhältnisse zu identifizieren. Eine Gesamtschau dieser Aspekte sollte eine näherungsweise Abschätzung erlauben, ob eine Coulomb-Explosion als zusätzlicher Schadensmechanismus beim Zerfall DNA-gebundenen ^{125}I unterstellt werden muss.

4.2 Methode

Es wurden Berechnungen für drei Fälle mit semi-empirischen quantenmechanischen Methoden auf dem PM3-Niveau mittels des Molecular Modelling Systems HyperChemTM, Version 6.0 [Hyp94, Ste89a, Ste89b] durchgeführt: isolierte Thymin-Base, $^{125}\text{IUdR}$ und $^{125}\text{TeUdR}$. Zunächst wurden die Konfiguration und die Elektronenverteilung der ungestörten Struktur der Thymin-Base berechnet und dann als Referenzsystem benutzt. Anschließend wurde die CH_3 -Gruppe des Thymins ersetzt durch neutrales Iod und Te^{n+} , wobei $n=0, \dots, 5$.

Die Rechenprozedur fand in zwei Schritten statt: im ersten wurde eine Geometrie-Optimierung des Moleküls vorgenommen, wobei eine Polak-Ribière-konjugierte Gradienten-Methode benutzt wurde [Pre92]. Das Ergebnis dieser Berechnung ist eine molekulare Konfiguration, bei der keine resultierende Kraft auf die Atome übrigbleibt. Diese Geometrie-Optimierung erfolgte auch auf einem semi-empirischen Niveau, das eine selbst-konsistente Neuverteilung der Ladungen entsprechend den neuen Atompositionen ermöglicht. Die Abbruch-Bedingung wurde auf $E \leq 0.1$ kcal/Åmol gesetzt.

Die Geometrie-Optimierung mag als Berechnung des Grundzustandes des Systems betrachtet werden ohne Störung durch thermische Fluktuationen. Um die Stabilität des Systems gegenüber thermischen Fluktuationen zu testen, bestand der zweite Teil der Rechenprozedur in der Durchführung einer molekular-dynamischen Simulation. Hierzu wurde ebenfalls eine semi-empirische Methode benutzt, die Fluktuationen und Neuverteilungen von Partialladungen auf den Ladungszentren berücksichtigt. Um das System vom Grundzustand in einen thermisch angeregten Zustand zu überführen, ohne es aus dem Gleichgewicht zu bringen, wurde die Temperatur schrittweise erhöht, beginnend bei $T=0\text{K}$ bis zu Raumtemperatur. Ein schwacher Kopplungs-Thermostat [Ber84] mit einer Kopplungskonstante von $\tau=0.1$ ps wurde benutzt. Die Aufheizzeit betrug 5 ps und die Gesamt-Trajektorienlänge 25 ps mit einem Integrationszeitschritt von $dt=0.1$ fs. Dieser kleine Zeitschritt war erforderlich, um die schnelle Wasserstoff-Dynamik und Ladungsneuverteilung zu berücksichtigen.

Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die semi-empirische Methode den Bruch chemischer Bindungen nicht adäquat beschreiben kann. Lediglich die Bildung unphysikalischer Strukturen kann beobachtet werden, die einen deutlichen Hinweis auf einen Bindungsbruch

oder die Zerstörung des Moleküls darstellen. Detailliertere Methoden, z.B. die Dichtefunktional-Theorie (DFT), sollen zukünftig angewandt werden.

Für die Bestimmung der Ionisationsverteilung nach der ersten Kaskade in ^{125}I wurde ein Monte-Carlo-Programm eingesetzt, das anderweitig detailliert beschrieben ist [Pom87, Pom00].

4.3 Ergebnisse und Diskussion

Stabilität der Konformation: Mit Methoden der Geometrie-Optimierung und der Molekular-Dynamik war es nicht möglich, eine stabile molekulare Struktur des IUdR / TeUdR mit einer Ladung größer $+4e$ zu finden. Ein weiterer Ladungsanstieg verursachte unphysikalische Strukturen, und die Rechnungen konvergierten nicht mehr. In einer früheren Studie [Pom00] wurde noch eine stabile Konfiguration mit einer Ladung $+5e$ gefunden. Dabei wurde jedoch nicht die Stabilität gegenüber thermischen Fluktuationen bei Raumtemperatur berücksichtigt, und es wurde keine Molekular-Dynamik-Simulation durchgeführt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden diese Einschränkungen aufgehoben und dynamische Effekte wurden berücksichtigt. Dennoch könnte man hier kritisieren, dass bei Raumtemperatur thermische Effekte möglicherweise unterschätzt werden, da die Temperatur des umgebenden IUdR-Mediums auf Grund der Energiedeposition der emittierten niederenergetischen Elektronen (10 - 50 eV) ansteigen wird. Diese Elektronen haben eine Reichweite von etwa 1 - 5 nm. Den größten Teil ihrer Energie verlieren sie jedoch durch Ionisationen der umgebenden Atome oder Moleküle und nur ein kleiner Teil wird in thermische Energie umgewandelt. Da intramolekulare Bindungsenergien des IUdR weit oberhalb der thermischen Energien liegen, spielt ein Anstieg der Umgebungstemperatur nur eine geringe Rolle für die hier interessierenden Prozesse. In den Fällen jedoch,

in denen die Bindungsenergien im Bereich der thermischen Energien liegen, d.h. in der Nähe des Punktes, an dem die Moleküle instabil werden, könnte ein Temperaturanstieg einen Molekülschaden auslösen. Somit müssen die hier dargestellten Ergebnisse als eine obere Grenze angesehen werden, d.h. realistischerweise kann ein Molekülschaden infolge Coulomb-Explosion bereits bei kleineren Ladungen eintreten.

Intramolekularer Ladungstransfer: Einen ersten Einblick in Ladungstransfer-Mechanismen auf semi-empirischer Basis erlauben die Ergebnisse der Molekular-Dynamik-Studien, dargestellt in den Abbildungen 14 und 15. Für das neutrale $^{125}\text{TeUdR}$ (molekulare Ladung = 0) ist die partielle Ladung der meisten Atome leicht positiv ohne große Unterschiede, lediglich das C_5 -Atom und die Sauerstoffatome O_2 und O_4 sind negativ. Ein schrittweiser Anstieg der molekularen Ladung infolge des initialen Ladungsanstiegs auf dem Telluratome - entsprechend der Emission der Auger-Elektronen - führt zu keiner gleichmäßigen Veränderung der atomaren Partialladungen aller Atome. Ein leichter Ladungsanstieg ist für die Atome N_1 , N_3 , C_5 und O_2 zu erkennen. Der größte Teil der induzierten Ladung bleibt jedoch auf dem Te^{n+} -Ion. Beispielsweise bleibt von einer Ladung von $+3e$ auf dem Te eine Partialladung von mehr als $+1,5e$ auf dem Te und von einer Ladung von $+4e$ mehr als $+2e$. Dabei ist zu berücksichtigen, dass innerhalb dieses molekularen Systems Iod und Tellur die Atome mit einem extrem hohen Z sind, verglichen mit den anderen Atomen.

Der Ladungsanstieg bei N_1 und N_3 steht in Übereinstimmung mit einer anderen Beobachtung. Bei einer Ladung von $+5e$ wachsen die Bindungslängen zwischen N_1 und C_6 sowie zwischen N_3 und C_4 entsprechend den größer werdenden abstoßenden Kräften zwischen diesen Bindungspartnern. Der Bruch dieser beiden Bindungen scheint verantwortlich für die Explosion des isolierten $^{125}\text{IUdR}$ Moleküls.

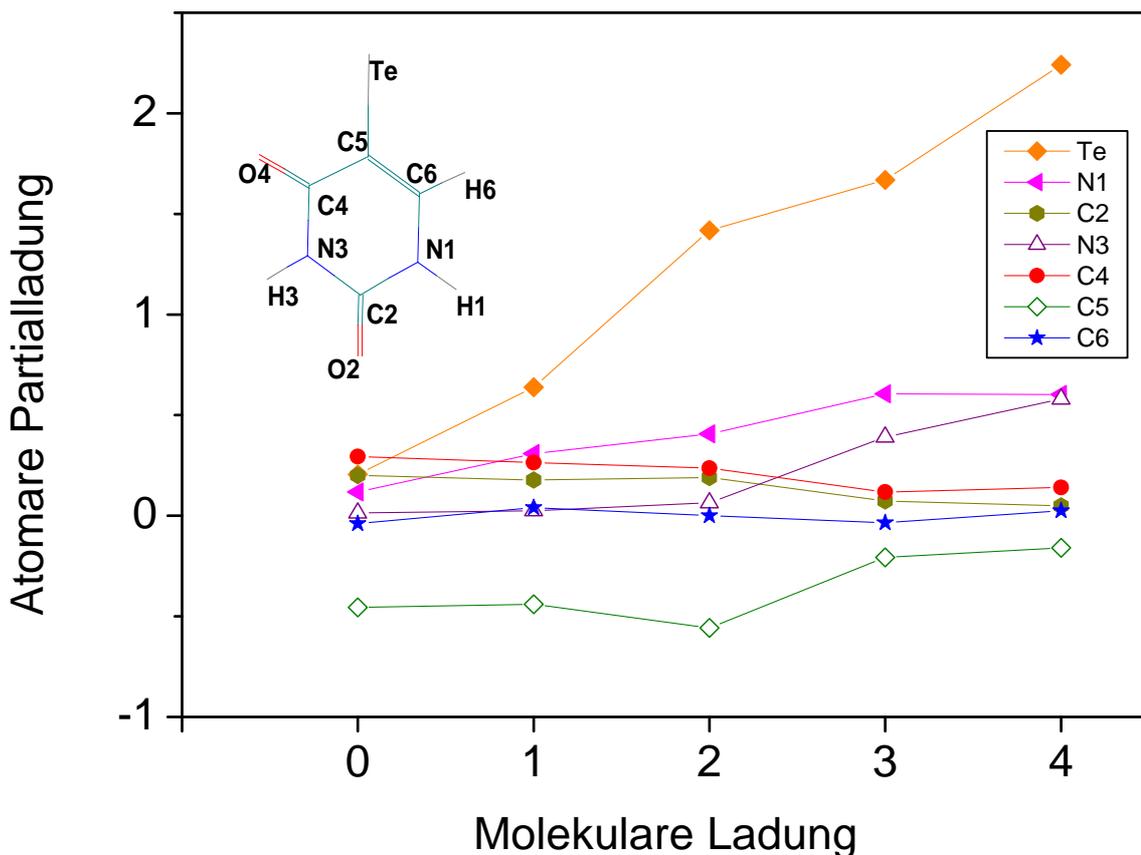


Abbildung 14: Partialladungen innerhalb $^{125}\text{TeUdR}$ (Atome des inneren Ringes) als Funktion wachsender molekularer Gesamtladung infolge Auger-Elektronen-Emission nach $^{125}\text{I}/^{125}\text{Te}$ -Zerfall, zum Vergleich sind die Partialladungen von ^{125}Te angegeben.

Energiebetrachtungen: Die gesamte molekulare Bindungsenergie als Funktion wachsender Ladung (s. Abb. 16, oben) zeigt, dass diese Energie bei $+4e$ positiv wird. Üblicherweise entspricht dies einem Übergang von einem gebundenen zu einem nicht-gebundenen Zustand. Mit anderen Worten: das Molekül beginnt auseinanderzubrechen. Betrachtet man die gesamte potentielle Energie, so ist zu erkennen, dass die isolierte Atomkonfiguration energetisch bevorzugt wird gegenüber einer gebundenen molekularen Konfiguration. Bei einer Ladung von $+5e$ ist die Bindungsenergie definitiv positiv, d.h. eine Bindung ist nicht möglich.

Während die absoluten Werte der Gesamtenergie weniger bedeutungsvoll sind, können die Ionisationspotentiale aus den Differenzen zwischen den Werten für das neutrale Te-markierte Thymin und den Werten für

die Konfigurationen mit ansteigenden Ladungen abgeleitet werden. Diese Differenzen werden in Tabelle 4 wiedergegeben und mit Ionisationspotentialen für atomares Tellur verglichen. Das Ionisationspotential des TeUdR steigt erkennbar stärker als das des atomaren Tellurs aufgrund der Tatsache, dass die ersten Ionisationspotentiale der anderen Atome im Molekül etwa 20% - 40% größer sind als das Tellur-Potential (H: 13.6 eV; O: 13.6 eV; N: 14.5 eV and C: 11.2 eV, [Lid01]), was in einer stärkeren Bindung der Elektronen in der molekularen Struktur gegenüber dem isolierten Tellur resultiert.

Aus der Verteilung der Ladungszahlen im Tellur nach der ersten Kaskade (s. Abb. 13) kann der Anteil der Zerfälle geschätzt werden, der die kritische Ladung von $+4e$ übersteigt, die hier als Auslöser einer Coulomb-Explosion gefunden wurde. Selbst bei Be-

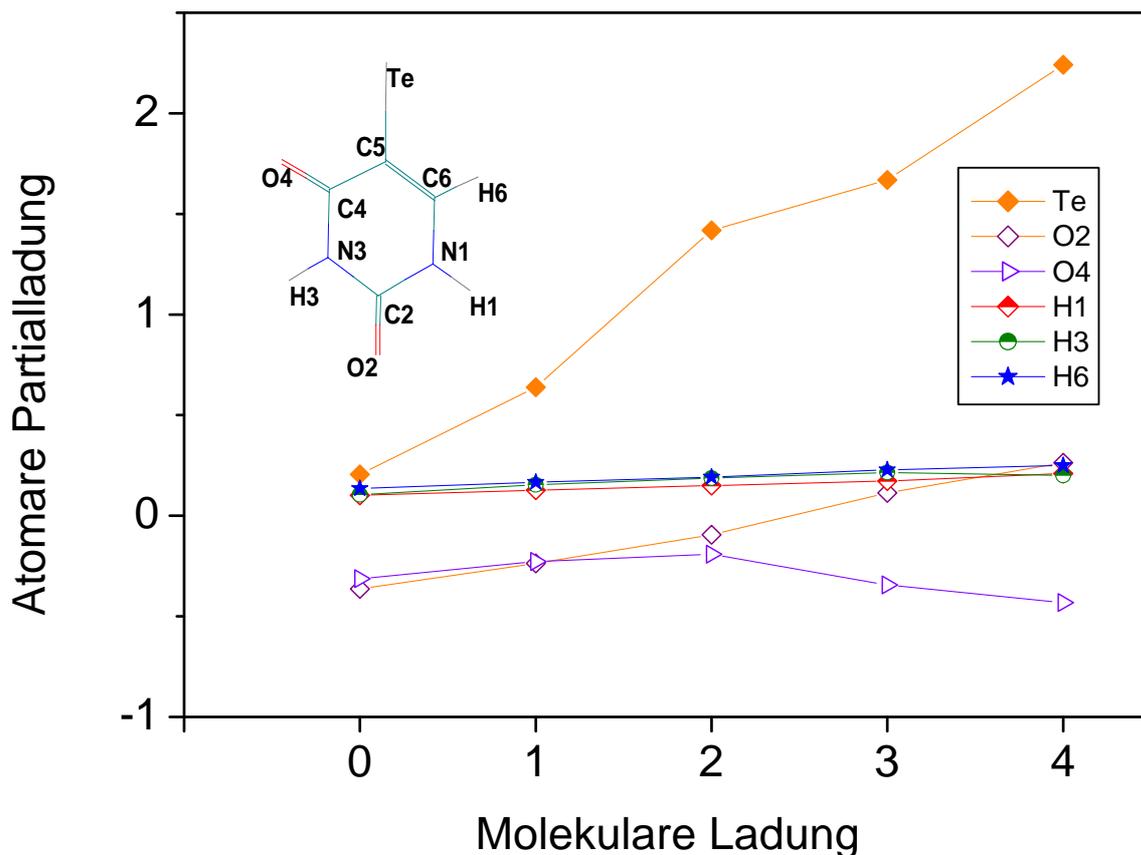


Abbildung 15: Partialladungen innerhalb $^{125}\text{TeUdR}$ (Satellitenatome) als Funktion wachsender molekularer Gesamtladung infolge Auger-Elektronen-Emission nach $^{125}\text{I}/^{125}\text{Te}$ -Zerfall

Tabelle 4: Ionisationspotentiale von atomarem Tellur [Lid01] und TeUdR

Ionisationsstufe	Atomares Tellur (eV)	TeUdR (eV)
1	9,0	8,23
2	18,6	20,85
3	27,96	38,32
4	37,41	61,09

trachtung lediglich der ersten Kaskade ist bei 98% aller Zerfälle die Ladung größer als +5e, so dass von einem zerstörten Thymin-Molekül ausgegangen werden muss, bevor die zweite Auger-Kaskade beginnt.

4.4 Schlussfolgerung

Nach den hier gefundenen Ergebnissen ist von einer Coulomb-Explosion des $^{125}\text{IUdR}$ auszugehen aufgrund der abstoßenden Ladungen, die sich infolge der Elektronen-Emission ergeben. Nahezu jeder Zerfall zerstört das Molekül nach der ersten Auger-Kaskade, die durch Elektronen-Einfang initiiert wird. Das bedeutet gleichzeitig, dass das zerfallende ^{125}Te nicht notwendigerweise an derselben lokalen Position wiederzufinden ist, wenn die zweite Kaskade aufgrund innerer Konversion einsetzt.

Eine ganz andere Frage ist, welche Art von Schaden ursächlich mit einer zerstörten Thyminbase einhergeht. Ist nur die Base selbst betroffen oder induziert dieser Schaden einen Einzel- oder sogar einen Doppelstrangbruch? Lobochevsky und Martin [Lob00] haben ^{125}I -Zerfälle in synthetischen

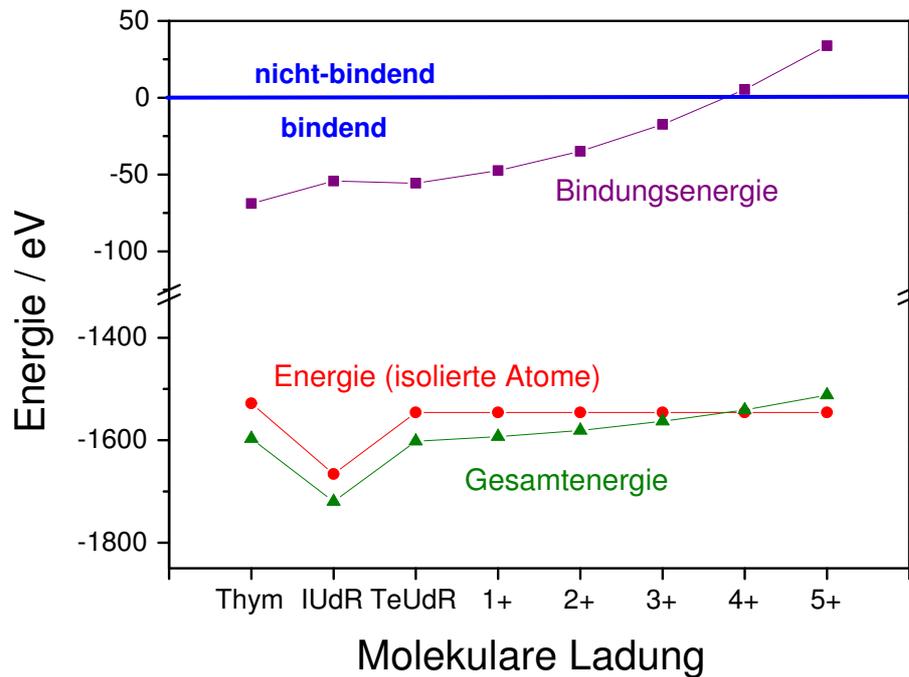


Abbildung 16: Energieverhältnisse in Thymin, IUdR und TeUdR mit steigender Ladung

Oligodeoxynukleotiden untersucht und vorgeschlagen, dass ungefähr 50% der ^{125}I -induzierten Einzelstrangbrüche durch eine strahlungslose Komponente infolge positiver Ladungen auf dem Tochteratom verursacht werden. Weiterhin sollen diese Brüche hauptsächlich innerhalb von 4 - 5 Nukleotiden von der ^{125}I -Position stattfinden, während die Strahlungskomponente bei Entfernungen oberhalb von 8 - 9 Nukleotiden dominiert. Energiedepositionsberechnungen [Cha86; Pom91] haben jedoch gezeigt, dass bei Distanzen von mehr als 4 - 5 Nukleotiden vom Zerfallsort die deponierte Energie signifikant kleiner ist als in der unmittelbaren Umgebung des zerfallenden ^{125}I . Dieser offensichtliche Widerspruch kann nur durch die Annahme aufgelöst werden, dass die Energie auf dem geladenen Telluratome von im Mittel etwa 1 keV pro Zerfall [Pom87] lokal deponiert und zur Ionisation und Anregung der Atome des Muttermoleküls verwendet wird anstatt eine Coulomb-Explosion auszulösen.

Darüber hinaus wird mit dieser Energie ein DNA-Schaden mit ähnlicher Effizienz induziert wie durch die Energiedeposition infolge der Auger-Elektronen [Lob00]. Bis zu welchem Ausmaß und durch welche Mechanismen eine Basenschädigung als Konsequenz einer Coulomb-Explosion einen Strangbruch verursacht, ist unbekannt. In jedem Fall muss die Coulomb-Explosion als ein schwerwiegender Effekt angesehen werden, der zusätzlich zur Schädigung durch die Auger-Elektronen auftritt und diese verstärkt, zumindest in isolierter DNA.

Es ist offensichtlich, dass weitergehende und profundere Rechnungen durchgeführt werden müssen. Insbesondere sollte der Ladungstransfer nicht auf das Thymin-Molekül beschränkt bleiben. Auch die Phosphat-Zucker-Gruppe und die korrespondierenden Nukleotide des komplementären DNA-Stranges sollten in nachfolgende Untersuchungen eingeschlossen werden.

5 Zusammenfassung

Ursprüngliches Ziel dieses Forschungsvorhabens war es, die strahlenbiologische Toxizität zweier Auger-Elektronen-Emitter (^{123}I und ^{125}I) allein auf der Basis der jeweiligen Energiedosis zu quantifizieren. Diese Absicht gründete im wesentlichen auf folgenden Überlegungen: (1) Bei gleichem chemischen Verhalten der Auger-Emitter sollten Unterschiede in der biologischen Wirkung einzig auf die unterschiedliche Anzahl der pro Zerfall von beiden Isotopen emittierten Auger-Elektronen, und somit auf die Energiedosis, zurückzuführen sein. (2) Bisherige Überlebensexperimente zeigten eine stärkere Wirkung von ^{125}I gegenüber ^{123}I um etwa einen Faktor „2“, wie sie auch aus den jeweiligen Energiedosiswerten zu erwarten waren. (3) Dieser Faktor „2“ wurde auch bei Modellrechnungen zur Simulation von komplexen Doppelstrangbrüchen gefunden.

Statt der lediglich erwarteten quantitativen Unterschiede zwischen beiden Iodisotopen hinsichtlich der stahlentoxischen Effizienz zeigte sich aber, dass offensichtlich nicht die Dosis, sondern vielmehr die Dosisrate für Auswirkungen mit deutlichen qualitativen Unterschieden in den biologischen Reaktionen verantwortlich war. Die mit einer Reihe verschiedener Methoden z.T. erstmals mit Auger-Elektronen-Emittern durchgeführten Untersuchungen deuten u.a. darauf hin, dass DNA-inkorporiertes ^{123}I eher zu einem apoptotischen Absterben der Zellen führt, während der Zerfall von ^{125}I vorwiegend nekrotische Prozesse nach sich zieht. Ähnliche Resultate mit ebenfalls qualitativ unterschiedlichen biologischen Reaktionen nach ^{123}I - bzw. ^{125}I -Zerfall wurden in jüngster Zeit auch von anderen Gruppen publiziert [Ura04, Kis06].

In gleicher Weise ist auch die im theoretischen Teil dieses Vorhabens untersuchte Coulomb-Explosion einzustufen. Die mit semi-empirischen quantenmechanischen Methoden durchgeführten Berechnungen er-

gaben, dass nahezu jeder Zerfall eines ^{123}I - bzw. ^{125}I -Nuklides eine Coulomb-Explosion und damit die Zerstörung des IUDR-Moleküls bewirkt. Der dieser Explosion zugrunde liegende Mechanismus, für dessen Eintreten innerhalb der DNA es bisher keinen experimentellen Nachweis gibt, kann weder einer Strahlenwirkung zugeordnet werden, noch ist er dosisabhängig. Darüber hinaus ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt auch nicht klar, welchen molekular- bzw. zellbiologischen Schaden eine solche Explosion hervorruft.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich das bisherige Bild der Auger-Elektronen-Emitter in der Strahlenbiologie deutlich zu wandeln, in jedem Fall aber zu differenzieren beginnt. Die anfangs beabsichtigte, rein dosis-basierte Bestimmung von RBW-Werten ließ sich infolge der unerwarteten experimentellen Ergebnisse nicht realisieren. Angesichts der hier gefundenen qualitativ unterschiedlichen biologischen Reaktionen müssen derartig bestimmte RBW-Werte mit großem Vorbehalt gesehen werden. Zukünftige Arbeiten auf diesem Gebiet sollten daher die hier gefundenen Einzelergebnisse umfassender absichern sowie weitere Iodnuklide (^{124}I), aber auch Nuklide anderer Elemente systematisch untersuchen.

6 Summary

The original aim of this research project was to quantify the radiobiological toxicity of two Auger electron emitters (^{123}I and ^{125}I) solely on the basis of the respective absorbed dose. This intention was mainly founded on the following considerations: (1) If the Auger emitters have the same chemical behaviour, the differences in the biological effects should be attributable to the different number of Auger electrons emitted per decay by both isotopes, and therefore to the absorbed dose. (2) Data from previous survival experiments demonstrated a stronger effect of ^{125}I versus ^{123}I by about a factor of „2“, as was also expected from the absorbed dose values. (3) This factor of „2“ was also found in model calculations simulating complex double strand breaks.

Instead of simply revealing the expected quantitative differences between both iodine isotopes with regard to radiation toxicity, it also became obvious that it was not the dose but rather the dose rate that caused effects with clear qualitative differences in biological reactions. The investigations, which were performed using many different methods, partly for the first time with Auger electron emitters, suggest among other things that DNA-incorporated ^{123}I generally tends to cause apoptotic cell death, whereas the decay of ^{125}I leads predominantly to necrotic processes. Similar results with qualitatively different biological reactions after ^{123}I and ^{125}I decay were also recently published by other groups [Ura04, Kis06].

The Coulomb explosion, which was investigated in the theoretical part of this project, must be viewed in a similar manner. Calculations using semi-empirical quantum mechanical methods revealed that almost every decay of an ^{123}I or ^{125}I nuclide leads to a Coulomb explosion and thus to the destruction of the IUdR molecule. At the moment, there is no experimental evidence for the appearance of the mechanism responsible for

this explosion within the DNA. It can neither be attributed to radiation effects nor is it dose-dependent. Moreover, at present it is unclear what molecular or cytobiological damage is induced by this explosion.

In summary, it can be concluded that the prevailing image of Auger electron emitters in radiation biology is beginning to change considerably, or at least to differentiate. The original aim of determining RBE values on the basis of the absorbed dose alone proved unfeasible due to the unexpected experimental results. In view of the qualitatively different biological reactions found, RBE values determined in this manner must be viewed with a certain degree of scepticism. Future activities in this field should therefore focus on confirming the individual results determined here, and on systematically investigating additional iodine nuclides (^{124}I) as well as nuclides from other elements.

7 Literatur

- [Act96] Acta Oncologica 35, No. 7, 1996
- [Act00] Acta Oncologica 39, No. 6, 2000
- [Alb04] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH. 4 (2004)
- [Bar94] Baranowska K.J., Helseth L.D., Lai J., Schneiderman M.H., Schneiderman G.S., 1994, J. Labelled Compd. Radiopharm. 34, 513-521
- [Bav88] Baverstock, K. F. and Charlton, D. E. (Eds.), DNA Damage by Auger Emitters, Taylor & Francis, London 1988
- [Bel01] Belloc F., Garnier O., Boyer C., Lacombe F., 2001, Cell Signaling Promega Notes (76)
- [Ber84] Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., Dinola, A., Haak, J. R., 1984, J. Chem. Phys. 81, 3684-3690.
- [BMU05] Biologische Wirksamkeit von Auger-Elektronen emittierenden Radionukliden, Schriftenreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz, BMU 2005-659
- [Bon06] Bonzon, C., Buchier-Hayes, L., Pagliari, L.J., Green, D. R., Newmeyer, D.D., 2006, Molecular Biology of the Cell 17 (5), 2150-2157.
- [Bur73] Burki, H.J., Roots, R., Feinendegen, L.E., Bond, V. P., 1973, Int. J. Radiat. Biol. 24, 363-375.
- [Bra75] Bradley, E.W., Chan, P.C., Adelstein, S.J., 1975, Radiat. Res. 64, 555-563.
- [Car63] Carlson, T.A., White, R.M., 1963, J. Chem. Phys. 38, 2930-2934.
- [Car66] Carlson, T.A., White, R.M., 1966, J. Chem. Phys. 44, 4510-4520.
- [Cer03] Ceruti, S., Beltrami, E., Matarrese, P., Mazzola, A., Cattabeni, F., Malorni, W., and Abbracchio, M.P., 2003, Molecular Pharmacology 63, 1437-1447.
- [Cha86] Charlton, D.E., 1986, Radiat. Res. 107, 163 -171.
- [Fei71] Feinendegen, L.E., Ertl, H.H., Bond, V.P., 1971, Biological toxicity associated with the Auger effect. In: Ebert, H. (ed) Proceedings Symposium on Biophysical Aspects of Radiation Quality. Vienna: IAEA, 419-430
- [Gie00] Giese, B., 2000, Accounts of Chemical Research 33, 631-636
- [Gor93] Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z., 1993, Cancer Res. 53, 1945-1951
- [Hof71] Hofer, K. G. and Hughes, W.L., 1971, Radiat. Res. 47, 94-109
- [How92a] Howell, R.W., 1992, Med. Phys. 19, 1371-1383
- [How92b] Howell, R.W., Narra, V.R., Sastry, K.S.R., Rao, D.V. (Eds.), Biophysical Aspects of Auger Processes, American Association of Physicists in Medicine, 1992
- [Hum84] Humm, J.L., 1984, The analysis of Auger electrons released following the decay of radioisotopes and photoelectric interactions and their contribution to energy deposition, Berichte der Kernforschungsanlage Jülich Nr. 1932
- [Hyp94] HyperChem. Computational Chemistry, Molecular visualization and simulation. Hypercube, Inc., Publication HC40-00-03-00, April 1994, Waterloo, Ontario, Canada.
- [IJR04] International Journal of Radiation Biology 80, Special Issue 2004
- [Jor98] Jortner, J., Bixon, M., Langenbacher, T., Michel-Beyerle, M.E., 1998, PNAS USA 95, 12759-12765.
- [Kas03] Kassis, A.I., 2003, J Nucl Med 44, 1479-1481
- [Kis06] Kishikawa, H., Wang, K., Adelstein, S.J., Kassis, A., 2006, Radiat. Res. 165, 688-694
- [Küm06] Kümmerle 2006, Persönliche Mitteilung

- [Led78] Lederer; C.M., Shirley; V.S., Browne, E., Dairiki, J.M., Doebler, R.E., Shihab-Eldin, A.A., Jardine, L.J., Tuli, J.K., and Burn, A.B., 1978, Table of Isotopes, Seventh Edition, Wiley, New York
- [Lid01] Lide, D.R., (Ed.), 2001, CRC Handbook of Chemistry and Physics, 82nd Edition, CRC Press, Boca Raton, ISBN 0-8493-0482-2
- [Lob00] Lobachevsky, P.N. and Martin, R.F., 2000, Radiat. Res. 153, 271-278
- [Lob04] Lobachevsky, P.N., Karagiannis, T.C. and Martin, R.F., 2004, Radiat. Res. 162, 84-95
- [Mak89] Makrigiorgos, M., Kassis, A.I., Baranowska-Kortylewicz, J., et al., 1989, Radiat. Res. 118, 532-544
- [Pom87] Pomplun, E., Booz, J., Charlton, D.E., 1987, Radiat. Res. 111, 533-552.
- [Pom91] Pomplun, E., 1991, Int. J. Radiat. Biol. 59, 625-642.
- [Pom92] Pomplun, E., 1992, ^{123}I : Calculation of the Auger electron spectrum and assessment of the strand breakage efficiency, Howell, R.W. et al. (Eds.), Biophysical Aspects of Auger Processes, American Association of Physicists in Medicine, pp. 121-136
- [Pom00] Pomplun, E., 2000, Acta Oncologica 39, 673-679.
- [Pom02] Pomplun, E., Terrissol, M. and Hille, R., 2002, Radiat. Prot. Dosim. 99, 81-82
- [Pom06] Pomplun, E., Terrissol, M. and Kümmerle, E., 2006, Radiat. Prot. Dosim. 122, 80-81
- [Pre92] Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., Flannery, B. P., 1992, Numerical Recipes in Fortran, Cambridge University Press, Cambridge.
- [RRQ77] Current topics in Radiation Research Quarterly 12, 1977
- [Sac86] Sachs, L., 1986, Angewandte Statistik - Anwendung statistischer Methoden, Springer Verlag Berlin
- [Ste89a] Stewart, J.J.P., 1989a, J. Comput. Chem. 10, 209-220.
- [Ste89b] Stewart, J.J.P., 1989b, J. Comput. Chem. 10, 221-264.
- [Ura04] Urashima, T., Wang, K., Adelstein, S.J., Kassis, A., 2004, Int. J. Radiat. Biol. 80, 867-874
- [Vee57] Van der Veen J., Bots L., Mes A., 1957, Archiv für die gesamte Virusforschung (Wien) 8, 230-238
- [Ver00] Verheij M. and Bartelink H., 2000, Cell Tissue Res. 301, 133-142
- [Wan99] Wan, C., Fiebig, Th., Kelley, S.O., Treadway, Ch., Barton, J.K., 1999, PNAS USA 96, 6014-6019.
- [Zer01] Zerhusen, S., 2001, Beitrag zum Verständnis der biologischen Wirksamkeit des Auger-Elektronen emittierenden Radionuklids ^{125}I in menschlichen Zellen, Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jül-3882