

Anhang/Appendix V

1. Strahleninduzierte Genominstabilität und ihre Konsequenzen für die Zelltransformation.

2. Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen des zytogenetischen Biomonitoring.

(Prof. Dr. P. Virsik-Peuckert, Institut für Medizinische Physik und Biophysik,
Universität Göttingen, Gosslerstr. 10f, 37075 Göttingen)

Anhang/Appendix V

1.

Strahleninduzierte Genominstabilität und ihre Konsequenzen für die Zelltransformation.

Einleitung

Unter Genominstabilität versteht man eine erhöhte Erwerbsrate an de novo entstandenen Änderungen des Genoms. Diese Änderungen können sich als chromosomale Destabilisierung, Genamplifikation und Mutationen manifestieren, und sie sind charakteristisch für Tumorzellen (z.B. Morgan et al. 1996, Ruiz and Wahl 1990, Tlsty et al. 1989). Chromosomale Destabilisierung kann sich durch numerische Aberrationen, also durch Verlust oder Zugewinn eines oder mehrerer Chromosomen äußern, oder durch strukturelle Aberrationen wie dizentrische Chromosomen, Deletionen, Insertionen und Translokationen. Verlust der Genomstabilität wurde in vielen verschiedenen Tumorentitäten, sowohl bei Leukämien und Lymphomen, als auch in den meisten soliden Tumoren beobachtet (Heim and Mitelman 1987, Solomon et al. 1991, Mitelman 1991, Rabbitts 1994).

Die inhärente Genominstabilität der Tumorzellen wird inzwischen als einer der wichtigsten Aspekte der Krebsentstehung angesehen. Schon Nowell (1976) war der Meinung, daß die Genominstabilität für die notwendige genomische Plastizität sorgt, die die schrittweise Progression der für den neoplastischen Phänotyp erforderlichen genetischen Änderungen ermöglicht. Fünf humane Erbkrankheiten sind mit Genominstabilität und erhöhtem Krebsrisiko assoziiert: Fanconi's Anämie, Bloom's Syndrom, Ataxia telangiectasia, Werner Syndrom und Li-Fraumeni Syndrom (z.B. Morgan and Murnane 1995, Taylor 1995). Die Entstehungsmechanismen der Genominstabilität sind noch nicht bekannt. Zellen verwenden viele Gene bzw. ihre Produkte um eine fehlerfreie Weitergabe der genetischen Information an die Nachkommenschaft sicherzustellen. Zu den bekanntesten dieser Gene gehört das p53 Gen (z.B. Almasan et al. 1995, Kastan et al. 1995). Mutationen in einem für die genomische Stabilität sorgenden Gen könnten ein frühes Ereignis der Tumorigenese sein und zu weiteren multiplen Mutationen wie sie in Tumoren beobachtet werden, führen.

Strahleninduzierte Genominstabilität: Experimentelle in vitro Evidenz

Die wichtigsten biologischen Strahlenwirkungen umfassen Genmutationen, Chromosomenaberrationen, Zelltransformation und den reproduktiven sowie den apoptotischen Zelltod. Alle diese Wirkungen werden als Konsequenzen einer (fehlerhaften) Prozessierung strahleninduzierter DNS-Schäden angesehen. Generell wurde angenommen, daß die entsprechenden Prozesse während der Zellzyklen stattfinden, die einer Bestrahlung unmittelbar folgen.

Indessen beschrieben bereits Puck und Markus 1956, Thomson und Suit 1969, Trott und Hug 1970, daß die strahleninduzierte Zelltoxizität bis zu sechs Zellzyklen nach Bestrahlung, also verzögert beobachtet werden. Später wurde gezeigt, daß eine erhöhte Zelltod-Rate über viele Zellgenerationen hinweg manifest werden kann (Seymour et al. 1986, Gorgojo and Little 1989). Über de novo entstandene Chromosomenaberrationen in späteren Zellzyklen nach Bestrahlung von Mäuseembryonen wurde erstmalig von Weissenborn und Streffer (Weissenborn und Streffer 1988, Weissenborn und Streffer 1989) berichtet. In diesen Arbeiten wurden die Embryonen mit Röntgenstrahlung oder mit Neutronen bestrahlt. Pampfer und Streffer (1989) haben erstmalig eine strahleninduzierte genomische Instabilität in fötalen Fibroblasten aus bestrahlten Mäusezygoten beschrieben. Sie beobachteten im Vergleich mit unbestrahlten Kontrollen eine erhöhte Rate an Chromatid- und Chromosomen-Fragmenten in Fibroblastenkulturen, die aus fötaler Haut von im Zygotenstadium mit Röntgenstrahlung bestrahlten Mäusen angezüchtet wurden. Es wurden mehr aberrante Zellen in Föten mit der Gastroschisis-Mißbildung als in normalen (aber vorbestrahlten) Föten beobachtet. Die Aberrationsrate war jedoch ziemlich konstant. Die beobachteten, an die Zellen der nächsten Zellteilungen nicht übertragbaren Aberrationen sind also erst viele Zellzyklen nach der Bestrahlung de novo entstanden. Die ursprünglichen strahleninduzierten Zelländerungen erlaubten in manchen Fällen eine normale Entwicklung der Föten, begünstigten aber eine Mißbildungsentstehung. Diese Ergebnisse, die auf eine verzögert auftretende strahleninduzierte Genominstabilität hindeuteten, könnten spezifisch mit der Embryogenese und mit der Zelldifferenzierung assoziiert sein. In verschiedenen Untersuchungen der letzten Jahre wurden aber auch zytogenetische Ergebnisse veröffentlicht, die eine strahleninduzierte Genominstabilität in Form

von *de novo* entstandenen chromosomalen Aberrationen in Nagetierzellen sowie in menschlichen Zellen aufzeigen (z.B. Kadhim et al. 1995, Morgan et al. 1996, Mothersill und Seymour 1997).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß in Kolonien von überlebenden bestrahlten Zellen diese Genominstabilität zu einem verzögerten reproduktiven Zelltod (z.B. Seymour et al. 1986, Chang and Little 1992, Mothersill et al. 1996, Mothersill und Seymour 1997), zu einem verzögerten Auftreten von Mutationen (Little et al. 1990, Little 1994, Selvanayagam et al. 1995, Harper et al. 1997) und zu einer allgemeinen Chromosomeninstabilität struktureller oder numerischer Art (z.B. Kadhim et al. 1992, Marder and Morgan 1993, Kadhim et al. 1995, Martins et al. 1993, Plumb et al. 1997) führen kann. Da alle diese Veränderungen *de novo* in späteren Nachkommen bestrahlter und überlebender Zellen auftreten, ist diese strahleninduzierte Genominstabilität der inhärenten genomischen Instabilität wie sie in den meisten Tumorzellen beobachtet wird, sehr ähnlich.

Die wichtigsten Arbeiten: ein Überblick und Anmerkungen

Da Tumorzellen als transformierte überlebende Zellen in Folge einer Bestrahlung aus normalen Zellen entstehen können, können zur ihrer Entstehung die nicht-letalen Strahlenwirkungen beitragen, also die Genmutationen und die vererbbaaren ("stabilen") Chromosomenaberrationen wie reziproke Translokationen, Insertionen und Deletionen. Alle diese Änderungen können generell entweder direkt nach Bestrahlung, oder als Folge einer Genominstabilität in der Nachkommenschaft jeder, durch Bestrahlung instabil gewordener Zelle entstehen. Unter diesem Aspekt werden die folgenden Arbeiten zusammengefasst, und zwar in bezug auf die chromosomale Destabilisierung (strukturelle sowie numerische Aberrationen) und die Genmutationen, wie sie auch in Zellkulturen beobachtet wurden.

1. **Kadhim et al. (1992)** untersuchten murine Knochenmarkzellen nach einer Bestrahlung mit Pu-238 α -Teilchen ($E = 3,3 \text{ MeV}$, $LET = 121 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$) und zum Vergleich mit 250 kV Röntgenstrahlung. Aus Zellkolonien die eine α -Teilchen-Bestrahlung mit Dosen von 0,25 Gy, 0,5 Gy oder 1 Gy bzw. eine

Bestrahlung mit 3 Gy Röntgenstrahlung überlebt haben, wurden Metaphasenzellen präpariert und in bezug auf Chromatid- und Chromosomen-Aberrationen untersucht. Tabelle 1 zeigt die zytogenetischen Daten. In Zellen die mit α -Teilchen bestrahlt wurden, waren keine Aberrationen klonal, d.h. jede einzelne Aberration entstand in der jeweiligen Zelle de novo nach 10 bis 11 Tagen. Unabhängig von der Dosis wurden in ca. 50% aller Kolonien aus bestrahlten Zellen aberrante Metaphasen beobachtet. In diesen Metaphasen wurden häufiger Chromatidaberrationen als Chromosomenaberrationen beobachtet. In Zellen die mit Röntgenstrahlung bestrahlt wurden, wurden keine solchen Aberrationen beobachtet: in Zellen aus nur 2 von insgesamt 86 Kolonien wurden Aberrationen beobachtet, aber in diesem Fall waren sie klonal, also vorhanden in allen auswertbaren Metaphasenzellen aus diesen Kolonien.

In dieser Arbeit wurden also nur nach einer α -Teilchen - Bestrahlung de novo entstandene Aberrationen als Folge einer strahleninduzierten Genominstabilität beobachtet. In den Zellen des Mäuseknochenmarks wurde dieser Effekt mit Röntgenstrahlung nicht beobachtet. Der Anteil an Kolonien mit aberranten Zellen betrug ca. 50 %, und zwar unabhängig von der α - Teilchen - Dosis. Insgesamt zeigen die Ergebnisse einen deutlichen Unterschied zwischen unbestrahlten bzw. mit Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen einerseits, und mit α -Teilchen bestrahlten Zellen andererseits. Die Statistik ist nicht besonders gut, weil nicht sehr viele Kolonien bzw. Metaphasenzellen ausgewertet wurden; dies war nicht möglich, da gebänderte (G-Banden) Zellen karyotypisch analysiert worden sind.

2. **Martins et al. (1993)** untersuchten humane Hautfibroblasten, die mit schweren Ionen (Neon, $E = 10.74 \text{ MeV/u}$, Argon, $E = 10,52 \text{ MeV/u}$ und Blei, $E = 9,5 \text{ MeV/u}$) bestrahlt worden sind. Die Dosen betragen $0,62 \text{ Gy}$ bis $2,48 \text{ Gy}$ für Neon-Ionen, $1,93 \text{ Gy}$ bis $7,72 \text{ Gy}$ für Argon-Ionen und $43,4 \text{ Gy}$ für Blei-Ionen. Die Aberrationen wurden in Zellen der 1., 7., 15., 20. und 25. Passage (der Erhaltungszyklus einer Zellkultur; in Abhängigkeit von dem jeweiligen Zelltyp, von den Anfangsbedingungen einer Zellkultur, von dem Kulturmedium usw. kann er unterschiedlich viele Zellteilungen beinhalten) untersucht. Verschiedene ("instabile") Aberrationstypen nahmen erst ab, waren selten in 5. bis 7. Passage und nahmen wieder in der 20. bis 25. Passage zu. In diesen späten Passagen erschienen - offensichtlich de novo entstandene - dizentrische

Chromosomen, Marker-Chromosomen, Derivat-Chromosomen (d.h. strukturell veränderte Chromosomen, die Abweichungen zeigen, an denen zwei oder mehrere andere Chromosomen beteiligt sind) und Telomerassoziationen. Ein zeitlicher Verlauf dieser Aberrationen ist in den Tabellen 2a, b, c dokumentiert. In den untersuchten Fibroblasten war das Chromosom 13 am häufigsten an Rearrangements beteiligt. In dieser Linie wurden von der Genominstabilität bevorzugt die Chromosomen 13, 1p und 16 betroffen. Aneuploide Klone wurden ebenfalls beobachtet, und zwar solche mit einer Monosomie 13.

Chromosom 13, das am häufigsten von strukturellen sowie numerischen Aberrationen betroffen wurde, trägt das RB1 Gen, das als Tumorsuppressor-Gen identifiziert ist. Es müsste allerdings geklärt werden, ob in anderen Fibroblasten-Linien nach Ionen-Bestrahlung wiederum dieses Chromosom in genomisch instabilen Zellen am häufigsten betroffen wird.

3. **Holmberg et al. (1993)** untersuchten menschliche T-Lymphozyten, die mit 250 kV Röntgenstrahlung (3 Gy) bestrahlt wurden. Metaphasenzellen aus Langzeitkulturen (9, 13, 16 und 34 Tage) wurden in bezug auf strahleninduzierte Chromosomenaberrationen analysiert. Dizentrische und Ringchromosomen waren in Langzeitkultur-Zellen kaum vorhanden; Deletionen, reziproke Translokationen und komplexe Aberrationen einschließlich Marker-Chromosomen wurden in allen bestrahlten Langzeitkulturen beobachtet. Diese Aberrationen waren fast alle nicht-klonal, also verschiedene Metaphasenzellen zeigten unterschiedliche Aberrationen. Im Vergleich zu den Zellen aus den 9 Tage - Kulturen, wurden in Zellen aus den 13 Tage - Kulturen deutlich mehr Aberrationen beobachtet. In allen bestrahlten Kulturen, aber in keiner unbestrahlten Kultur, wurden vereinzelt Klone mit einfachen oder mehrfachen Deletionen und reziproken Translokationen sowie (nicht näher identifizierten) Marker-Chromosomen beobachtet: dabei stieg die Anzahl der Klone von einem Klon in der 9 Tage-Kultur auf sechs in der 34 Tage - Kultur.

In den Langzeitkulturen wurden in bestrahlten Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Zellen Deletionen, reziproke Translokationen und auffallend viele Marker-Chromosomen beobachtet. Marker-Chromosomen wurden in jeweils einer einzigen Metaphase beobachtet und nicht näher analysiert. Solche Chromosomen können (wie häufig bei Tumorzellen beschrieben) verschiedenen, oft mehrfachen Translokationen entstammen. Alle diese (oben erwähnten)

Aberrationen sind "vererbbar", also für die Zellteilung nicht hinderlich, da sie das Vorhandensein von zwar anomalen Chromosomen bedeuten, diese Chromosomen aber jeweils nur ein Zentromer besitzen. Die Präsenz von solchen "übertragbaren" Aberrationen in Zellen aus späten Teilungen nach einer Bestrahlung ist generell zu erwarten. Unterhalb der Klone aus bestrahlten Zellen wurden - erwartungsgemäß - viel mehr Klone mit aberranten Karyotypen beobachtet. In bestrahlten sowie unbestrahlten aberranten Klonen wurden in manchen Zellen zusätzlich neue Marker-Chromosomen beobachtet ; diese "Instabilität" könnte aber als Folge eines anomalen Karyotyps in der ursprünglichen Mutterzelle gedeutet werden, und nicht als eine per se strahleninduzierte. Es ist also fraglich, ob konventionelle Röntgenstrahlung eine Genominstabilität in menschlichen T-Lymphozyten zu induzieren vermag.

4. **Marder und Morgan (1993)** untersuchten eine hybride Mensch-Hamster Zelllinie; die Zellen des Chinesischen Hamsters (Ovarzellen, CHO) wurden mit menschlichen Leukozyten fusioniert und die experimentell verwendete Linie beinhaltete zusätzlich zu den 20 bis 26 Hamsterchromosomen noch ein einziges humanes Chromosom 4. Zellen dieser Linie wurden mit 10 Gy Röntgenstrahlung (250 kV) vorbestrahlt. Zellen aus überlebenden (aus bestrahlten oder unbestrahlten Zellen) Kolonien (10 bis 15 Tage) wurden nochmals mit 5 oder 10 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt bzw. unbestrahlt weiter gezüchtet und dann wurden Metaphasen aus überlebenden Kolonien in bezug auf strukturelle Aberrationen die das fluoreszent markierte Chromosom 4 betrafen, analysiert. In unbestrahlten hybriden Zellen war das Chromosom 4 sehr stabil: nur 2 Strukturveränderungen in mehr als 4.000 Zellen wurden gefunden. Es wurden verschiedene Veränderungen in Zellen aus den überlebenden Kolonien (die aus bestrahlten Zellen gebildet wurden sind), gefunden. Die Aberrationen sind nicht einzeln aufgeführt, aber wie aus den beschriebenen Beispielen folgt, wurden außer den "stabilen" (vererbaren) Insertionen und Translokationen auch Triradiale und dizentrische Chromosomen beobachtet. Auch in der zweiten Runde (nach erneutem Passagieren), und zwar in dem 22. Zellzyklus oder sogar in späteren Zellzyklen nach der Bestrahlung, wurden vor allem klonale Aberrationen (Translokationen und Insertionen) beobachtet.

In einem speziellen (Mensch/Hamster) hybriden System wurden in späten Zellzyklen nach einer Röntgenbestrahlung vor allem klonale strukturelle Aberrationen, und zwar Translokationen, Deletionen und Insertionen

beobachtet. Dieses Ergebnis belegt die hohe Persistenz solcher Aberrationen. In der Arbeit sind sehr wenige quantifizierte Daten vorhanden. Es bleibt unklar, wieviele de novo verzögert entstandene (instabile) Aberrationen beobachtet wurden. Es ist auch anzumerken, daß sogar ein signifikantes Vorhandensein von solchen Aberrationen unter Beteiligung des menschlichen Chromosoms und der 20 bis 26 Hamster-chromosomen (die variable Hamsterchromosomenzahl bedeutet eine inhärente numerische genomische Instabilität) möglicherweise spezifisch für diesen besonderen Zelltyp ist und nicht die generelle Induzierbarkeit von genomischer Instabilität durch Röntgenstrahlung belegt..

5. **Kadhim et al. (1995)** untersuchten in ihrer nächsten Arbeit die Induktion von Genominstabilität in primären menschlichen Knochenmarkzellen, die mit Plutonium - α - Teilchen (0,25 bis 1 Gy) oder mit 250 kV Röntgenstrahlung (1 Gy) bestrahlt worden sind. Metaphasenchromosomen wurden entweder in Zellen aus überlebenden Kolonien (18 bis 20 Tage nach Bestrahlung) oder in Zellen aus Suspensionen, die 4, 16 und 20 Tage nach Bestrahlung kultiviert wurden, nach einer G-Bänderung (durch eine Trypsin-Behandlung von Metaphase-Präparaten und eine anschließende Giemsa-Färbung werden die für die einzelnen Chromosomen charakteristischen G-Banden-Muster sichtbar, und diese Bandenmuster erlauben eine eindeutige Identifizierung einzelner Chromosomen) analysiert. Wie in Knochenmarkszellen der Maus (Kadhim et al. 1992), wurden erneut Chromatidtyp-Aberrationen häufiger als Chromosomentyp-Aberrationen beobachtet. Nicht-klonale Aberrationen, die in den überlebenden Zellkolonien beobachtet wurden, zeigten gleiche Häufigkeiten nach Bestrahlung mit 0,25 oder mit 0,5 Gy. Die gepoolten Häufigkeiten sind in Tabelle 3 angegeben. In Zellen die mit Röntgenstrahlung bestrahlt worden sind, wurden keine nicht-klonalen Aberrationen beobachtet. In Zellen aus Suspensionen wurden - ähnlich wie in Zellen aus den Kolonien - 16 bzw. 20 Tage nach Bestrahlung vor allem Chromatidaberrationen beobachtet. Die genomische Instabilität wurde nur in Zellen mancher (gesunder) Knochenmarkspender beobachtet.

6. **Watson et al. (1997)** haben die, durch α -Teilchen induzierte genomische Instabilität, in Knochenmarkzellen aus drei verschiedenen Mäusestämmen unter dem Aspekt der genetischen Variabilität untersucht. Sie gingen der Frage nach, ob möglicherweise irgendwelche (noch unbekannt) genetische Faktoren die

Induzierbarkeit der genomischen Instabilität beeinflussen bzw. erst überhaupt ermöglichen (Instabilitäts-Phänotyp), da in einer vorherigen Arbeit dieser Gruppe (Kadhim et al. 1995) eine diesbezügliche interindividuelle Variabilität beobachtet worden ist. Die experimentellen Daten sind in **Tabelle 4** zusammengefasst. Zwei von den untersuchten drei Mäusestämmen zeigten eine "Sensitivität" für die Induktion von genomischer Instabilität durch eine α -Teilchen Bestrahlung, die Zellen des dritten Stammes waren "resistent". In einer zweiten Versuchsreihe wurden deshalb die beiden sensitiven Stämme jeweils mit dem resistenten Mäusestamm gekreuzt und die F_1 Hybridzellen in bezug auf strahleninduzierte genomische Instabilität erneut untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind ebenfalls in **Tabelle 4** zusammengefasst. Die "Resistenz" gegen strahleninduzierte Genominstabilität war dominant: in beiden hybriden Zelllinien wurde keine signifikante Instabilität beobachtet. Diese ersten Befunde deuten auf die Existenz eines genetisch bedingten Instabilitätsphänotyps hin.

7. **Plumb et al. (1997)** haben den Zusammenhang zwischen der numerischen Instabilität (Verlust oder Zugewinn) des Y-Chromosoms und dem Auftreten von strahleninduzierter AML (akute myeloische Leukämie) nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 3 Gy Röntgenstrahlung in männlichen Mäusen aus drei verschiedenen Stämmen untersucht: zwei dieser Stämme erwiesen sich als "sensitiv" gegenüber strahleninduzierter Genominstabilität (Watson et al. 1997). In strahleninduzierten Leukämien, sowohl bei Mäusen wie bei Menschen, wurden nämlich im Unterschied zu "spontan" entstandenen Leukämien keine spezifischen Chromosomentranslokationen beobachtet, sondern nur partielle oder vollständige Verluste einzelner Chromosomen bzw. terminale und interstitielle Deletionen. Es wurden Milzzellen aus bestrahlten Mäusen, die AML bekamen oder nicht bekamen (Kontrollen) in bezug auf numerische und strukturelle Aberrationen des Y Chromosoms untersucht, da dieses Chromosom in mehr als 50 % der nach Bestrahlung an AML erkrankten Mäuse numerische und strukturelle Änderungen aufwies (Hayata et al. 1983, Fennelly et al. 1995). Die Ergebnisse dieser Arbeit (**Tabelle 5**) dokumentieren eine hohe Polyploidie-Rate des Y Chromosoms (2 bis 5 Kopien) die nur in Zellen aus erkrankten, aber nicht in Zellen aus nicht erkrankten bestrahlten Kontrollen beobachtet wurde. Die allgemeine Rate an strahleninduzierter Polyploidie (alle Chromosomen zusammengefasst) war nicht signifikant unterschiedlich in Zellen aus AML- und aus Kontroll-Tieren.

Der lange Arm des Mäuse-Y Chromosoms enthält eine Anzahl repetitiver Sequenzen, darunter 300-500 Kopien des IAPE-Y, eines Mitglieds der IAP-Familie (IAP = intracisternal A particle) der endogenen Retroviren (Fenelly et al. 1996). In weiteren Untersuchungen haben Plumb et al. deshalb mit Hilfe der Northern blot - Methode die zelluläre RNA aus 14 strahleninduzierten AML Fällen in bezug auf IAP analysiert. In allen AML Fällen waren die Niveaus der IAP mRNA viel höher als in normalen Milzzellen oder Knochenmarkzellen.

Retrotransposition der IAP cDNA und Insertionsaktivität der Zellwachstums-Regulationsgene wurde bei der Transformation von hämopoietischen Zellen (Blatt et al. 1988, Blankenstein et al. 1990, Duhrsen et al. 1990, Algate and McCubrey 1993, Tanaka and Ishihara 1995) impliziert. Auch das menschliche Y Chromosom enthält viele endogene retrovirale Genome (Kjellman et al. 1995) und Aberrationen dieses Chromosoms wurden in Leukämien entdeckt (Gallego et al. 1996, Michaux et al. 1996). Die (strahleninduzierte) Instabilität des Y Chromosoms und die dadurch entstandenen Aberrationen könnten eine Insertionsaktivität der zellulären Gene - ähnlich einer Retrotransposition - induzieren.

8. Harper et al. (1997) untersuchten ein verzögertes Auftreten von strahleninduzierten HPRT - Mutationen in Knochenmarkzellen der Maus. Mit Hilfe des hprt - Gens (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) auf dem X Chromosom, wurde diese eine strahleninduzierte spezifische Mutationsfrequenz in Knochenmarkzellen, die in vitro mit α -Teilchen ($^{238}\text{Plutonium}$), mit Neutronen ($^{252}\text{Californium}$) oder mit 250 kV Röntgenstrahlung bestrahlt worden sind, bestimmt. Zellen, die eine HPRT-Mutation tragen sind resistent gegen 6-Thioguanin (TG^{R}) und können in einem Kolonietest oder autoradiographisch selektiert werden. Im Unterschied zu genomischer Instabilität, die auf der Ebene der Chromosomenaberrationen manifest wurde (und vermutlich nur durch dicht ionisierende Strahlung induzierbar ist), wurde das verzögerte Mutationsauftreten auch durch Röntgenstrahlung induziert. Die in primären bzw. sekundären (d.h. nach einer Vorlauf-Wachstumsphase in der Milz einer Empfänger-Maus gewachsenen und dann erneut in vitro kultivierten) Knochenmarkzellkolonien beobachteten Mutations-häufigkeiten sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Mehr als 90% aller nachgewiesener Mutationen sind erst nach mehr als 12 Zellteilungen nach einer Bestrahlung entstanden. Diese Mutationen können deshalb nicht den initialen

komplexes System ist, können verschiedene Änderungen auf verschiedenen Wegen zur Entstehung einer Tumorzelle führen. Viele dieser Änderungen können durch ionisierende Strahlung induziert werden. Die Induktion genomischer Instabilität, die inhärent für Tumorzellen ist, gehört zu den Wirkungsweisen, die noch wenig untersucht sind. Die oben analysierten Arbeiten deuten darauf hin, daß je nach der Auswirkung der Genominstabilität (Mutationen oder Chromosomenaberrationen) dicht-ionisierende Strahlung und sogar Röntgenstrahlung wirksam sind. Die Mechanismen die zur Genominstabilität führen müssen noch geklärt werden. Verschiedene Störungen der intrazellulären oder interzellulären (Zellkommunikation) Signaltransduktionsketten könnten zu einer, erst später auftretenden Genomdestabilisierung führen. Eine strahleninduzierte Schädigung eines einzelnen DNA-Reparaturgens oder eines "Genomstabilitätsgens" (z. B. P53) könnte auch, als Folge einer Fehlerakkumulation in der DNA, zu einem späteren Zeitpunkt zu einer endgültigen Genomdestabilisierung führen können. Ebenso könnten Mutationen in bestimmten Genen, z.B. in Protoonkogenen, zu einer Genominstabilität führen. Denko et al. (1994) haben z. B. gezeigt, daß in Nagetierzellen, die mutierte p53 Gene beinhalten, durch eine Zugabe (Transfektion) des aktivierten humanen Ha-ras Onkogens, schon nach einer Zellteilung eine ausgeprägte Genominstabilität, (manifestiert als strukturelle Chromosomenaberrationen) induziert werden kann. Mutationen, die erst nach mehreren Zellteilungen zu einer Genomdestabilisierung führen können, könnten - falls in Geschlechtszellen vorhanden - unter Umständen erst in der Nachkommenschaft manifestiert werden; dann z.B. auch in den entsprechenden Knochenmarkszellen. Eine genetische Disposition, bedingt durch Anwesenheit von genetischen Faktoren die den Instabilitätsphänotyp bestimmen, ist durch die Arbeiten von Kadhim et al. 1992 und 1995 indiziert. Dieser Phänotyp ist dem der Fanconi Anämie sehr ähnlich: bei dieser genetischen Erkrankung ist die Instabilität mit einem aberranten Superoxid-Stoffwechsel assoziiert, mit progressivem Versagen der Knochenmarksfunktionen und mit einer Prädisposition für AML (Digweed und Sperling 1996). In den FA - Patienten sind also die Genominstabilität einerseits und die Entwicklung einer AML andererseits korreliert. Dies könnte als ein Hinweis dafür dienen, daß eine Genominstabilität - genetisch bedingt vorhanden oder z.B. strahleninduziert - eine Rolle bei Entstehung mancher Leukämiefälle spielen kann. Schätzungen des strahlenbedingten Leukämierisikos basieren meist auf epidemiologischen Daten für ionisierende Strahlung mit niedrigen LET-Werten und auf in vitro Bestimmungen der RBW-Werte in bezug auf Strahlenwirkungen die kurz nach

DNA-Schäden zugeordnet werden. Die kleinste Wirkung zeigten α -Teilchen; Neutronen und Röntgenstrahlung waren ungefähr gleich wirksam.

Zusammenfassung

1. α -Teilchen können verzögert auftretende Chromatidaberrationen sowohl in Knochenmarkszellen der Maus als auch in den Knochenmarkszellen des Menschen induzieren. Diese Aberrationen, die erst viele Zellzyklen nach einer Bestrahlung de novo entstehen, können als Folge einer strahleninduzierten Genominstabilität gedeutet werden. Sowohl bei der Maus als auch bei dem Menschen ist nicht jedes Individuum gegenüber dieser Strahlenwirkung gleich sensitiv. Somit deutet sich bei der Maus und bei dem Menschen - zumindest im Fall der Knochenmarkszellen und des damit assoziierten Leukämie-Risiko - ein genetisch bedingter Genominstabilitäts-Phänotyp an.

2. Schwere Ionen können ein ganzes Spektrum von verzögert auftretenden und de novo entstandenen Chromosomenaberrationen in humanen Hautfibroblasten induzieren. In der untersuchten Zelllinie wurde vor allem das Chromosom 13 betroffen, das das Tumorsuppressorgen RB1 enthält. Dieses Chromosom war nicht nur an de novo entstandenen strukturellen Aberrationen beteiligt, sondern es wurden auch Monosomien 13 beobachtet.

3. Verzögert auftretende de novo entstandene strukturelle Chromosomenänderungen wurden bisher nur durch dicht ionisierende Teilchen aber nicht durch konventionelle Röntgenstrahlung induziert. Im Unterschied zu diesen "massiven" Konsequenzen der strahleninduzierten Genominstabilität, sind die verzögert auftretenden HPRT-Mutationen auch durch konventionelle Röntgenstrahlung induzierbar. Bei den HPRT-Mutationen sind α -Teilchen weniger wirksam als Neutronen oder Röntgenstrahlung.

Ionisierende Strahlung kann zu Krebsentstehung, also auch zur Entstehung von Leukämien führen. Unserer heutigen Vorstellung nach ist die Tumorgenese ein Multistep-Prozess. Dabei kann z.B. eine nacheinander folgende Akkumulation von spezifischen Mutationen eine ausschlaggebende Rolle spielen, ebenso wie eine Deletion von Tumorsuppressorgen oder eine durch eine Chromosomentranslokation erfolgte Aktivierung von Onkogenen. Da die Zelle ein sehr

einer Bestrahlung manifest werden. Falls Strahlenarten mit hohen LET-Werten wie α -Teilchen zusätzlich zu den üblichen Mechanismen auch noch auf dem Weg der induzierten Genominstabilität einen weiteren Beitrag zur Entstehung von Leukämie (und Krebs allgemein) leisten, wäre das entsprechende Risiko bisher unterschätzt. Zukünftige Untersuchungen werden aber benötigt, um mehr Klarheit und mehr quantitative Daten zu bringen, um die Frage beantworten zu können, ob tatsächlich die strahleninduzierte Genominstabilität zu Leukämieentstehung beitragen kann, und wenn ja, eine neue Risikoschätzung vornehmen zu können.

An dieser Stelle möchte ich noch kurz die mögliche Rolle einer durch Bestrahlung verstärkt auftretender Transposition bzw. Retrotransposition, die ihrerseits zu Genmutationen führen kann und somit einen Beitrag bei Leukämie bzw. Krebs - Entstehung spielen kann, ansprechen. Unter Transposition versteht man die Insertion von bestimmten beweglichen (meist repetitiven) Elementen im Genom an einem neuen Ort: entweder im Strukturbereich oder im Promotorbereich eines Gens (Insertionsmutation) oder im intergenischen, nicht-kodierenden Bereich. Eine Insertionsmutation kann zu einer Fehlregulation des entsprechenden Gens führen, oder sogar zu seiner Zerstörung. Im Genom der Säugetiere befinden sich verschiedene Gruppen von repetitiven DNA Elementen (*Alu* Elemente), wie die LINE- oder SINE-Elemente ("long/short interspersed repetitive elements"). Bei der Retrotransposition wird mittels der zu einem repetitiven Element zugehörigen m-RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase die entsprechende doppelsträngige cDNA synthetisiert, und diese DNA wird dann irgendwo im Genom inseriert. Die Mobilität von z.B. der LINE-Elementen ist zwar streng reguliert, durch eine DNA-Schädigung oder Zellstreß kann allerdings die Transkriptionshäufigkeit der Elemente erhöht werden und folglich die Transposition häufiger werden. Im Zusammenhang mit der Genominstabilität wurde eine erhöhte Transkriptionsrate der IAP m-RNA in AML-Mäusen (Plumb et al.) beobachtet. Erhöhte Transkription des L1 (LINE-1) Elements wurde in verschiedenen menschlichen Tumoren beobachtet. Bei der Neurofibromatose Typ 1 wurde eine de novo *Alu* Insertion beobachtet. Bei der Haemophilie A wurde ebenfalls eine de novo Insertion von L1 Sequenzen nachgewiesen. Theoretisch ist es möglich, daß auch ionisierende Strahlung eine erhöhte Transpositionsaktivität durch bestimmte DNA- bzw. Chromosomen-Schädigungen induzieren kann; diese Frage muß vorerst offen bleiben, da bisher fast keine relevanten Untersuchungen vorhanden sind.

Literaturverzeichnis

Almasan, A. et al.: Genetic instability as a consequence of inappropriate entry into and progression through S-phase. *Cancer Metastasis Rev.* 14, 59-73, 1995.

Algate, P.A. and McCubrey, J.A.: Autocrine transformation of hemopoietic cells resulting from cytokine message stabilization after intracisternal A particle transposition. *Oncogene* 8, 1221-1232, 1993.

Blankenstein, T. et al.: DNA rearrangement and constitutive expression of the interleukin 6 gene in a mouse plasmacytoma. *J. Exp. Med.* 171, 965-970, 1990.

Blatt, C. et al.: DNA rearrangement of a homeobox gene in myeloid leukaemic cells. *EMBO J.* 7, 4283-4290, 1988.

Chang, W. P. and Little, J. B.: Delayed reproductive death as a dominant phenotype in cell clones surviving X-irradiation. *Carcinogenesis* 13, 923-928, 1992.

Courdi, A. et al.: Radiosensibilité in vitro des cellules tumorales humaines aux particules lourdes chargées. *J. Chim. Phys.* 90, 1001-1008, 1993.

Digweed, M. and Sperling, K.: Molecular analysis of Fanconi anemia. *Bioessays* 18, 579-585, 1996.

Duhrsen, U. et al.: In vivo transformation of factor-dependent hemopoietic cells: role of intracisternal A-particle transposition for growth factor gene activation. *EMBO J.* 9, 1087-1096, 1990.

Durante, M. et al.: Effects of α -particles on survival and chromosomal aberrations in human mammary epithelial cells. *Radiat. Environ. Biophys.* 34, 195-204, 1995.

Fennelly, J. et al.: Complex Y-chromosome aberrations are recurrent secondary event in radiation-induced murine acute myeloid leukaemia. *Leukaemia* 9, 506-512, 1995.

Fennelly, J. et al.: Co-amplification of tail to tail copies of MuRVY and IAPE, retroviral genomes on the *Mus musculus* Y-chromosome. *Mammalian Genome* 7, 31-36, 1996.

Gallego, M. et al.: New variant Ph translocation in chronic myeloid leukaemia t(Y;22)(p11;q11). *Cancer Genet. Cytogenet.* 87, 75-78, 1996.

Denko, N. C. et al.: The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5124-5128, 1994.

Gorgojo, L. and Little, J. B.: Expression of lethal mutations in progeny of irradiated mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 55, 619-630, 1989.

Hahn, P. et al.: X-ray induction of methotrexate resistance due to dhfr gene amplification. *Somat. Cell Mol. Genet.* 16, 413-423, 1990.

Harper, K. et al.: Delayed appearance of radiation-induced mutations at the Hprt locus in murine haemopoietic cells. *Exp. Hematology* 25, 263-269, 1997.

Hayata, I. et al.: Chromosomal aberrations observed in 52 mouse myeloid leukaemias. *Cancer Res.* 43, 367-373, 1983.

Heim, S. and Mitelman, F.: *Cancer cytogenetics.* Alan R. Liss, New York 1987.

Holmberg, K. et al.: Clonal chromosome aberrations and genomic instability in X-irradiated human T-lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 286, 321-330, 1993.

Kadhim, M. A. et al.: Transmission of chromosomal instability after plutonium α -particle irradiation. *Nature* 355, 738-740, 1992.

Kadhim, M. A. et al.: Radiation-induced genomic instability: delayed cytogenetic aberrations and apoptosis in primary human bone marrow cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 67, 287-293, 1995.

Kastan, M. B. et al.: p53, cell cycle control and apoptosis: Implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 14, 3-15, 1995.

Kjellman, C. et al.: The Y-chromosome: a graveyard for endogeneous retroviruses. *Gene* 161, 163-170, 1995.

Little, J. B.: Failla Memorial Lecture. Changing views of cellular radiosensitivity. *Radiat. Res.* 140, 299-311, 1994.

- Little, J. B. et al.: Delayed appearance of lethal and specific gene mutations in irradiated mammalian cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19, 1425-1429, 1990.
- Marder, B. A. and Morgan, W. F.: Delayed chromosomal instability induced by DNA damage. *Mol. Cel. Biol.* 13, 6667-6677, 1993.
- Martins, M. B. et al.: Specific chromosome instability induced by heavy ions: a step towards transformation of human fibroblasts? *Mutation Res.* 285, 229-237, 1993.
- Michaux, L. et al.: Translocation (Y;1)(q12;q12) in hematologic malignancies. Report on two new cases. FISH characterization, and review of the literature. *Cancer Genet. Cytogenet.* 86, 35-38, 1996.
- Mitelman F.: *Catalog of chromosome aberrations in cancer.* 4th ed., Wiley-Liss, New York 1991.
- Morgan, W. F. et al.: Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiation Res.* 146, 247-258, 1996.
- Morgan, W. F. and Murnane, J. P.: A role for genomic instability in cellular resistance? *Cancer and Metastasis Rev.* 14, 49-58, 1995.
- Mothersill, C. and Seymour, C.: Lethal mutations and genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 751-758, 1997.
- Nowell, P. C.: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28, 1976.
- Pampfer, S. and Streffer, C.: Increased chromosome aberration levels in cells from mouse fetuses after zygote X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 55, 85-92, 1989.
- Plumb, M. et al.: Ongoing Y-chromosome instability defines sub-clonal variants in radiation-induced leukaemias in the mouse. *Int. J. Radiat. Biol.* 72, 1-9, 1997.
- Ponnaiya, B. et al.: Induction of chromosomal instability in human mammary cells by neutrons and gamma rays. *Radiation Res.* 147, 288-294, 1997.
- Puck, T. T. and Marcus, P. I.: Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Medicine* 103, 653-666, 1956.

- Rabbitts, T. H.: Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372, 143-149, 1994.
- Ruiz, J. C. and Wahl, G. M.: Chromosomal destabilization during gene amplification. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3056-3066, 1990.
- Sabatier, L. et al.: Chromosomal instability. *Nature* 355, 548, 1992.
- Sabatier, L. et al.: Chromosomal instability and alterations of telomeric repeats in irradiated human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 611-613, 1994.
- Selvanayagam, C. S. et al.: Latent expression of p53 mutations and radiation-induced mammary cancer. *Cancer Res.* 55, 3310-3317, 1995.
- Seymour, C. B. et al.: High yields of lethal mutations in somatic mammalian cells that survive ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 50, 167-179, 1986.
- Solomon, E. et al.: Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254, 1153-1160, 1991.
- Thompson, L. H. and Suit, H. D.: Proliferation kinetics of X-irradiated mouse L cells: Studies with time-lapse photography. II., *Int. J. Radiat. Biol.* 15, 347-362, 1969.
- Tanaka, I. and Ishihara, H.: Unusual long target duplication by insertion of intracisternal A-particle element in radiation-induced acute myeloid leukaemia cells in mouse. *FEBS Letters*, 376, 146-150, 1995.
- Taylor, G. M.: Genetic effects of ionising radiation with respect to leukaemia. In: *Radiation Toxicology. Bone marrow and leukaemia*. Eds. Hendry, J. H. and Lord, B. I., Taylor and Francis Ltd., London 1995, pp. 275-310.
- Tlsty, T. et al.: Differences in the rates of gene amplification in nontumorigenic and tumorigenic cell lines as measured by Luria-Delbrück fluctuation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9441-9445, 1989.
- Trott, K. R. and Hug, O.: Intraclonal recovery of division probability in pedigrees of single X-irradiated mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 17, 483-486, 1970.
- Watson, G. E. et al.: Genetic factors influencing α -particle-induced chromosomal instability. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 497-503, 1997.

Weissenborn U. and Streffer, C.: The one-cell mouse embryo: cell-cycle-dependent radiosensitivity and development of chromosomal anomalies in postradiation cell cycles. *Int. J. Radiat. Biol.* 54, 659-674, 1988.

Weissenborn, U. and Streffer, C.: Analysis of structural and numerical chromosomal aberrations at the first and second mitosis after X irradiation of two-cell mouse embryos. *Radiat. Res.* 117, 314-220, 1989.

Literatur zur Transposition

Bratthauer, G. L. and Fanning, T. G.: LINE-1 retrotransposon expression in pediatric germ cell tumors. *Cancer* 71, 2383-2386, 1993.

Bratthauer, G. L. et al.: Expression of LINE-1 retrotransposons in human breast cancer. *Cancer* 73, 2333-2336, 1994.

Eckardt-Schupp, F. et al.: Molekulare Mechanismen der Entstehung von Punktmutationen. In: *Molekulare und zelluläre Prozesse bei der Entstehung stochastischer Strahlenwirkungen*. Hrsg. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Fischer Verlag, Stuttgart 1995.

Kazazian, H. H. et al.: Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 332, 164-166, 1988.

Wallace, M. R. et al.: A de novo *Alu* insertion results in neurofibromatosis type 1. *Nature* 353, 864-866, 1991.

2.

Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen des zytogenetischen Biomonitoring.

Zu den zytogenetischen Wirkungen ionisierender Strahlung gehört die Induktion von strukturellen und numerischen (Aneuploidie) Chromosomenaberrationen und die Entstehung von Mikrokernen - als Folge von (durch Bestrahlung entstandenen) azentrischen Chromosomenfragmenten oder als Folge von Verlust ganzer Chromosomen. Die durch eine bestimmte Dosis induzierten strukturellen oder numerischen Aberrationen können vollständig nur in den Zellen die sich in ihrer ersten Metaphase nach einer Bestrahlung befinden, erfasst werden. Ein Teil der strukturellen Aberrationen - dizentrische bzw. polyzentrische Chromosomen und azentrische Fragmente nehmen in weiteren Zellzyklen rapide ab. Zellen die dizentrische Chromosomen beinhalten, sind nur begrenzt zu einer weiteren Teilung fähig, die Wahrscheinlichkeit der Weitergabe eines dizentrischen Chromosoms beträgt ca. 50%; in späteren Zellzyklen sind Zellen mit dizentrischen Chromosomen die aus den initialen DNA Schäden entstanden sind, nicht mehr vorhanden. Azentrische Fragmente, die entweder zu dizentrischen Chromosomen oder zu terminalen bzw. interstitiellen Deletionen gehören, können in Folge fehlender Zentromere ebenfalls nicht an die Tochterzellen weitergegeben werden. Sie führen zu Bildung von Mikrokernen und werden aus den Zellen "ausgeschieden". Die Mikrokerne benötigen für ihre Expression einer Zellkernteilung. Sie werden in Zellen ausgewertet, die durch Zugabe des Cytochalasin-B in ihrer Zytokinese blockiert worden sind, d.h. die Zellen laufen eine Zellkernteilung durch, die Teilung in zwei Tochterzellen wird aber blockiert: Solche Zellen beinhalten dann zwei Zellkerne und - falls vorhanden - die durch Fragmente oder manchmal ganze Chromosomen entstandenen Mikrokerne.

Strukturelle Aberrationen wie reziproke Translokationen, Insertionen, Inversionen und deletierte Chromosomen können auch in späteren Zellzyklen nach Bestrahlung erfasst werden, da sie eine hohe Persistenz aufgrund normaler Zentromerstrukturen besitzen, sozusagen von Zelle zu Zelle vererbbar sind. Da die im Vergleich mit Insertionen oder Inversionen viel häufiger vorkommende reziproke Translokationen nur selten das klonale Zellüberleben beeinflussen, können sie als Langzeit- bzw. als ein kumulatives biologisches Dosimeter geeigneter als dizentrische Chromosomen sein. Im Unterschied zu den durch mehrere oder keine Zentromere charakterisierten aberranten Chromosomen (also

dizentrische /polyzentrische Chromosomen und azentrische Fragmente), die in Giemsa-gefärbten Metaphasenzellen auswertbar sind, können diese Veränderungen generell nur in gebänderten oder in fluoreszent markierten Metaphase-Chromosomen (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, FISH) erkannt werden. Die strahleninduzierten numerischen Aberrationen (Aneuploidie, also Verlust oder Zugewinn ganzer Chromosomen) können in Giemsa-gefärbten Zellen zwar erkannt werden (Chromosomenzahl größer oder kleiner als 46), aber normalerweise nicht identifiziert werden; dies wird für ausgewählte Chromosomen in der Interphase oder in der Metaphase durch fluoreszente Markierung (FISH) der entsprechenden Zentromere ermöglicht, bzw. ganz allgemein durch Chromosomenbänderung ermöglicht. Verlust von ganzen Chromosomen führt dann zu Bildung von zentromerhaltigen Mikrokernen, ähnlich wie die Entstehung von azentrischen Fragmenten zu Bildung von Mikrokernen ohne Zentromere führt.

Zu den bisher verwendeten Methoden des klassischen zytogenetischen Monitoring zum Nachweis von Strahlenexpositionen gehören die Bestimmungen von genomischen Häufigkeiten von dizentrischen Chromosomen bzw. von Mikrokernen. Als repräsentatives Zellsystem werden die Lymphozyten des peripheren Bluts untersucht; diese Zellen sind leicht zu bekommen, müssen nicht angezüchtet werden, befinden sich praktisch alle in der G₀-Phase des Zellzyklus, sind also synchronisiert, und es ist möglich viele Metaphasen zu gewinnen.

Die spontane Rate an dizentrischen Chromosomen ist sehr niedrig, bis maximal 0,003 dizentrische Chromosomen pro Zelle, also bis ca. 3 Dizentrische pro 1.000 Zellen (Bender et al. 1988, Jha and Sharma 1991, Braselmann et al. 1992, Lloyd et al. 1992). Es können deshalb auch relativ niedrige Dosisexpositionen oberhalb von ca. 0,5 Gy statistisch signifikant nachgewiesen werden. Falls für die in Frage kommende Strahlung eine *in vitro* bestimmte Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit für Dizentrische vorhanden ist, kann eine individuelle unbekannte Strahlendosis bestimmt werden (biologische Dosimetrie), allerdings nur im Rahmen der zu berücksichtigenden interindividuellen Schwankungen der Aberrationshäufigkeiten. Diese Nachweisgrenze gilt streng genommen nur für homogen verteilte, nicht chronische Ganzkörperexpositionen *in situ*. Allerdings müssen die Lymphozyten ziemlich früh nach einer Strahlenexposition analysiert werden, da diese Zellen (bis auf die langlebigen Gedächtniszellen) nur eine begrenzte Lebensdauer von besitzen und laufend aus dem Knochenmarks-

Stammzellenpool erneuert werden. Die Halbwertzeiten des Verschwindens von Zellen mit dizentrischen Chromosomen mit der Zeit betragen ca. 0,3 bis 0,4 Jahre (Buckton et al. 1967, Bauchinger et al. 1989, Ramalho and Nascimento 1991) bis ca. 3 Jahre (Lloyd et al. 1980, Sasaki 1983, Bauchinger et al. 1989).

In der Praxis ist eine Strahlenexposition oft protrahiert (chronisch), die Bestrahlung ist intern (erfolgt also nach einer Inkorporation von Radionukliden) und folglich inhomogen und partiell (keine Ganzkörperbestrahlung). Damit ist die Möglichkeit einer relativ genauen biologischen Dosimetrie sehr begrenzt, oder es müssten umfangreiche und recht unsichere Korrekturen vorgenommen werden. Für chronische, inhomogene und partielle Expositionen können nur gröbere Schätzungen von nicht zu niedrigen Expositionen an Individuen oder Gruppen vorgenommen werden. Eine retrospektive Bestimmung der Häufigkeiten von dizentrischen Chromosomen oder von Mikrokernen ist quantitativ wegen der begrenzten Lebensdauer der Lymphozyten nur maximal einige Monate nach einer Exposition möglich. In dieser Zeit kann anhand der Lymphozytenuntersuchung die Dosis geschätzt werden (z.B. bei einer Ganzkörperbestrahlung), die diese Zellen im peripheren Blut erhielten, oder falls eine signifikante Erhöhung der Aberrations-häufigkeit gegenüber der Kontrollrate vorhanden ist, kann zumindest eine - zwar unbekannte - Strahlenexposition vermutet werden. Eine zu späteren Zeitpunkten gefundene Erhöhung der Häufigkeit an dizentrischen Chromosomen repräsentiert die erhaltene Knochenmarksdosis.

Als erfolgreiches Beispiel für solches klassisches zytogenetisches Monitoring sind die Arbeiten von Ramalho und Nascimento (1991) im Fall des Goiânia-Unfalls und von Lindholm et al. (1996) im Fall des Unfalls in Kiisa (Estland) aufzuführen.

In bezug auf die, über viele Zellteilungen übertragbaren (transmissible) Aberrationen wie reziproke Translokationen, haben Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt, daß aufgrund ihrer hohen Persistenz, eine in Folge einer Strahlenexposition erhöhte Translokationsrate auch nach vielen Jahren und auch bei chronischen Expositionen, prinzipiell nachzuweisen ist (Straume et al. 1992, Lucas et al. 1992, Tanaka et al. 1996, Tucker et al. 1997). Weil Translokationen fast immer "stabil" sind, also bei Zellteilungen an die Tochterzellen weitergegeben werden, können diese Aberrationen auch viele Jahre nach einer Strahlenexposition nachgewiesen werden. Mit zunehmenden Zeitintervall zwischen einer akuten Exposition und der Translokationsbestimmung wird auch

in diesem Fall immer weniger die Dosis reflektiert, die die peripheren Lymphozyten bekommen haben (begrenzte Lebensdauer), dafür im zunehmenden Maße die Knochenmarksdosis, da die "neuen" Lymphozyten von den Knochenmarkstammzellen gebildet werden.

Wenn chromosomale Translokationen mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und nicht in gebänderten Karyogrammen bestimmt werden, werden in der Praxis nicht die genomischen sondern nur die entsprechenden partiellen (auf wenige Chromosomen bezogene) Translokationshäufigkeiten in ausgewählten Chromosomen bestimmt, die natürlich viel niedriger als die genomischen liegen. Aus diesem Grund müssen sehr viele Metaphasenzellen ausgewertet werden, um eine zuverlässige Schätzung der partiellen Häufigkeit zu erhalten. Unter der Voraussetzung, daß die strahleninduzierten Translokationshäufigkeiten der Chromosomenlänge proportional sind, ist es dann möglich, die genomische Translokationshäufigkeit anhand der experimentell bestimmten partiellen Häufigkeit zu berechnen (Lucas et al. 1989). Die Proportionalitätsvoraussetzung gilt streng genommen nur als Näherung (Tanaka et al. 1996), die Abweichungen in den über- oder unterproportional beteiligten Chromosomen (Knehr et al. 1996, Boei et al. 1997) sind allerdings nicht sehr groß. Die Berechnung der genomischen Häufigkeiten aus den partiellen Häufigkeiten würde einen kleineren Fehler bei der Dosissschätzung bedeuten als die interindividuelle Variabilität. Die genomische Translokationshäufigkeit in Lymphozyten aus "unbestrahlten" Kontrollpersonen ist - ähnlich wie im Fall der dizentrischen Chromosomen - niedrig: 4 bis 7 Translokationen pro 1.000 Zellen (z.B. Bender et al. 1988, Straume et al. 1992). Damit ist wiederum der Nachweis relativ niedriger Dosen möglich.

In den letzten Jahren wurden mehrere Studien veröffentlicht, in denen mit Hilfe der FISH-Methode Translokationshäufigkeiten (anhand 3 bis 5 fluoreszent hybridisierter Chromosomen) viele Jahre nach einer akuten Exposition (Hiroshima-Überlebende) oder nach einer langjährigen chronischen Exposition (Thorotrast-Patienten, beruflich strahlenexponierte Personen, Unfälle) untersucht worden sind (z.B. Natarajan et al. 1991, Straume et al. 1992, Lindholm et al. 1996, Tanaka et al. 1996, Tucker et al. 1997). Diese Arbeiten haben gezeigt, daß die Häufigkeit der stabilen, persistenten Translokationen als Maß für eine nicht zu niedrige, akute oder chronische Strahlenexposition geeignet ist.

Straume et al. (1992) haben Lymphozyten einer beruflich strahlenexponierten Person (36 Berufsjahre) untersucht. Bei dieser Person haben die Dosisüberwachungsunterlagen auf eine Gesamtdosis von 0,56 Sv hingedeutet. Die betreffende Person glaubte aber, eine höhere Dosis, und zwar etwa 2,5 Sv akkumuliert zu haben. Die genomische Translokationshäufigkeit war zwar signifikant höher als die entsprechende Kontrollrate, eine Dosis von 2,5 Sv konnte nicht bestätigt werden. Anhand der Translokationshäufigkeit wurde eine Dosis von 0,7 Sv geschätzt. Die mit FISH bestimmten Translokationshäufigkeiten unterschieden sich nicht von den Häufigkeiten, die unter Verwendung von gebänderten Chromosomen bestimmt worden sind. Die Häufigkeit von dizentrischen Chromosomen unterschied sich nicht von der entsprechenden Kontrollrate.

Die Eignung der Translokationen als Dosismaß bei chronischen Expositionen ist sehr schön in der Arbeit von Tucker et al. 1997 gezeigt. In dieser Arbeit wurden Lymphozyten von 81 Arbeitern der britischen Sellafield-Anlage (Windscale) die in fünf verschiedene Dosisgruppen aufgeteilt waren, analysiert. Translokationshäufigkeiten waren erst in den Gruppen mit größeren Dosen (ab 565 mSv) signifikant höher als die spontane Rate. Im Unterschied zu den Translokationen, betrug die Häufigkeit von dizentrischen Chromosomen einen konstanten Wert von ca. 0,0013 pro Zelle für alle fünf Dosisgruppen (1 bis 1108 mSv), und unterschieden sich somit nicht signifikant von der spontanen Rate. Die experimentellen Daten sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Die genomischen Translokationshäufigkeiten wurden aus den partiellen Häufigkeiten (Chromosomen 1, 3 und 4) nach Lucas et al.(1989) berechnet. Tucker et al. haben außerdem in ihrer Arbeit die beträchtliche interindividuelle Variabilität der Translokationshäufigkeit demonstriert (Abb.1). Diese Arbeit zeigt, daß bei langjährigen chronischen Expositionen mit kumulativen Dosen größer als 0,5 Sv eine signifikante Erhöhung der Translokationshäufigkeit nachweisbar ist. Ein Nachweis per se ist möglich, eine Quantifizierung in Anbetracht der beträchtlichen interindividuellen Variabilität wäre erst bei viel größeren Dosen möglich.

Bauchinger et al. (1996) haben versucht, mit Hilfe der Translokationshäufigkeit (partielle Häufigkeit anhand von Chromosomen 1, 4 und 12 bestimmt) in Lymphozyten von 25 Personen die 9 Häuser mit erhöhter Radonkonzentration (210 bis 3.000 Bqm⁻³) bewohnen, einen Unterschied zu der Kontrollrate in

Personen die nur dem Durchschnittswert von 50 Bqm^{-3} ausgesetzt sind, zu zeigen. Die höchste Knochenmarksdosis, die in dieser Gruppe erreicht werden könnte (für die höchste Radonkonzentration) ist kleiner als 100 mSv (Bauchinger et al. 1996). Die Translokationshäufigkeiten waren bei manchen Personen zwar leicht erhöht, der Unterschied war aber insgesamt nicht signifikant ($p < 0,10$). Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 8 zusammengestellt. Im Rahmen der normalen statistischen Möglichkeiten ist es nicht möglich, signifikante Erhöhungen in Translokationshäufigkeiten bei solchen niedrigen Dosen nachzuweisen.

Zusammenfassung

1. Aufgrund ihrer hohen Persistenz ist die Häufigkeit chromosomaler Translokationen auch bei langjährigen chronischen Expositionen als kumulatives Biodosimeter gut geeignet. Die einfachen, also aus jeweils unter Beteiligung von zwei Chromosomen entstandenen Translokationen werden als vollständige oder unvollständige ("terminale") reziproke Translokationen beobachtet. Bei Dosen $\geq 3 \text{ Gy}$ können unter Beteiligung mehrerer Chromosomen komplexe Austauschfiguren entstehen, wie z. B. dizentrische Chromosomen die auch eine Translokation beinhalten. Diese komplexe Aberrationen haben eine niedrige Persistenz, und bei kleinen Dosen spielen sie keine wesentliche Rolle (z. B. Simpson und Savage 1994). Bei langjährigen Expositionen spiegeln die beobachteten Häufigkeiten teilweise die Dosis der peripheren Lymphozyten, teilweise die Knochenmarksdosis wider.

2. Aufgrund der statistischen Unsicherheiten, die bei kleinen Dosen eine große Rolle spielen, aufgrund der interindividuellen Variabilität der strahleninduzierten Aberrationshäufigkeiten und letztendlich auch aufgrund der praktikablen Anzahl an ausgewerteten Lymphozyten, ist es sowohl für akute (Dizentrische oder Translokationen) als auch für chronische Strahlenexpositionen (Translokationen) nicht möglich, eine signifikante Erhöhung der entsprechenden Aberrationen pro Zelle bei Dosen unterhalb von 0,5 Sv nachzuweisen. Eine Quantifizierung ist aufgrund der interindividuellen Variabilität in bezug auf eine vorhandene Standard-Dosis-Effektkurve nur mit einer Unsicherheit von mindestens 20% möglich. Bei internen, inhomogenen und partiellen Bestrahlungen wird die Situation durch die nötigen Korrekturen noch komplizierter und eine Quantifizierung ist nur in speziellen Fällen möglich.

Literaturverzeichnis

Bauchinger, M. et al.: Quantification of FISH-painted chromosome aberrations after domestic radon exposure. *Int. J. Radiat. Biol.* 70, 657-663, 1996.

Boei, J. J. W. A. et al.: Differential involvement of chromosomes 1 and 4 in the formation of chromosomal aberrations in human lymphocytes after X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 72, 139-145, 1997.

Buckton, K. et al.: The estimation of lymphocyte life-span from studies on males treated with X-rays for ankylosing spondylitis. In: *Human Radiation Cytogenetics*, pp. 106-114. Eds.: Evans, H. J. et al., North-Holland, Amsterdam 1967.

Bauchinger, M. et al.: Time-effect relationship of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes after radiation therapy for seminoma. *Mutation Res.* 211, 265-272, 1989.

Bender, M. A. et al.: Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutation Res.* 196, 103-159, 1988.

Braselmann, H. et al.: Chromosome analysis in a population living in an area of Germany with the highest fallout deposition from the Chernobyl accident. *Mutation Res.* 283, 221-225, 1992.

Jha, A. N. and Sharma, T.: Enhanced frequency of chromosome aberrations in workers occupationally exposed to diagnostic X-rays. *Mutation Res.* 260, 343-348, 1991.

Knehr, S. et al.: Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* 70, 385-392, 1996.

Lindholm, C. et al.: Biodosimetry after accidental radiation exposure by conventional chromosome analysis and FISH. *Int. J. Radiat. Biol.* 70, 647-656, 1996.

Lloyd, D. C., Purrott, R. J., Reeder, E. J.: The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutation Res.* 72, 525-532, 1980.

Lloyd, D. C. et al.: Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced *in vitro* by very low doses of X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 61, 335-343, 1992.

Lucas, J. N. et al.: Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 35-44, 1989; Erratum, *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 201, 1989.

Lucas, J. N. et al.: Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 53-63, 1992.

Lucas, J. N. et al.: Dose-response curve for chromosome translocations measured in human lymphocytes exposed to ⁶⁰Co gamma rays. *Health Phys.* 68, 761-765, 1995.

Natarajan, A. T. et al.: A cytogenetic follow-up study of the victims of the radiation accident in Goiânia (Brazil). *Mutation Res.* 247, 103-111, 1991.

Ramalho, A. T. and Nascimento, A. C. H.: The fate of chromosomal aberrations in ¹³⁷Cs-exposed individuals in the Goiânia radiation accident. *Health Phys.* 60, 67-70, 1991.

Sasaki, M. S.: Use of lymphocyte chromosome aberrations in biological dosimetry: Possibilities and limitations. In: *Radiation-induced chromosome damage in man*, pp. 585-604. Eds.: Ishihara, T. and Sasaki, M. S., A.R. Liss, New York 1983.

Simpson, P. J. and Savage, J. R. K.: Identification of X-ray induced complex chromosome exchanges using fluorescence *in situ* hybridization: a comparison at two doses. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 629-632, 1994.

Straume, T. et al.: Biodosimetry for a radiation worker using multiple assays. *Health Phys.* 62, 122-130, 1992.

Tanaka, K. et al.: Chromosome aberration analysis in atomic bomb survivors and Thorotrast patients using two- and three-colour chromosome painting of chromosomal subsets. *Int. J. Radiat. Biol.* 70, 95-108, 1996.

Tucker, J. D. et al.: Biological dosimetry of radiation workers at the Sellafield nuclear facility. *Radiation Res.* 148, 216-226, 1997.

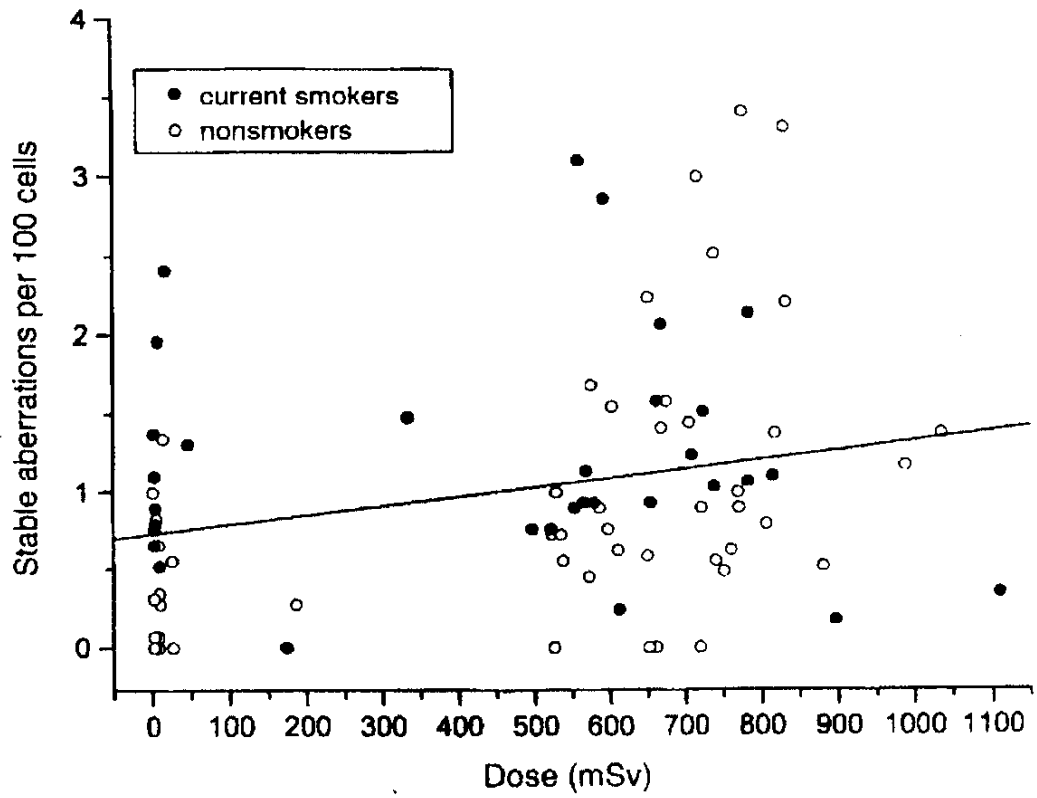


Abb. 1 Translokationshäufigkeit in Lymphozyten von 81 verschiedenen Spendern als Funktion der Dosis. Die Gerade ist durch lineare Regression angepaßt.

Tabelle 1 Nicht-klonale Aberrationen in Knochenmarkzellkolonien (aus der CBA/H Maus), die mit α -Teilchen oder Röntgenstrahlung bestrahlt worden sind und erst in späteren Zellzyklen nach Bestrahlung de novo aufgetreten sind *).

Dosis [Gy]	Kolonien mit nicht-klonalen Aberrationen	Metaphasen mit Aberrationen	Anzahl der Aberrationen in diesen Kolonien	
			Chromosomen-Typ	Chromatid-Typ
α -Teilchen 0,25	2 von 5	7 von 432	3	7
0,50	6 von 12	8 von 29	8	14
1,00	4 von 10	19 von 92	4	34
Röntgenstrahlung 3,00	0 von 86	26 von 107	0	0
Kontrollen	7 von 59	0	0	7

*) Übernommen aus Kadhim et al. (1992).

Tabelle 2 Nicht-klonale Aberrationen, die in Metaphase-Zellen der 1. bis 25. Subkultur nach Bestrahlung von menschlichen Hautfibroblasten mit schweren Ionen beobachtet wurden.

a) Neon-Ionen

Dosis [Gy]	0,62				1,24				2,48			
Subkultur	P1	P7	P15	P20	P1	P7	P20	P25	P1	P7	P20	P25
Zahl der ausgewerteten Metaphasen	15	20	20	23	33	20	19	19	20	21	22	12
Marker-Chromosomen	16	1	2	5	29	4	5	18	46	0	17	7
Derivat-Chromosomen	8	0	1	9	23	2	2	2	27	0	9	29
Dizentrische Chromosomen oder Telomerassoziationen	3	1	4	23	9	1	8	15	9	1	6	7

b) Argon-Ionen

Dosis [Gy]	1,93				3,86				7,72			
Subkultur	P5	P15	P20	P25	P3	P6	P16	P25	P3	P6	P20	P25
Zahl der ausgewerteten Metaphasen	22	20	21	12	21	21	22	22	16	20	24	20
Marker-Chromosomen	0	6	19	10	3	1	1	11	0	0	9	3
Derivat-Chromosomen	0	1	12	1	4	1	3	4	0	0	20	33
Dizentrische Chromosomen oder Telomerassoziationen	0	6	9	10	1	0	6	10	0	6	3	5

c) Blei-Ionen

Dosis [Gy]	43,4			
Subkultur	P5	P10	P15	P20
Zahl der ausgewerteten Metaphasen	20	20	24	24
Marker-Chromosomen	0	0	0	0
Derivat-Chromosomen	0	0	0	5
Dizentrische Chromosomen oder Telomerassoziationen	0	0	1	11

*) Kontrollen P1 bis P20: keine Aberrationen
Übernommen aus Martins et al. (1993)

Tabelle 3 Nicht-klonale Aberrationen in menschlichen Knochenmarkzellkolonien nach α -Teilchen-Bestrahlung *)

Spenderzellen	Kolonien mit Aberrationen		Metaphasen mit Aberrationen	
	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt
HBM-1	1/7	0/11	1/49	0/79
HBM-2	0/15	8/20	0/105	15/124
HBM-3	0/3	0/5	0/21	0/33
HBM-4	0/3	3/8	0/17	10/69

*) Diese Daten sind aus Versuchen mit 0.25 Gy und 0.5 Gy Bestrahlungsdosis gepoolt, da es keine signifikanten Unterschiede gab.
Übernommen aus Kadhim et al. (1995).

Tabelle 4 Nicht-klonale Aberrationen in bestrahlten Knochenmarkzellkolonien in drei verschiedenen Mäusestämmen sowie in zwei hybriden Mäusestämmen, die durch Kreuzung entstanden sind *)

Mausstamm	α -Teilchen Dosis [Gy]	Kolonien mit aberranten Zellen	Aberrante Zellen [%]
CBA/H	0	2 von 10	1,4
	0,5	16 von 26	9,7
DBA/2	0	4 von 18	1,9
	0,5	14 von 23	10,5
C57BL/6	0	1 von 16	0,7
	0,5	5 von 26	3,5
(C57BL/6x CBA/H)	0	8 von 32	2,8
	0,5	15 von 45	5,4
(C57BL/6x DBA/2)	0	6 von 31	2,3
	0,5	10 von 27	3,4

*) (Klonale Aberrationen wurden nicht beobachtet.)
Übernommen aus Watson et al. (1997)

Tabelle 5 Verlust oder Zugewinn des Y-Chromosoms in Milzzellen aus männlichen Mäusen, die an strahleninduzierter Leukämie (AML) nach einer Ganzkörperbestrahlung (D = 3 Gy, Röntgenstrahlung) erkrankt sind: 3 Beispiele *)

Mäusestamm	Zellen ohne Y-Chromosom [%]	Zellen an einem Y-Chromosom [%]	Zellen mit 2 bis 5 Y-Chromosomen [%]
CBA/H	5	35	60
CBA/H	3	17	80
B6D2F1	16	22	62

*) Übernommen aus Plumb et al. (1997)

Tabelle 6 Häufigkeit der TG^R-Zellen in primären und sekundären Knochenmarkzellkolonien der Maus, die verzögert nach Bestrahlung mit α -Teilchen, Röntgenstrahlung oder Neutronen aufgetreten sind *).

	Mutationshäufigkeit $\times 10^{-6}$	
	Primäre Kolonien	Sekundäre Kolonien
Kontrollen (unbestrahlt)	2,6 \pm 0,7	4,5 \pm 1,1
α -Teilchen D = 0,5 Gy	4,8 \pm 1,1	9,0 \pm 2,3
250 kV-Röntgenstrahlung D = 3 Gy	13,9 \pm 3,1	20,6 \pm 3,8
Neutronen D = 0,4 Gy (plus 0,2 Gy γ -Strahlung)	12,8 \pm 2,4	15,8 \pm 4,0

*) Übernommen aus Harper et al. (1997)

Tabelle 7 Zytogenetische Daten für 81 Arbeiter aus Sellafield

	Dosisgruppe				
	1	2	3	4	5
Dosisintervalle [mSv]	1 - 46	173 - 558	565 - 653	660 - 759	768 - 1108
Anzahl der Arbeiter	23	12	15	16	15
Anzahl der Raucher	10	6	6	5	5
Translokationen pro 100 Zellen	0,74 ± 0,13	0,86 ± 0,24	1,05 ± 0,19	1,24 ± 0,21	1,39 ± 0,25
Dizentrische pro 100 Zellen	0,16 ± 0,04	0,10 ± 0,06	0,11 ± 0,03	0,17 ± 0,06	0,13 ± 0,05
Mittleres Alter	54,4 ± 1,6	51,1 ± 1,9	56,3 ± 1,3	53,4 ± 1,4	57,6 ± 0,7
Mittlere Anzahl der Berufsjahre	14,3 ± 2,2	29,9 ± 2,2	32,9 ± 1,1	31,8 ± 1,1	35,5 ± 0,6
Mittlere Dosis [mSv]	9,4 ± 2,1	456,3 ± 41,0	603,9 ± 8,4	708,2 ± 8,3	857,8 ± 27,1
Dosis aus den Jahren 1987 - 1993	4,0 ± 1,2	35,4 ± 9,6	33,1 ± 7,1	34,4 ± 6,7	42,1 ± 7,3

*) Übernommen aus J. D. Tucker et al. (1997)

Tabelle 8 Aberrationshäufigkeiten in Lymphozyten von Personen, die in Häusern mit erhöhter Radonexposition wohnen bzw. von Kontrollpersonen *)

Nr.	Alter (Jahre)/ Geschlecht	Aberrationshäufigkeiten pro 1000 Zellen				
		Kumulative Radon- exposition P[Bq m-3 y]	Konventionell		FISH	
			Dizentrische	Anzahl der ausgewerteten Zellen	Translokationen F _G	Dizentrische F _G
1	31/f	5600	1	2470	5•1	1•3
2	62/m	5600	2	1487	10•6	6•4
3	57/f	6900	1	2437	6•5	0
4	10/f	8900	2	1367	4•6	2•3
5	6/m	4800	4	2727	4•6	0
6	23/m	1100	0	1017	6•2	0
7	61/f	5900	4 ^b	2302	15•1	4•1
8	65/m	4000	7 ^b	1002	53•7	9•5
9	55/f	3800	4 ^c	1575	4•0	4•0
10	51/m	11300	0	967	19•6	0
11	22/f	1300	2	3386	4•7	0
12	69/f	1900	0	1184	10•7	0
13	45/m	1200	3	2308	8•2	0
14	41/f	1700	0	2736	2•3	0
15	19/m	1600	0	2006	3•2	0
16	16/f	2800	1	2039	0	0
17	15/f	2800	1	3002	1•0	0
18	39/f	2100	0	2092	6•0	0
19	16/f	2000	0	2994	1•1	0
20	50/m	1600	0	1146	5•5	0
21	70/m	1100	1	1210	13•1	2•6
22	68/f	1300	2	1235	12•8	0
23	37/m	3900	0	1602	4•0	0
24	45/m	1300	2	1554	8•2	0
25	75/f	2300	1	1435	2•2	0
Kontrolle 32 Personen	38/m + f	-	-	34340	4,5 ± 0,6	-
Radongruppe 25 Personen	39/m + f	-	-	47280	6,8 ± 1,6	-

*) Übernommen aus M. Bauchinger et al. (1996)