

Academiejaar 2013-2014



Faculteit Farmaceutische, Biomedische en Diergeneeskundige wetenschappen

Onderwijscommissie Biochemie en Biotechnologie

Effecten van ioniserende straling op *in vitro* kankercellen

Door:

Els Soors

Masterproef voorgelegd tot het behalen van de graad van

Master in de Biochemie en Biotechnologie

Promotor: Dr. Marjan Moreels

Copromotor: Prof. Dr. Sylvia Dewilde

Begeleidster: Drs. Annelies Suetens

SCK•CEN, Laboratorium Radiobiologie, Boeretang 200, 2400 Mol

Dankwoord

Bij het begin van deze masterproef, die het eindpunt vormt van de opleiding biochemie en biotechnologie, zijn er een aantal mensen in het bijzonder die ik zou willen bedanken:

In de eerste plaats zou ik mijn promotor Dr. Marjan Moreels willen bedanken voor de warme ontvangst op het SCK•CEN. Zij heeft mij enorm geholpen bij het schrijven en de vormgeving van deze masterproef.

Mijn begeleidster Annelies Suetens dank ik voor haar goede begeleiding en haar hulp bij het schrijven van deze masterproef. Haar enthousiasme zorgde dat de laatste maanden fantastisch waren voor mij.

Mijn copromotor Prof. Dr. Sylvia Dewilde wil ik graag bedanken voor haar goede begeleiding en steun tijdens de voorbije maanden.

Ook wil ik Prof. Dr. Sarah Baatout bedanken voor de kans om in deze enthousiaste onderzoeksgroep mijn masterproef te mogen uitvoeren.

Verder dank ik iedereen van het laboratorium Radiobiologie en Microbiologie voor hun steun en raad tijdens de voorbije maanden. Bedankt voor de fijne momenten.

Dank aan Bart Marlein en Ludo Melis voor het uitvoeren van de bestralingsexperimenten met X-stralen.

Tot slot wil ik mijn ouders, broer, zus en vriend bedanken voor hun steun en vertrouwen gedurende mijn studies en deze masterproef.

Samenvatting

Bestraling met fotonen of X-stralen is de meest conventionele vorm van externe radiotherapie die gebruikt wordt voor de behandeling van kanker. Radiotherapie kan het DNA van cellen zodanig beschadigen, dat deze niet meer kunnen overleven. Typisch voor fotonen is dat de dosisafzetting ter hoogte van de huid en de eerste centimeters in het lichaam zeer hoog is. Hierna neemt de dosisafzetting exponentieel af naarmate de fotonenstralen verder in het lichaam binnendringen. Het gevolg daarvan is dat het moeilijker is om diepgelegen tumoren te behandelen. Hadrontherapie is een meer geavanceerde vorm van radiotherapie. Daarbij wordt gebruik gemaakt van versnelde ionen die opgewekt worden in deeltjesversnellers. Momenteel wordt hadrontherapie in verschillende landen reeds toegepast voor de behandeling van specifieke type kankers. Deze geladen deeltjes zetten hun energie af op een bepaalde diepte in het weefsel, afhankelijk van de initiële energie van de deeltjesstraal. Deze piek in energieafzetting wordt de Bragg piek genoemd. Nadat het maximum aan energieafzetting bereikt is aan het einde van het bereik van de geladen deeltjes, wordt dit gevolgd door een zeer sterke daling van de dosis. Bij gevolg ontvangt het omliggende gezonde weefsel een veel lagere dosis. De hoge lokale energieafzetting produceert complexe DNA schade in vergelijking met X-stralen. Hadrontherapie is voor eenzelfde dosis meer effectief in het induceren van biologische effecten in vergelijking met fotontherapie. Er is echter nog weinig geweten over de verschillen in biologische effecten tussen de conventionele vorm van therapie en hadrontherapie of over de effecten van hadrontherapie op lange termijn.

In deze masterproef werden humane prostaat adenocarcinoma kankercellen (PC3) en humane colon adenocarcinoma kankercellen (Caco-2) als *in vitro* model gebruikt om de effecten van X-stralen, protonen en C-ionen te analyseren.

De stralingsgevoeligheid van de PC3 prostaatkanker cellen en Caco-2 colonkanker cellen werd bestudeerd met behulp van de *colony survival assay*. Hieruit is gebleken dat na de bestraling van deze *in vitro* humane kankercellen met hogere dosissen X-stralen of C-ionen er een omgekeerd evenredig verband is tussen de overlevingsfractie en de bestralingsdosis. PC3 prostaatkanker cellen waren meer gevoelig aan X-stralen en C-ionen vergeleken met Caco-2 colonkanker cellen. De efficiëntie van de C-ionen was beter bij de meer radioresistente PC3 cellen dan bij de Caco-2 cellen. Na de bestraling van PC3 prostaatkanker cellen met lage dosissen X-stralen (0.1 en 0.25 Gy) werd er echter een stijging in celdood waargenomen. De PC3 prostaatkanker cellen waren dus hypergevoelig voor de lage dosissen X-stralen. De stralingsgevoeligheid van de PC3 prostaatkanker cellen voor protonen werd ook onderzocht, maar dit leverde onverwachte resultaten op waaruit geen besluit kon genomen worden.

Het verloop van de celcyclus na bestraling werd geanalyseerd aan de hand van flow cytometrie, na kleuring met propidium iodide. De bestraling van PC3 prostaatkanker cellen resulteerde in een persistente G2 arrest na de bestraling met een hoge dosis X-stralen (5 Gy) of C-ionen (2 Gy). De arrest van de celcyclus in de G2 fase verhinderde dat de kankercellen zouden delen, omdat de G2 arrest verhinderde dat de cellen een mitotische deling zouden ondergaan. Er was dus een lagere dosis C-ionen nodig, vergeleken met X-stralen, om eenzelfde effect te verkrijgen. Bestraling met hoge dosissen X-stralen (2 en 5 Gy) leidde tot een G2 arrest in Caco-2 colonkanker cellen die maar werd waargenomen tot 24 uur na bestraling. De bestraling met 2 Gy C-ionen op Caco-2 colonkanker cellen resulteerde in een G2 arrest die werd waargenomen tot 48 uur na de bestraling. Een lagere dosis C-ionen induceerde dus een G2 arrest die langer werd waargenomen, ten opzichte van de bestraling met X-stralen.

Abstract

Irradiation with photons or X-rays is the standard form for external radiotherapy that is used to treat cancer. Radiotherapy can severely damage DNA and thereby causing cell death. Photons have a high dose deposit at the entrance channel and the first centimetres of the body, this is followed by an exponential decline with the tissue depth. Consequently, it is difficult to treat deeply seeded tumours. Hadron therapy is a more advanced form of external radiotherapy, which uses accelerated ions generated by particle accelerators. Currently, hadron therapy is used worldwide to treat specific types of cancers. Charged particles deposit their energy at a specific tissue depth, depending on the initial energy of the particle beam. The maximum energy deposit is called Bragg peak. Subsequently, at the end of the particles range, there is a steep dose fall-off. The surrounding healthy tissue receives a much lower dose. The high local energy deposit results in complex DNA damage compared to X-rays. Compared to photon therapy, hadron therapy is more effective in inducing biological effects for the same dose. Unfortunately, there is still little known about the differences in biological effects between X-ray therapy and hadron therapy and about the long-term effects of hadron therapy.

In this master thesis, human prostate adenocarcinoma cancer cells (PC3) and human colon adenocarcinoma cancer cells (Caco-2) were used as *in vitro* models to analyse the effects of X-rays, protons and C-ions.

The radiation sensitivity of PC3 prostate cancer cells and Caco-2 colon cancer cells were studied using colony survival assay. *In vitro* irradiation of the cancer cell models showed that the surviving fraction is inversely related to radiation doses. PC3 prostate cancer cells were more sensitive to X-rays and C-ions compared to Caco-2 colon cancer cells. The efficiency of C-ion beams was better with the radioresistant PC3 prostate cancer cells compared to Caco-2 colon cancer cells. After low dose radiation exposure (0.1 and 0.25 Gy) of PC3 prostate cancer cells, we observed an increase in cell death. The PC3 prostate cancer cells were hypersensitive to low doses of X-rays. The radiosensitivity of PC3 prostate cancer cells were also investigated using proton beams. However we observed unexpected results, whereby no conclusions could be drawn.

Cell cycle analysis was performed by flow cytometry, using propidium iodide staining. Irradiation of PC3 prostate cancer cells resulted in persistent G2 arrest after radiation with high doses X-rays (5 Gy) or C-ions (2 Gy). So compared to X-rays, a lower dose of C-ions induced the same cell cycle arrest effect. On the other hand, Caco-2 cells irradiated with 2 and 5 Gy X-rays and 2Gy C-ions led to a G2 arrest that was observed 24 and 48 hours after irradiation, respectively. In comparison to X-rays, a lower dose of C-ions induced a G2 arrest that persisted longer.

Inhoudstabel

Dankwoord	I
Samenvatting	II
Abstract	III
Lijst met gebruikte afkortingen.....	IV
1 Inleiding	1
1.1 Algemene inleiding	1
1.1.1 Kanker	1
1.1.2 Kankertherapie.....	1
1.2 Externe radiotherapie	1
1.2.1 X-stralen	2
1.2.2 Hadrontherapie	3
1.3 Biologische effecten van ioniserende straling	9
1.3.1 Directe en indirecte DNA schade	9
1.3.2 Soorten DNA schade	10
1.4 Respons op straling geïnduceerde DNA schade.....	10
1.4.1 DSB leiden tot de vorming van γ -H2AX foci.....	10
1.4.2 Herstel van DSB	11
2 Doelstelling	15
3 Materialen en methoden	17
3.1 Celcultuur	17
3.2 Verdubbelingstijd PC3 en Caco-2 cellen.....	17
3.3 Bestralingsexperimenten met X-stralen.....	18
3.3.1 Bestralingscondities X-stralen.....	18
3.3.2 Colony survival assay	18
3.3.3 Cell cycle assay	19
3.3.4 γ -H2AX assay.....	19
3.4 Bestralingsexperimenten met C-ionen.....	20
3.4.1 Bestralingscondities C-ionen	20
3.4.2 Colony survival assay	21
3.4.3 Cell cycle assay	22
3.4.4 γ -H2AX assay.....	22
3.5 Bestralingsexperimenten met protonen	22
3.5.1 Bestralingscondities protonen.....	22
3.5.2 Colony survival assay	24
3.6 Experimentele set-up.....	24
4 Resultaten	25

4.1 Verdubbelingstijd PC3 en Caco-2 cellen.....	25
4.2 Colony survival assay	25
4.2.1 PC3 prostaatkanker cellen	25
4.2.2 Caco-2 colonkanker cellen	26
4.3 Cell cycle assay.....	27
4.3.1 PC3 cellen bestraald met X-stralen.....	27
4.3.2 PC3 cellen bestraald met C-ionen	29
4.3.3 Caco-2 cellen bestraald met X-stralen	31
4.3.4 Caco-2 cellen bestraald met C-ionen	33
4.4 γ -H2AX assay	35
5 Discussie	37
5.1 Stralingsgevoeligheid van PC3 en Caco-2 cellijnen.....	37
5.2 Impact van lage en hoge LET ioniserende stralen op het verloop van de celcyclus	38
5.3 De invloed van lage en hoge LET bestralingen op de vorming en het verdwijnen van de γ -H2AX foci	39
6 Besluit.....	41
Referenties	43
Appendix.....	47

Lijst met gebruikte afkortingen

ALTAÏS	Accélérateur Linéaire Tandetron pour l'Analyse et l'Implantation des Solides
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Ar	Argon
ATCC	American Type Culture Collection
Bevalac	<i>Billions of eV synchrotron</i> (Bevatron) gelinkt met SuperHILAC
BI	Betrouwbaarheidsinterval
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Caco-2	Humane colon adenocarcinoma kankercellen
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DSB	Dubbelstrengige DNA breuken
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
eV	Elektronvolt
FBS	Foetaal kalfsserum
FITC	Fluoresceïn isothiocyanaat
GANIL	<i>Le Grand Accélérateur National d'Ions Lourds</i>
GSI	<i>Gesellschaft für Schwerionenforschung</i>
Gy	Gray
HR	Homologe recombinatie
IMRT	Intensiteit-gemoduleerde 3D radiotherapie
LARN	Laboratoire d'Analyse par Reactions Nucleaires
LET	Lineaire energie transfer
NEAA	Niet-essentiële aminozuren
NHEJ	Niet-homologe <i>end joining</i>
NIRS	<i>National Institute of Radiological Sciences</i>
PBS	Fosfaat-gebufferde fysiologische zoutoplossing
PC3	Prostaat adenocarcinoma kankercellen
PE	<i>Plating efficiency</i>
PET	Polyethyleentereftalaat
PFA	Paraformaldehyde
PI	Propidium iodide
RBE	Relatieve biologische effectiviteit
rcf	Relatieve centrifugaalkracht
ROS	Reactieve zuurstofverbindingen
SF	<i>Surviving fraction</i>
SOBP	<i>Spread-out Bragg piek</i>
SSB	<i>DNA single stranded breaks</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

1 Inleiding

1.1 Algemene inleiding

Kanker is in de westerse wereld nog steeds één van de meest voorkomende ziektes met een hoog sterftecijfer. Daarom is het noodzakelijk dat er verder op zoek gegaan wordt naar behandelingen die de overlevingskansen doen stijgen. Radiotherapie of bestraling is een veelgebruikte therapie voor verschillende soorten kankers. Onderzoekers proberen om de conventionele vorm van externe radiotherapie (X-stralen) te optimaliseren om zo de tumor efficiënter te behandelen en het normale omliggende weefsel te sparen. Naast conventionele radiotherapie zijn er ondertussen ook meer geavanceerde vormen van kankerbestraling beschikbaar; zo kan er niet alleen met X-stralen bestraald worden, maar ook met versnelde, geladen deeltjes zoals protonen en C-ionen. Deze vorm van externe radiotherapie wordt ook hadrontherapie genoemd. Experimenten en klinische studies hebben in het verleden reeds aangetoond dat deze vorm van bestraling zowel fysische als biologische voordelen heeft. Momenteel wordt hadrontherapie in verschillende landen reeds toegepast voor de behandeling van specifieke type kankers. Er is echter nog weinig geweten over de verschillen in biologische effecten tussen beide therapieën. In deze masterthesis zullen de effecten van verschillende stralingssoorten (X-stralen, protonen en C-ionen) onderzocht worden op twee *in vitro* humane kankercellijnen.

1.1.1 Kanker

De term 'kanker' is een verzamelnaam voor een groep ziekten waarin abnormale cellen op een ongecontroleerde manier delen. Kwaadaardige kankercellen zijn in staat zijn om andere weefsels binnen te dringen en uit te zaaien (= metastase) naar andere organen of weefsels in het lichaam via de bloedbaan of de lymfevaten. Zowel externe factoren (levenswijze, omgevingsfactoren, infecties, e.a.) als interne factoren (erfelijke mutaties, hormonen, ontregeld afweersysteem, e.a.) liggen aan de oorzaak van het ontstaan van kanker (Stichting tegen Kanker, 2014; National Cancer Institute, 2014).

1.1.2 Kankertherapie

De behandeling van kanker is in elke patiënt anders en vraagt een specifieke aanpak. De keuze van de behandeling hangt af van meerdere factoren zoals het type kanker, de leeftijd van de persoon, het ontwikkelingsstadium van de ziekte, de algemene gezondheid van de persoon, e.a. Kanker kan behandeld worden met één therapie of met een combinatie van verschillende therapieën. Chirurgie, radiotherapie en chemotherapie zijn de meest toegepaste therapieën (Vlaamse Liga Tegen Kanker, 2014).

1.2 Externe radiotherapie

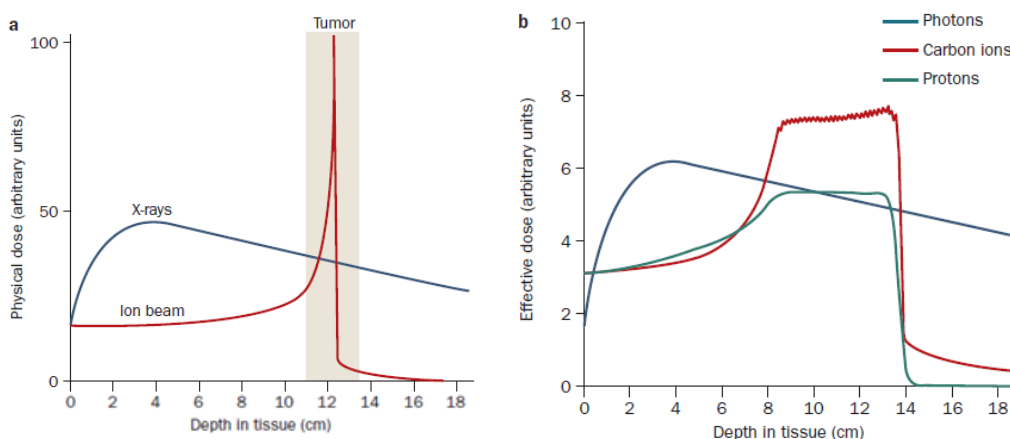
Bij radiotherapie worden ioniserende stralen gebruikt voor de behandeling van kanker. Deze ioniserende stralen kunnen moleculen splitsen in ionen. Ioniserende stralen kunnen het DNA van de cellen zodanig beschadigen dat deze cellen niet meer in staat zijn te delen en te overleven. Er kan een onderscheid gemaakt worden tussen interne en externe radiotherapie. Bij interne radiotherapie wordt de stralingsbron via een katheter in de patiënt ingebracht nabij de tumor. Bij externe radiotherapie bevindt de stralingsbron

zich buiten het lichaam en worden de ioniserende stralen gericht op het te behandelen gebied.

1.2.1 X-stralen

Bestraling met X-stralen is de meest conventionele vorm van externe radiotherapie die gebruikt wordt voor de behandeling van kanker. De reden waarom radiotherapie ingezet wordt in de strijd tegen kanker is omdat ioniserende straling het DNA van de cellen zodanig kan beschadigen, dat deze niet meer kunnen overleven (Borek, 2004).

X-stralen bestaan uit fotonen en kunnen geproduceerd worden door elektronen met energieën van 5 tot 200 keV te laten invallen op een target in een afgesloten vacuümbuis. De fotonen die daarbij vrijkomen hebben een energie afhankelijk van de oorspronkelijke elektronenstraal. De energie van de hoog-energetische fotonen die voor radiotherapie worden opgewekt, varieert van 5 - 25 MeV. X-stralen die weefsel binnendringen, worden door het lichaam geabsorbeerd en zetten hun energie af op een disperse manier. De hoeveelheid energie die afgezet wordt per μm wordt lineaire energie transfer (*linear energy transfer*, LET) genoemd en wordt uitgedrukt in $\text{keV}/\mu\text{m}$ (Allen et al, 2011). Fotonen hebben een lage LET ($< 10 \text{ keV}/\mu\text{m}$). Typisch voor fotonen is dat de dosisafzetting ter hoogte van de huid en de eerste centimeters in het lichaam zeer hoog is. Hierna neemt de bestralingsdosis exponentieel af naarmate de fotonenstralen verder in het lichaam binnendringen (Fig. 1a) (Fokas et al., 2009; Durante & Loeffler, 2010). Dit veroorzaakt in veel gevallen bijwerkingen die afhankelijk zijn van de zone die bestraald werd (bv. huidirritatie, darmirritatie, e.a.) (Vlaamse Liga Tegen Kanker, 2014). Door de daling van de effectieve bestralingsdosis met de diepte van het weefsel is het dan ook moeilijker om diepgelegen tumoren efficiënt te behandelen. Bij conventionele radiotherapie levert een accelerator voor elektronen ioniserende stralen aan de tumormassa. Om de tumor efficiënter te bestralen werd intensiteit-gemoduleerde 3D radiotherapie (*intensity-modulated radiation therapy*, IMRT) geïntroduceerd. Hierbij worden meerdere fotonstralen vanuit verschillende hoeken naar de tumor gericht. Elke bestralingsbundel varieert tijdens de bestraling van vorm en intensiteit, waardoor een hoge dosis X-stralen aan de tumor wordt gegeven en het omliggende normale weefsel een minimale dosis krijgt (Vlaamse Liga tegen Kanker, 2014; Kargiotis et al., 2010; Allen et al., 2011). Bij prostaatkanker wordt IMRT veel gebruikt om de omliggende vitale organen (zoals rectum en blaas) een zo laag mogelijke bestralingsdosis te geven.



Figuur 1. Het profiel van de dosisverdeling voor fotonen, C-ionen en protonen. a) Vergelijking van de fysieke dosissen in functie van de diepte in het weefsel voor X-stralen en geladen deeltjes. b) Om tumoren volledig te kunnen behandelen, wordt de Bragg piek verbreed. De *spread-out* Bragg piek levert een constante biologisch effectieve dosis in de tumor (Durante & Loeffler, 2010).

1.2.2 Hadrontherapie

Zoals reeds werd vermeld is hadrontherapie een meer geavanceerde vorm van externe radiotherapie. Daarbij wordt gebruik gemaakt van versnelde ionen die opgewekt worden in deeltjesversnellers of cyclotrons/synchrotrons. Momenteel worden protonen en C-ionen gebruikt in therapie.

1.2.2.1 Geschiedenis

Het cyclotron werd in 1930 uitgevonden door Dr. Ernest Lawrence aan de Universiteit van Californië (Verenigde Staten). In 1932 beschreef Sir James Chadwick voor het eerst de productie van **neutronen** en zes jaar later begon Dr. Robert Stone met klinische trials waarin hij tumoren behandelde met neutronen die geproduceerd werden door het cyclotron van Ernest Lawrence. De klinische trials werden echter onderbroken omdat het cyclotron nodig was tijdens WO II (Ando & Kase, 2009).

In 1946 stelde Robert Wilson voor dat **protonen** misschien voor therapie van kanker gebruikt konden worden (Wilson, 1946). Wilson beschreef dat tot dan enkel neutronen, γ -stralen en artificieel geproduceerde *radioactivities* gebruikt werden in medische toepassingen. Sedert de productie van hoog-energetische protonen aan de hand van cyclotrons zijn de protonen in staat om tot elk deel van het lichaam door te dringen. Zo heeft een 125 MeV protonstraal een penetratiediepte van 12 cm in weefsel en een 200 MeV protonstraal een penetratiediepte van wel 27 cm. Naast de toegenomen penetratiediepte bleek ook de dosisafzetting van deze protonen voordeliger te zijn. De protonen gaan recht door het weefsel en komen op een bepaalde diepte, afhankelijk van de oorspronkelijke energie van het proton, tot stilstand. Dit gaat gepaard met een enorme dosisafzetting (Bragg piek, wordt beschreven in paragraaf 2.2.2). Wilson suggereerde dat de modulatie van deeltjesstralen (protonen, e.a.) het mogelijk maakt om ook grote tumoren te behandelen, omdat er door modulatie van de deeltjesstralen een stabiele dosisafzetting is ter hoogte van de hele tumor. Reeds in 1954 werden de eerste protonbehandelingen uitgevoerd door de hypofyse te bestralen van 26 patiënten met metastatische borstkanker. Hiervoor werd de deeltjesversneller van het Berkeley Radiation Laboratory (Verenigde Staten) gebruikt die oorspronkelijk gebouwd werd voor fysica-onderzoek (Tobias *et al.*, 1958).

In 1965 werd opnieuw gestart met **neutronbehandelingen** in het Hammersmith ziekenhuis in Londen. Door de initiële succesvolle resultaten die hierbij bekomen werden in klinische studies, werden ook neutron-bestralingsfaciliteiten opgericht in de Verenigde Staten en in Japan. Men heeft echter de behandelingen met neutronen moeten stopzetten omdat de veelbelovende resultaten van het Hammersmith ziekenhuis niet herhaald konden worden in trials in andere faciliteiten. Errington *et al.* (1991), bijvoorbeeld startte in februari 1986 met de behandeling van 151 patiënten met lokaal vergevorderde, niet-metastatische pelvische kanker (27 baarmoederhalskanker, 69 blaaskanker, zeven prostaatcancer en 48 rectumkanker). Vier jaar later, in februari 1990, werden deze behandelingen echter stopgezet door verhoogde metastase en verhoogde mortaliteit ten gevolge van de behandeling bij deze patiënten (met uitzondering van prostaatcancer) (Errington *et al.*, 1991).

De eerste fase I/II trials met **C-ionen** zijn begonnen in 1975 in het Lawrence Berkeley Laboratorium te Californië (Verenigde Staten) in samenwerking met het San Francisco Medical Center (Verenigde Staten). Er werd bestraald met onder andere He, C, Ne, Si en Ar door gebruik te maken van een 184-Inch cyclotron en het Bevalac (*Billions of eV synchrotron* (Bevatron) gelinkt met SuperHILAC). Na sluiting van het Bevalac werd de C-iontherapie zowel in Japan als in Duitsland verdergezet. In 1994 startte de C-iontherapie in het NIRS (*National Institute of Radiological Sciences*) in Chiba (Japan). Dit werd gevolgd door het GSI (*Gesellschaft für Schwerionenforschung*) in Darmstadt (Duitsland) (Ando & Kase, 2009).

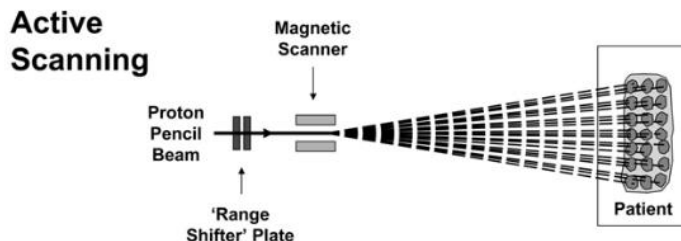
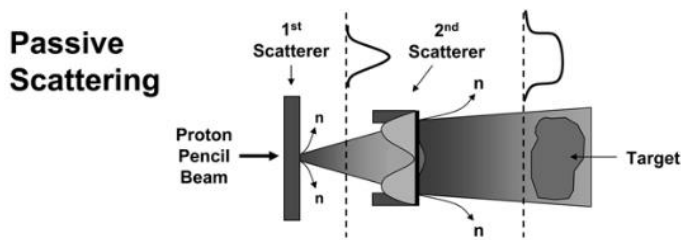
1.2.2.2 Fysische eigenschappen van protonen en C-ionen

Bragg piek:

Versnelde protonen en C-ionen kunnen gebruikt worden voor kankertherapie omwille van hun superieure dosisafzetting ten opzichte van X-stralen. Geladen deeltjes zetten hun energie af op een bepaalde diepte in het weefsel, afhankelijk van de initiële energie van de hadronstraal. Deze piek in energieafzetting wordt de **Bragg piek** genoemd (Durante & Loeffler, 2010). Figuur 1a toont dat deze Bragg piek zeer smal is.

Door deeltjesstralen, zoals protonstralen en C-ionstralen, met verschillende energieën te superponeren wordt een *spread-out* Bragg piek (SOBP) verkregen. Het weefsel dat voor de tumor ligt, ontvangt een stralingsdosis die aanzienlijk lager is dan bij de bestraling met X-stralen. In de regio van de SOBP krijgt de tumor een vrij constante biologische effectieve dosis (Fig. 1b) (Durante & Loeffler, 2010). Nadat het maximum aan energieafzetting bereikt is aan het einde van het bereik van het geladen deeltje, wordt dit gevolgd door een zeer sterke daling van de dosis. Het weefsel achter de tumor ontvangt dus een zeer lage stralingsdosis na bestraling met geladen deeltjes in vergelijking met X-stralen. Er is echter nog een bepaalde dosis waar te nemen na de scherpe daling van de dosis. Dit komt doordat de impact van de deeltjesstralen op het weefsel leidt tot de vorming van nucleaire fragmenten die een kleine residuele bestraling geven voorbij de tumor (Jäkel, 2006). Figuur 1b toont duidelijk dat de 'achtergrondstraling' van C-ionen hoger ligt dan bij protonen.

Een SOBP kan op twee verschillende manieren geproduceerd worden; via een passieve modulatie of via een actieve modulatie. De passieve modulatie werd eerst ontwikkeld en wordt nog steeds het meest gebruikt. Hierbij wordt de deeltjesstraal, afkomstig van de deeltjesversneller, verbreed door een roterend wiel met variërende dikte of een vaste filter met wigvormige gravures in het pad van de straal te plaatsen. Eén enkele verstrooiing verbreedt de deeltjesstraal voldoende voor behandelingen waarbij een klein tumorvolume bestraald moet worden. Indien grotere velden verkregen moeten worden, wordt een tweede verstrooiing toegepast om een uniforme dosis over de hele tumor te garanderen. Verder zijn er ook nog patiënt specifieke compensatoren en collimatoren nodig. Het doel van een collimator is om de deeltjesstraal te versmallen, terwijl een compensator zorgt voor een deeltjesstraal met een aangepaste intensiteit; de tumor ontvangt de gewenste dosis, terwijl het omliggende gezonde weefsel een lagere dosis ontvangt (Marc & Langenegger, 2010). Een belangrijk nadeel van deze passieve modulatie is dat er neutronen gevormd worden doordat de deeltjesstraal door verschillende materialen gaat. Dit levert een secundaire bron van straling die leidt tot een verhoogde effectieve dosis al vanaf het moment dat de deeltjesstraal de huid binnendringt. Hierdoor ontvangt het normale omliggende weefsel dan ook een verhoogde effectieve dosis (Hall, 2006). Een andere manier om de deeltjesstraal te moduleren is via actieve modulatie. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de elektrische lading van de ionen om een deeltjes straal te focussen. Daarna wordt de deeltjesstraal zowel verticaal als horizontaal gescand door twee paar magneten. Bovendien kan de energie van de synchrotron veranderd worden met elke puls om het bereik van de deeltjes in de weefsels aan te passen. Op deze manier kan de tumor in 3D gescand worden en kunnen tumoren met een onregelmatige vorm bestraald worden zonder gebruik te maken van passieve absorbeerders of patiënt specifieke compensatoren of collimatoren. Er moeten echter wel inspanningen geleverd worden om de *on-line* positie en intensiteit van de deeltjesstraal te controleren om te verzekeren dat de patiënt veilig en accuraat bestraald wordt (Jäkel, 2006).



Figuur 2. Passieve en actieve modulatie van de deeltjesstraal. De straal van geladen deeltjes die afkomstig is van een cyclotron of een synchrotron is zeer smal. Om de volledige tumor te kunnen behandelen, moet de deeltjesstraal gemoduleerd worden. Dit kan zowel via passieve als via actieve modulatie (Hall, 2006).

Lineaire energie transfer:

De hoeveelheid energie die door ioniserende straling afgezet wordt per μm wordt lineaire energie transfer (LET) genoemd en wordt uitgedrukt in $\text{keV}/\mu\text{m}$ (Allen *et al.*, 2011). X-stralen hebben, zoals reeds vermeld een lage LET ($< 10 \text{ keV}/\mu\text{m}$). Geladen deeltjes zoals protonen en C-ionen hebben een hoge LET ter hoogte van de Bragg piek (Durante & Loeffler, 2010).

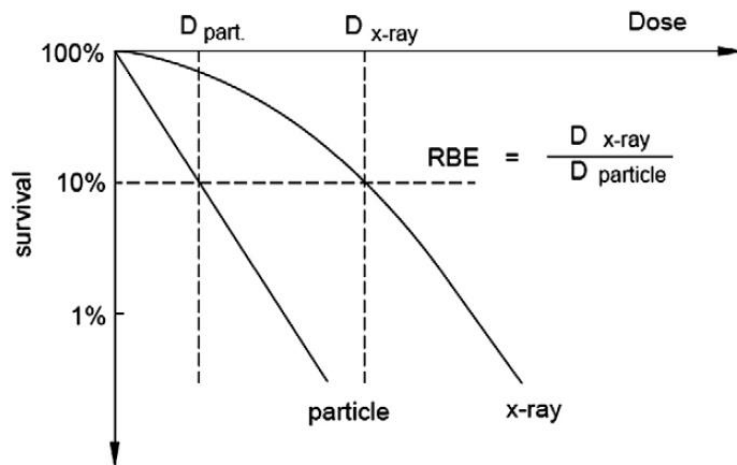
Therapeutische protonstralen (70 – 250 MeV) die het lichaam binnendringen hebben een lage LET ($\sim 0.1 - 1 \text{ keV}/\mu\text{m}$, *sparse ionizing*) ter hoogte van de huid en het normale weefsel (Allen *et al.*, 2011). In de laatste microns van het bereik van deze geladen deeltjes stijgt de LET enorm, tot $\sim 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ (hoge LET, *densely ionizing*) (Raju, 1995; Girdhani, Sachs & Hlatky, 2013).

C-ionstralen met een energie van 200 – 430 MeV worden gebruikt voor de behandeling van kanker. Deze C-ionen hebben net als protonen een lage LET ter hoogte van de huid en het normale weefsel en een hoge LET ter hoogte van het tumorweefsel. De LET van C-ionen kan stijgen tot 100 – 120 $\text{keV}/\mu\text{m}$ ter hoogte van de tumor (Allen *et al.*, 2011).

1.2.2.3 Biologische eigenschappen van protonen en C-ionen

Relatieve biologische effectiviteit:

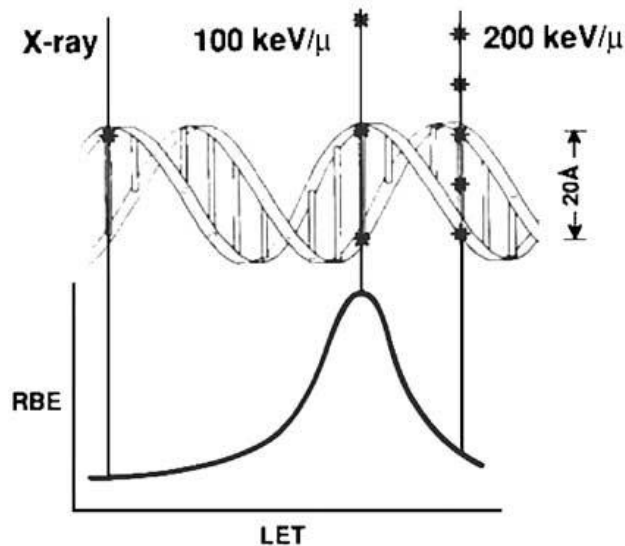
De relatieve biologische effectiviteit (RBE) van protonen is vergelijkbaar met die van X-stralen. Figuur 3 toont de verhouding van de dosis X-stralen tot de dosis geladen deeltjes (protonen of C-ionen) die hetzelfde biologisch effect oplevert waaruit de RBE kan berekend worden (Durante & Loeffler, 2010).



Figuur 3. Definitie van RBE. De RBE is de verhouding van de dosis X-stralen tot de dosis geladen deeltjes (protonen, C-ionen, e.a.) die hetzelfde biologisch effect oplevert. Deze dosis wordt bepaald aan de hand van een overlevingsfractie van 10% (Fokas *et al.*, 2009).

RBE is geen constante waarde, maar is afhankelijk van de referentiebestraling, de dosis, het dosisdebiet, het biologisch systeem en het geanalyseerde biologische eindpunt (Girdhani, Sachs & Hlatky, 2013). In figuur 3 is dit biologisch eindpunt een overlevingsfractie van 10%. Verder zijn ook de LET en het type ion bepalend voor de RBE van de straling. Figuur 4 toont het verband tussen de RBE en de LET. De RBE stijgt met stijgende LET en bereikt een maximum bij 100 keV/μm. Bij deze hoge LET stralen is er een hoge dichtheid aan ioniserende events ter hoogte van de Bragg piek en valt de gemiddelde afstand tussen twee ioniserende events ongeveer samen met de diameter van de DNA dubbelhelix (20 Å of 2 nm). Dit geeft de hoogste kans op dubbelstrengige DNA breuken (*DNA double stranded breaks, DSB*) veroorzaakt door één enkel deeltje. Bij lage LET X-stralen is er een lage dichtheid aan ioniserende events en is er weinig kans dat één track DSB veroorzaakt, de RBE van X-stralen is 1 (= referentiebestraling). Bij een LET hoger dan 100 keV/μm daalt de RBE. Er zijn meer ioniserende events waardoor er ook DSB worden gevormd, maar er is sprake van overkill. De deeltjesstraal met een hogere dichtheid aan ioniserende events is namelijk even effectief per track, maar minder effectief per eenheidsdosis voor de productie van DSB (Hall & Hei, 2003).

Het biologisch voordeel van C-ionen ten opzichte van fotonen en protonen is te wijten aan de hogere RBE van C-ionen. Dit komt omdat C-ionen zwaarder zijn en meer biologische schade aanrichten. C-ionen hebben dus voor eenzelfde dosis een groter biologisch effect (Durante & Loeffler, 2010). De RBE van C-ionen varieert van ~1 ter hoogte van de huid tot 3 - 4 in het midden van de SOBP, terwijl de RBE van therapeutische protonen niet veel verschillend is van de RBE van X-stralen; ~1.1 - 1.2 in het midden van de SOBP (Allen *et al.*, 2011; Durante & Loeffler, 2010; Girdhani, Sachs & Hlatky, 2013).



Figuur 4. RBE in functie van de LET. De RBE stijgt met stijgende LET en bereikt een maximum bij een LET van 100 keV/μm. Bij deze LET valt de gemiddelde afstand tussen de ioniserende events ongeveer samen met de diameter van de DNA dubbel helix. Hier is de kans op DSB, veroorzaakt door één enkel deeltje, dan ook het hoogste. Bij een LET hoger dan 100 keV/μm daalt de RBE (Hall & Hei, 2003).

1.2.2.4 Toepassingen van hadrontherapie

Pediatrische kankers:

Bij de behandeling van kanker bij kinderen met radiotherapie zijn er enkele punten waar speciale aandacht aan besteed moet worden. Groeiende kinderen hebben meer gezond delend weefsel dan een volwassen patiënt en zijn daarom gevoeliger voor straling geïnduceerde kankers. Ioniserende stralen hebben een bepaald bereik. Dat bereik is hetzelfde bij het bestralen van een volwassene of een kind. Wanneer een kind op dezelfde manier bestraald wordt, zal het normale weefsel rondom de tumor, dat in verhouding kleiner is dan dat van een volwassene, proportioneel aan een hogere dosis worden blootgesteld. Als laatste is er de genetische gevoeligheid. In veel gevallen van kinderkanker is er sprake van een *germline* mutatie en de kans bestaat dat deze mutatie bijdraagt tot een verhoogde gevoeligheid voor straling geïnduceerde secundaire kankers (Hall, 2006).

IMRT wordt veelvuldig toegepast bij de behandeling van pediatrische kankers. Het nadeel van IMRT is de kans op de ontwikkeling van straling geïnduceerde secundaire kankers. Bij kinderen is de kans op de ontwikkeling van straling geïnduceerde secundaire tumoren groter, omdat kinderen in principe een hogere levensverwachting hebben van volwassen kankerpatiënten. Kinderen die voor leukemie met radiotherapie behandeld zijn ter hoogte van de schedel hebben 23 keer meer risico op het ontwikkelen van hersentumoren (Miralbell *et al.*, 2002). De verklaring hiervoor is dat IMRT gebruik maakt van meer bestralingsbundels om de dosis zo efficiënt mogelijk ter hoogte van de tumor af te zetten, maar daardoor wordt ook meer normaal omliggend weefsel blootgesteld aan straling. **Hoog-energetische protonen** hebben een betere dosisverdeling vergeleken met X-stralen. Hierdoor wordt gezond omliggend weefsel gespaard. Uit een studie van Miralbell *et al.* (2002) blijkt dat er na behandeling van pediatrische patiënten met rhabdomyosarcomen (kwaadaardige tumor van dwarsgestreept spierweefsel in het hoofd-hals gebied) en medulloblastomen (kwaadaardige hersentumor) met scannende bundels protonen er een significante daling is in de incidentie van straling geïnduceerde secundaire kankers (Miralbell *et al.*, 2002; Hall, 2006).

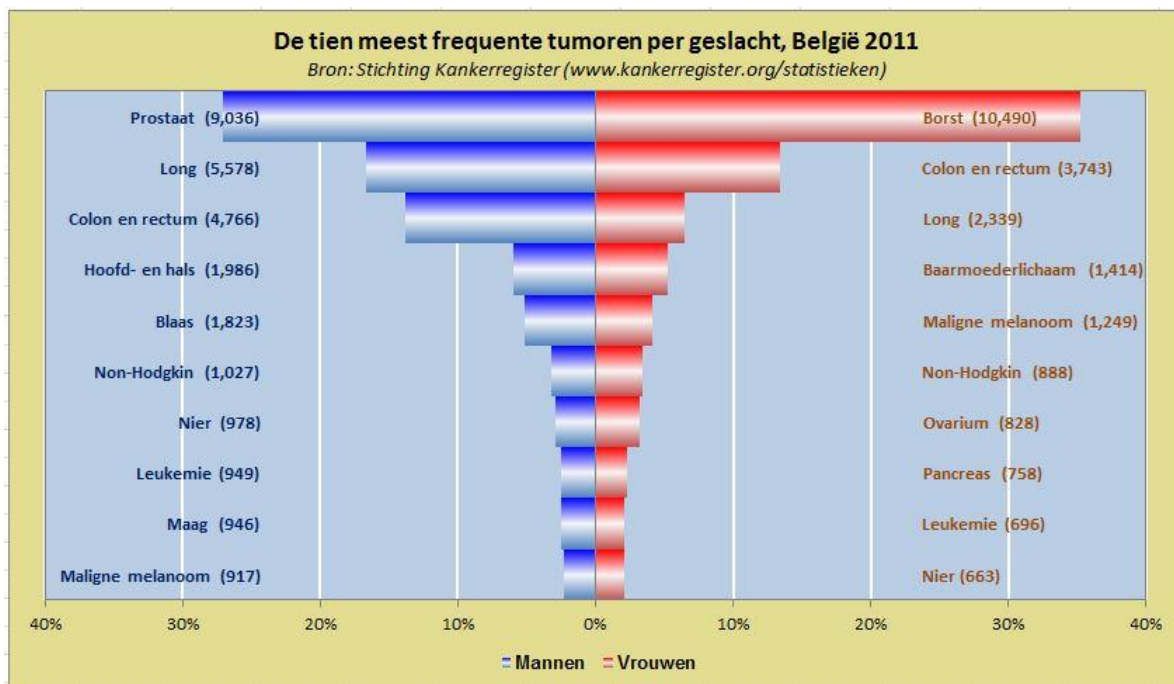
Tumoren in de buurt van stralingsgevoelig weefsel:

Bij de behandeling van kankers die gelegen zijn nabij stralingsgevoelig weefsel (zoals colon, longen of maag) en waarvoor de conventionele therapie niet voldoet, kan **protontherapie** of **C-iontherapie** een oplossing bieden. Door de superieure dosisafzetting van de deeltjesstralen wordt het omliggende stralingsgevoelige weefsel gespaard, waarbij de kans op de ontwikkeling van secundaire kwaadaardigheden afneemt (Lievens, 2007).

Radioresistente tumoren:

De respons van tumoren op ioniserende stralen is afhankelijk van de stralingsgevoeligheid. Voor de behandeling van radioresistente tumoren is een hogere bestralingsdosis nodig, maar de stralingsbelasting van het gezonde omliggende weefsel is een kritische en limiterende factor. Voor radioresistente tumoren bieden **C-ionen** daarom een oplossing omwille van hun hogere radiobiologische effectiviteit vergeleken met de conventionele therapie (Lievens, 2007).

Een voorbeeld van een radioresistente kanker is prostaatkanker. Prostaatkanker is in België de meest voorkomende kanker bij mannen (Fig. 5). In 2011 registreerde de Stichting Kankerregistratie nog 9039 nieuwe prostaatkanker patiënten. Op dit moment zijn er verschillende behandelingen mogelijk voor prostaatkanker; een operatie waarbij de prostaat volledig wordt weggenomen, radiotherapie (zowel externe als interne bestraling) en hormonale therapie. Om de kans op genezing te maximaliseren worden soms verschillende behandelingen gecombineerd (Vlaamse Liga tegen Kanker).



Figuur 5. Overzicht van de tien meest voorkomende kankers bij mannen en bij vrouwen in België in 2011 (Stichting Kankerregistratie, 2011).

Bij de behandeling via radiotherapie zijn hoge dosissen vereist, tot 70 Gy en meer. Wanneer de prostaattumor na externe of interne radiotherapie terugkomt, is de kanker nog radioresistenter dan voor de radiotherapie. De cellen hebben namelijk een mechanisme gevonden om zichzelf te beschermen tegen bestralingen. De prostaat is omgeven door vitale organen zoals de blaas, het rectum en de geslachtsorganen. De blaas en het rectum zijn bovendien zeer gevoelig voor ioniserende straling. Voor de behandeling van de prostaatkanker worden er hoge dosissen gebruikt en daarbij moet het omliggende weefsels zo veel mogelijk gespaard worden van blootstelling aan straling.

Hoge LET protonen en C-ionen kunnen omwille van hun specifieke dosisprofiel gebruikt worden bij de behandeling van prostaatkanker. Omdat C-ionen een hoge radiobiologische effectiviteit hebben, zijn deze stralen uitermate geschikt om radioresistente prostaatkanker te behandelen.

Herval van een tumor:

Indien de tumor geruime tijd na de behandeling terugkomt, kan bestraling met **C-ionen** toegepast worden. De bestralingsbelasting op het normale omliggende weefsel dat bij de vorige behandeling reeds bestraald werd, blijft hierdoor beperkt (Lievens, 2007).

1.2.2.5 Hadrontherapie faciliteiten

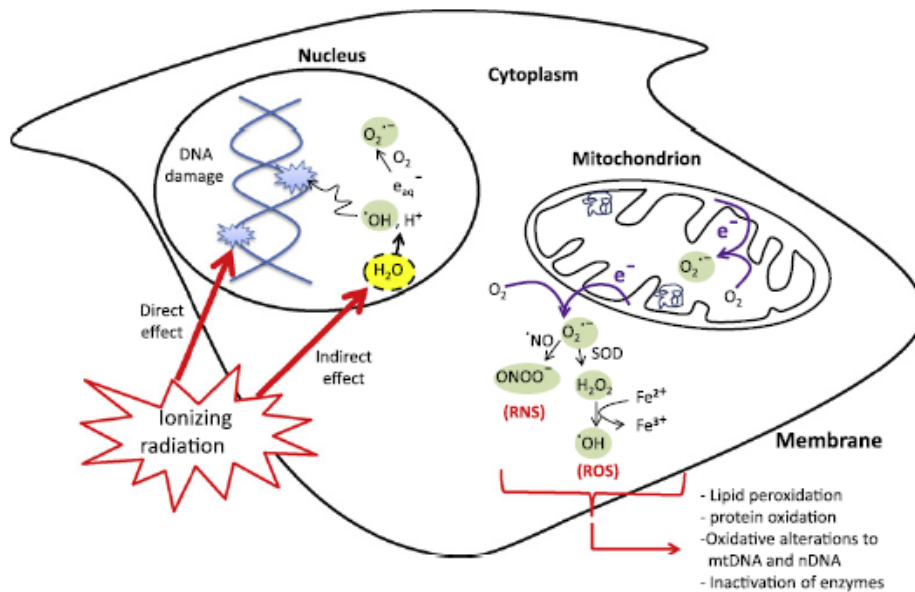
Vandaag zijn er 41 protontherapie centra verspreid over 15 landen waar ondertussen meer dan 80 000 patiënten een behandeling hebben ondergaan. Met meer dan 20 protonbehandelingsfaciliteiten die nog in opbouw zijn, wordt verwacht dat protontherapie een belangrijke tak van radiotherapie wordt in de toekomst (Particle Therapy Co-Operative Group, 2014). Ook in België worden plannen gemaakt om een centrum voor protontherapie op te richten. Dit centrum zal gebouwd worden op campus Gasthuisberg van het UZ Leuven in samenwerking met het UZ Saint-Luc (*Université catholique de Louvain*, UCL), het UZ Gent en IBA (UZ Leuven, 2014).

Wereldwijd zijn er momenteel ook zeven behandelingscentra waar C-ionen gebruikt worden. Hier werden in totaal bijna 13 000 patiënten behandeld (Particle Therapy Co-Operative Group, 2014).

1.3 Biologische effecten van ioniserende straling

1.3.1 Directe en indirecte DNA schade

Bestraling met ioniserende stralen kan DNA schade induceren. De ioniserende straling kan zowel via directe als indirecte ionisatie schade toebrengen aan de cel (Fig. 6). Bij directe ionisatie wordt het DNA rechtstreeks beschadigd. Radiolyse van water veroorzaakt indirecte DNA schade. Water, dat overvloedig (~80%) in de cel aanwezig is, absorbeert energie van de ioniserende stralen. Dit resulteert enerzijds in de ionisatie van water en anderzijds in de excitatie van de watermoleculen (Azzam, Jay-Gerin & Pain, 2012). De resulterende species zijn zeer onstabiel en ondergaan dus een snelle reorganisatie. De reactieve zuurstofverbindingen (*reactive oxygen species*, ROS) reageren met elkaar of met de omgeving wat leidt tot de productie van organische radicalen (Fig. 6). Ongeveer 2/3 van de schade aangericht door **lage LET X-stralen**, wordt **indirect** veroorzaakt door de acties van **ROS**, die op zijn beurt het DNA beschadigt (Azzam, Jay-Gerin & Pain, 2012). Bij bestralingen met geladen deeltjes met een **hoge LET**, zoals protonen en C-ionen, wordt de DNA schade voornamelijk veroorzaakt door de **directe ionisatie van het DNA**.



Figuur 6. Directe en indirecte effecten van ioniserende bestraling op macromoleculen. De absorptie van ioniserende stralen door levende cellen zorgt enerzijds voor een directe ionisatie van atomaire structuren en anderzijds voor een indirecte ionisatie door de radiolyse van water waarbij ROS gevormd wordt (Azzam, Jay-Gerin & Pain, 2012).

1.3.2 Soorten DNA schade

Ioniserende stralen induceren verschillende soorten DNA schade waaronder modificatie van basen, vorming van abasische plaatsen, DNA intra- en interstrengige crosslinks, DNA-proteïne crosslinks, enkelstrengige DNA breuken (*DNA single stranded breaks*, SSB), DSB en geclusterde lesies (Azzam, Jay-Gerin & Pain, 2012; Girdhani, Sachs & Hlatky, 2013; Sahbani *et al.*, 2014). DSB worden beschouwd als de meest ernstige vorm van DNA schade. DSB die geïnduceerd werden door ioniserende stralen kunnen verschillen in complexiteit (Jeggio & Löbrich, 2006; Bee *et al.*, 2013). Bestralingen met geladen deeltjes met een hoge LET leiden tot de vorming van ernstige DNA schade ter hoogte van de tumor. Typische DNA lesies voor hoge LET deeltjesstralen zijn DSB. Er kunnen ook clusters van DNA schade gevormd worden (Bee *et al.*, 2013). Deze geclusterde lesies worden in de literatuur beschreven als twee of meerdere DNA lesies die binnen enkele windingen van de DNA dubbelhelix gelegen zijn (Girdhani, Sachs & Hlatky, 2013). De complexiteit en de ernst van de DNA schade stijgt met toenemende LET. Geclusterde lesies met een hoge complexiteit zijn zeer moeilijk te herstellen. Theoretische studies suggereren dat lage LET bestralingen, naast de geïsoleerde lesies, clusters kunnen creëren met ~10 lesies. Stralen met een hoge LET daarentegen zijn in staat om nog complexere DNA schade aan te richten, tot zelfs 25 lesies per cluster (Hada & Georgakilas, 2008).

1.4 Respons op straling geïnduceerde DNA schade

1.4.1 DSB leiden tot de vorming van γ -H2AX foci

Bestraling met ioniserende stralen leidt tot de vorming van DSB (Fig. 4). Door de hoge lokale energieafzetting bij hoge LET deeltjesstralen kunnen zeer complexe types DSB gevormd worden (Prize *et al.*, 2001). Eén van de eerste gebeurtenissen die plaatsvindt na de vorming van DSB is de fosforylatie van histon H2AX (γ -H2AX). H2AX is een variant van histon H2A en werd voor het eerst waargenomen in de jaren '80. Er zijn vier 'core

histon families': H4, H3, H2B en H2A. Acht histonen, twee van elke histonfamilie, gaan binden met DNA en vormen een nucleosoom (Redon *et al.*, 2002). Nucleosomen zorgen voor een efficiënte en compacte opvouwing van het DNA. H2AX omvat ~10% van het nucleosomale H2A in humane cellen (Valdiglesias *et al.*, 2013).

De DNA schade foci of γ -H2AX foci kunnen op twee manieren gekwantificeerd worden met behulp van antilichamen; via immunofluorescentie-microscopie of via flow cytometrie. Bij de microscopische visualisatie van de γ -H2AX foci is het mogelijk om zowel de DSB te localiseren als te kwantificeren. Het aantal foci dat per nucleus gevormd wordt, is een maat voor het aantal geïnduceerde DSB.

De tijdsafhankelijke afname van γ -H2AX kan beschouwd worden als een reflectie van de herstelkinetiek van de straling geïnduceerde DSB. Verschillende studies hebben de kinetiek van het DSB herstel beschreven, zowel na bestraling met lage LET X-stralen als met hoge LET C-ionen. In een studie van Schmid *et al.* (2010) werden HeLa cellen bestraald met 70 kV X-stralen of 55 MeV C-ionen. De intensiteit van de γ -H2AX fluorescentie werd weergegeven in functie van de tijd en de data werd geanalyseerd aan de hand van een bi-exponentiële vergelijking met één snelle en één trage component van de γ -H2AX afname. Beide componenten speelden een rol in de γ -H2AX afname na bestraling met lage en hoge LET. De bijdrage van de trage component was echter groter na de bestraling met C-ionen dan na bestraling met X-stralen. Dit kan te wijten zijn aan de meer complexe vorm van DSB na bestraling met hoge LET.

1.4.2 Herstel van DSB

Er zijn twee belangrijke pathways in zoogdiercellen om DSB te herstellen; niet-homologe *end joining* (NHEJ) en homologe recombinatie (HR). De pathway die geactiveerd wordt is afhankelijk van de fase van de celcyclus. Het proces van NHEJ verloopt veel sneller van dat van HR (Schmid *et al.*, 2010).

1.4.2.1 Celcyclus en checkpoints

De celcyclus bestaat uit twee fasen: de interfase (G1, S en G2 fase) en de mitotische deling. Tijdens de interfase groeien de cellen en wordt het DNA gerepliceerd. Zo bereiden de cellen zich voor op een mitotische deling. Tijdens de G1 fase groeien de cellen en worden bepaalde enzymen aangemaakt die nodig zijn voor de DNA synthese. De DNA synthese vindt plaats tijdens de S fase. De G2 fase wordt gekenmerkt door celgroei en voorbereiding op de mitose. Daarna volgt de mitotische celdeling waarbij twee identieke dochtercellen gevormd worden (Alberts *et al.*, 2008).

Op verschillende plaatsen in de celcyclus zijn er controlepunten of checkpoints (Fig. 7). Deze checkpoints zijn controlemechanismen die de celdeling controleren en reguleren. De belangrijkste checkpoints komen voor op het einde van de G1 fase, tijdens de S fase, op het einde van de G2 fase en tijdens de anafase van de mitotische deling (Alberts *et al.*, 2008).

Einde G1 fase:

Om te voorkomen dat cellen met beschadigd DNA in de S fase komen, is er een checkpoint op het einde van de G1 fase. De cel kan tijdelijk in arrest gaan, waardoor er meer tijd is om de schade te herstellen alvorens verder de celcyclus te doorlopen. Indien de DNA schade niet hersteld kan worden, wordt apoptose geïnduceerd.

Intra-S fase checkpoint:

Het intra-S fase checkpoint controleert de DNA integriteit. Gemuteerde basen worden niet gerepliceerd en mogelijke fouten kunnen hersteld worden tijdens de DNA replicatie.

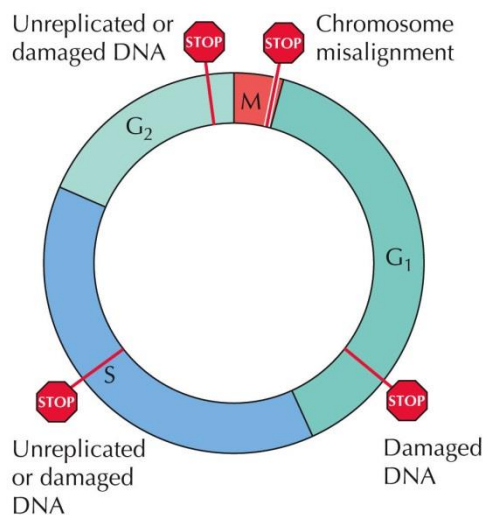
Wanneer cellen met beschadigd DNA of met carcinogene mutaties toch prolifereren, kan dit leiden tot het ontstaan van een tumor.

Einde van de G₂ fase:

De arrest in de G₂ fase is een belangrijk checkpoint bij DNA schade. Het checkpoint op het einde van de G₂ fase heeft als doel om te controleren of de cel aan alle voorwaarden voldoet om een mitotische deling te ondergaan. Onder andere de grootte van de cel en de DNA inhoud worden gecontroleerd. Indien er fouten worden waargenomen bij het checkpoint, gaat de cel in G₂ arrest.

Begin van de anafase:

Het checkpoint aan het begin van de anafase controleert of de chromosomen tijdens de metafase goed gealigneerd zijn op het equatoriaal vlak en of draden vanuit de centrosomen goed gehecht zijn op het centromeer van de chromatiden. Dit checkpoint is belangrijk om een gelijke verdeling van de chromosomen over de twee dochtercellen te garanderen (Alberts *et al.*, 2008).



Figuur 7. Verloop van de celcyclus en overzicht van de checkpoints. Het proces van DNA replicatie en celdeling verloopt via een strikt gecoördineerd proces in eukaryote cellen. De DNA replicatie (S fase) en de mitose (M) worden gescheiden door de G₁ en de G₂ fase. Op verschillende tijdstippen in de celcyclus zijn er controlepunten, deze hebben de functie om de celcyclus te controleren en te reguleren (Cooper, 2006).

1.4.2.2 Herstelmechanismen

Het herstelmechanisme dat zal optreden om de DSB te herstellen is afhankelijk van de fase van de celcyclus. NHEJ kan in alle fasen van de celcyclus optreden omdat er weinig of geen homologe sequenties vereist zijn tussen de DNA einden. Het herstel van DSB door HR vereist daarentegen veel homologe sequenties. Dit proces kan enkel worden geactiveerd tijdens de late S fase, wanneer zusterchromatiden beschikbaar zijn om de breuk te herstellen (Schmid *et al.*, 2010; Bee *et al.*, 2013). NHEJ is meer gevoelig voor fouten omdat er geen homologe sequenties gebruikt worden om de breuk te herstellen. Defecten in het proces van NHEJ doet de stralingsgevoeligheid stijgen (Schmid *et al.*, 2010).

1.4.2.3 Verschillende impact op de celcyclus na bestraling met lage en hoge LET ioniserende stralen

Algemeen geldt dat cellen het meest radioresistent zijn in de S fase en het meest gevoelig aan straling in de G₁ en de G₂ en M fasen. De straling geïnduceerde DNA schade kan zorgen dat de celcyclus vertraagt in de G₁, S en G₂ fasen. De arrest van de celcyclus kan de cel voldoende tijd geven om de DNA schade te herstellen. Wanneer cellen bestraald

worden met **lage LET** ioniserende stralen geldt dat cellen in de S fase meer radioresistent zijn dan cellen in andere fasen van de celcyclus. Dit is te verklaren doordat, naast NHEJ, het herstelmechanisme van HR de DSB kunnen herstellen in de late S fase aangezien er dan homologe sequenties aanwezig zijn (Hall & Giaccia, 2006).

Hoge LET ioniserende stralen hebben een hogere dichtheid aan ioniserende events dan stralingsbundels met een lage LET. Bestraling met hoge LET stralingsbundels resulteert in geclusterde DNA lesies waarbij DSB dicht bij elkaar gelegen zijn. Er worden dus meer kleine DSB fragmenten (~70 baseparen) gevormd (Wang *et al.*, 2009; Schipler & Iliakis, 2013). Ku proteïnen, een sleutelcomponent van de NHEJ pathway, binden moeilijker op beide uiteindes van de dubbelstrengige DNA fragmenten, omdat deze proteïnen aan beide uiteindes fragmenten van ~30 baseparen nodig hebben om op te binden (Schipler & Iliakis, 2013). Dit is noodzakelijk om DSB in geclusterde lesies efficiënt te herstellen. Doordat de Ku-proteïnen niet efficiënt kunnen binden, leidt dit uiteindelijk tot een minder efficiënte NHEJ en dus een grotere gevoeligheid voor straling (Wang *et al.*, 2009).

2 Doelstelling

Het Studiecentrum voor Kernenergie, SCK•CEN, is opgericht in 1952. Sindsdien speelt het SCK•CEN een pioniersrol op vlak van nucleaire wetenschap en techniek. Het SCK•CEN is een stichting van openbaar nut, dus de onderzoeken staan in het teken van het welzijn van de burger, de overheid, de gezondheidszorg, de industrie en de wetenschap. Zo zijn thema's als stralingsbescherming, veilige en duurzame opslag van radioactief afval, veiligheid van nucleaire installaties en ontwikkeling van innovatieve nucleaire installaties hot topics. Er zijn drie wetenschappelijke instituten op het SCK•CEN. De eenheid Radiobiologie valt onder het Instituut voor Milieu, Gezondheid en Veiligheid (SCK•CEN, 2012).

Deze masterthesis kadert in het hadron project van het SCK•CEN en heeft als doel om de *in vitro* effecten van verschillende stralingssoorten op humane kankercellen te bestuderen. Hadrontherapie wordt in verschillende landen reeds toegepast voor kankertherapie. Er is echter nog weinig geweten over de verschillen in biologische effecten tussen de conventionele vorm van therapie en hadrontherapie of over de effecten van hadrontherapie op lange termijn.

In deze studie wordt onderzoek gedaan naar de gevolgen van drie verschillende soorten bestraling op humane prostaat adenocarcinoma kankercellen en humane colon adenocarcinoma kankercellen. Verschillende technieken en assays worden hiervoor gebruikt. De humane kankercellen worden bestraald met X-stralen, protonen of C-ionen. De RBE van de protonstralen en C-ionstralen zal vervolgens bepaald worden. Gebruik makend van de *colony survival assay* wordt het aantal cellen bepaald dat in staat is om te overleven en kolonies te vormen na bestraling.

Met behulp van de *cell cycle assay* zal de impact van bestraling op het verloop van de celcyclus in de humane kankercellen geanalyseerd worden. Aan de hand van flow cytometrie zal het percentage aan cellen in verschillende fasen van de celcyclus onderzocht worden.

Ten slotte wordt de hoeveelheid DNA schade en bijhorend herstel gemeten aan de hand van het aantal DSB die geïnduceerd werden door ioniserende straling. De DSB zullen gevisualiseerd worden met behulp van de γ -H2AX assay waarbij γ -H2AX foci waargenomen worden met immunofluorescentie-microscopie.

3 Materialen en methoden

3.1 Celcultuur

PC3 (ATCC CRL1435) cellen zijn humane prostaat adenocarcinoma kankercellen en werden aangekocht bij American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, Verenigde Staten). De PC3 cellen werden gekweekt in Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (F-12K) medium (ATCC) waaraan 10% foetaal kalfsersum (*fetal bovine serum*, FBS; Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, Verenigde Staten) werd toegevoegd.

Caco-2 (ATCC HTB37) cellen zijn humane colon adenocarcinoma kankercellen en werden eveneens aangekocht via ATCC. De Caco-2 cellen werden gekweekt in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) waaraan 1% niet-essentiële aminozuren (NEAA; Gibco) en 10% FBS (Gibco) werden toegevoegd.

Beide cellijnen werden geïncubeerd bij 37°C in een vochtige atmosfeer met 5% CO₂. De cellen werden gekweekt in celcultuurflessen met een filterdop (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Duitsland). Het medium werd drie maal per week vervangen en de cellen werden gesplitst als deze meer dan 80% confluent waren. Alvorens de cellen te splitsen, werden de cellen getrypsiniseerd. Hiervoor werd het medium verwijderd en werden de cellen gespoeld met een fosfaat-gebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS; PBS tabletten Gibco). Nadat 0.25% trypsine in EDTA (ethyleendiaminetetra-azijnzuur; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Verenigde Staten) werd toegevoegd, werden de cellen gedurende 5 minuten (PC3 cellen) of 10 minuten (Caco-2 cellen) geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂. Vervolgens werd celcultuurmedium toegevoegd om het trypsine te neutraliseren, zodat het de celwand niet verder werd aantast. Ten slotte werden de cellen overgebracht naar een centrifugeerbuisje (Cellstar) en gecentrifugeerd (Centrifuge 5810; Eppendorf AG, Hamburg, Duitsland) gedurende 4 minuten aan 200 relatieve centrifugaalkracht (*relative centrifugal force*, rcf). De pellet werd geresuspendeerd in medium en deze celsuspensie werd uitverdeeld in nieuwe celcultuurflessen volgens de aanbevolen subcultiveringsverhouding (1:3 tot 1:6 voor PC3 cellen; 1:4 tot 1:6 voor Caco-2 cellen).

3.2 Verdubbelingstijd PC3 en Caco-2 cellen

Om de verdubbelingstijd te bepalen van de 2 cellijnen werden 10⁵ cellen uitgeplaat in elke well van een 6-well plaat (Cellstar). De vier volgende dagen werden dagelijks drie wells per cellijn getrypsiniseerd zodat het aantal cellen per well bepaald kon worden. Het tijdstip van de trypsinisatie werd nauwkeurig bijgehouden. Voordat 1 ml trypsine (Sigma-Aldrich) werd toegevoegd aan elke well, werd eerst gespoeld met PBS (Gibco). Na trypsinisatie werd 2 ml celcultuurmedium toegevoegd (DMEM in het geval van de PC3 cellen en F-12K bij de Caco-2 cellen) en werd alles overgebracht naar een centrifugeerbuisje (Cellstar). De stalen werden gedurende 4 minuten gecentrifugeerd aan 200 rcf. Nadat het supernatans volledig afgenomen werd, werd de pellet geresuspendeerd in 1 ml PBS (Gibco). Met behulp van de geautomatiseerde Moxi Z celteller (ORFLO, Hailey, ID, Verenigde Staten) werd het aantal cellen bepaald.

Het aantal cellen werd vervolgens uitgezet in functie van de tijd. De analyse van de verdubbelingstijd werd uitgevoerd aan de hand van de exponentiële groei vergelijking via niet lineaire regressie in GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, Verenigde Staten).

3.3 Bestralingsexperimenten met X-stralen

3.3.1 Bestralingscondities X-stralen

De cellen werden bestraald met verschillende dosissen X-stralen (LET < 10 keV/μm), aan een dosisdebiet van 0.25 Gy/min in de bestralingsfaciliteit van het SCK•CEN (Pantak HF420 RX machine; 250 kV, 15 mA, 1.2 mm Al equivalent en 1 mm Cu-gefilterde X-stralen). De bestraling van de celcultuurflessen gebeurde in een horizontale positie.

3.3.2 Colony survival assay

Om de stralingsgevoeligheid na te gaan, werden PC3 cellen en Caco-2 cellen bestraald met verschillende dosissen X-stralen (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 en 5 Gy). Per dosis werden twee replica's verwerkt. Twee dagen voor de bestraling werden 10⁵ cellen uitgeplaat in celcultuurflessen van 25 cm². Voorafgaand aan de bestraling werd het medium vervangen. Onmiddellijk na de bestraling werden de cellen getrypsiniseerd. De pellet werd geresuspendeerd in F-12K medium (ATCC) waarin 10% FBS (Gibco) en 1% antibiotica werden toegevoegd (10 000 U penicilline en 10 mg streptomycine per ml in 0.9% NaCl) (Sigma-Aldrich). Het aantal cellen werd bepaald met behulp van Moxi Z. Celsuspensies met de gewenste concentraties werden vervolgens aangemaakt aan de hand van de concentraties weergegeven in tabel I.

TABEL I Concentratie celsuspensies voor de colony survival assay na bestraling met X-stralen

	Concentratie 1 (in 5ml)	Concentratie 2 (in 5ml)	Concentratie 3 (in 5ml)
Controle	800	1200	/
0.1 Gy	800	1200	/
0.25 Gy	1000	1500	/
0.5 Gy	2000	3000	4000
1 Gy	3000	4000	5000
2 Gy	4000	6000	8000
3 Gy	6000	9000	12000
5 Gy	5000	10000	15000

In 24-well platen (Cellstar) werd éénmaal 500 μl van deze celsuspensies uitgeplaat. In 6-well platen (Cellstar) werd 500 μl van deze celsuspensies in triplicaat uitgeplaat in 2 ml celcultuurmedium waaraan 1% antibiotica (Sigma-Aldrich) werd toegevoegd. De volgende dag werden de cellen in de 24-well platen gefixeerd en gekleurd in een oplossing van 6% glutaraaldehyde (Sigma-Aldrich) en 0.5% kristalviolet (Sigma-Aldrich). De cellen werden minstens 20 minuten met deze kristalvioletooplossing geïncubeerd. Resterende kleurstof werd uit de 24-well plaat verwijderd met 40% ethanol en vervolgens werd er nog gespoeld met Milli-Q. De 6-well platen werden gedurende elf dagen geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂ zodat kolonies konden vormen. De kolonies werden via dezelfde methode gefixeerd en gekleurd. Om de *plating efficiency* (PE) te bepalen moeten zowel het aantal cellen als het aantal gevormde kolonies gekend zijn. Daarom werden de cellen in de 24-well platen geteld met behulp van een stereomicroscop (OLYMPUS SZX12) en de kolonies in de 6-well platen werden geteld met een tel-pen (Colony counter, Handy Type, Bio Kobe, Japan). Enkel kolonies met meer dan 50 cellen werden geteld. De PE (%) geeft het aantal kolonies weer per aantal geïnoculeerde cellen (Franken *et al.*, 2006):

$$PE = \frac{\text{aantal kolonies}}{\text{aantal geïnoculeerde cellen}}$$

Het aantal kolonies dat gevormd werd na bestraling van de cellen wordt weergegeven in de overlevingsfractie (*surviving fraction*, SF) (Munshi, Hobbs & Meyn, 2005):

$$SF = \frac{PE_{\text{bestraalde stalen}}}{PE_{\text{controle}}}$$

Met behulp van GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) werden de resultaten van de colony survival assay geanalyseerd met het lineair kwadratisch model volgens de formule:

$$SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

Hierin zijn α en β parameters voor stralingsgevoeligheid voor een bepaalde cellijn en D staat voor dosis. De SF werd uitgezet in functie van de dosis. De RBE werd berekend door de dosis X-stralen waarbij de SF 10% bedroeg te delen door de dosis deeltjesstralen met een SF van 10%.

3.3.3 Cell cycle assay

De *cell cycle assay* werd toegepast om het percentage aan cellen in verschillende fasen van de celcyclus - zijnde subG1, G1, S en G2 - te bepalen. Een dag voor de bestraling werden 3.5×10^5 cellen uitgeplaat in celcultuurflessen van 25 cm². Voorafgaand aan de bestraling werd het medium vervangen. Vervolgens werden de PC3 cellen en de Caco-2 cellen bestraald met verschillende dosissen X-stralen (0, 0.1, 0.5, 1, 2 en 5 Gy). Het verloop van de celcyclus werd op verschillende tijdstippen na de bestraling geanalyseerd; namelijk na 24, 48 en 72 uur. Hiervoor werd het supernatant gecollecteerd en werden de celcultuurflessen nog gespoeld met PBS. Ook dit werd verzameld zodat de celcyclus van alle cellen, ook van de cellen die reeds waren losgekomen van de celcultuurfles, onderzocht kon worden. Daarna werden de cellen getrypsiniseerd, gecollecteerd en gecentrifugeerd. De pellet werd geresuspendeerd in 200 μ l PBS (Gibco) en vervolgens werd 800 μ l koude ethanol al druppelend toegevoegd terwijl gevortext werd. De cellen werden gefixeerd op 4°C gedurende minimaal 1 uur. Na de fixatie werd er gecentrifugeerd aan 370 rcf gedurende 5 minuten. Het supernatans werd volledig verwijderd met een vacuümpomp en de cellen werden nog gespoeld met PBS (Gibco). De suspensie werd overgebracht naar een cytotube (Becton, Dickinson and Company, Ann Arbor, MI, Verenigde Staten). Na 5 minuten te centrifugeren aan 350 rcf werd het supernatant voorzichtig verwijderd met een vacuümpomp. Vervolgens werd gekleurd met 500 μ l propidium iodide (PI; 50 μ g/ml PI (Sigma-Aldrich), 1% RNase A (Sigma-Aldrich), 1M TRIS (Sigma-Aldrich) en 1M MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Duitsland)) en werden de suspensies geïncubeerd in het donker op 37°C gedurende 50 minuten. De intensiteit van de PI fluorescentie is afhankelijk van het aantal DNA kopieën in de cellen en dit signaal werd gemeten met de BD Accuri™ C6 flow cytometer (Becton, Dickinson and Company) in het FL-2 kanaal. Met de bijhorende BD Accuri™ C6 software werd de data verwerkt (zie Appendix). Per staal werd van 10 000 cellen het verloop van de celcyclus geanalyseerd. Daarom werd het percentage aan cellen in verschillende fasen van de celcyclus berekend. Om te onderzoeken of het verschil in celcyclusverloop tussen de controle en de bestraalde stalen significant was in functie van de tijd, werd een 'two-way ANOVA' uitgevoerd met een Bonferroni-correctie (GraphPad Prism 6). Een p-waarde < 0.05 werd beschouwd als significant.

3.3.4 γ -H2AX assay

Cellen werden uitgeplaat in Lab-Teks (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Verenigde Staten) en bestraald met verschillende dosissen X-stralen (0, 0.1, 0.5, 1, 2 en

5 Gy). Op zes tijdstippen na bestraling (30 minuten, 1, 2, 4, 8 en 24 uur) werden de cellen gefixeerd. Hiervoor werd op het gegeven tijdstip eerst het medium verwijderd en gespoeld met PBS (Gibco), vervolgens werden cellen gedurende 10 minuten op kamertemperatuur gefixeerd met 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich) in PBS (Gibco). Vervolgens werden de cellen gewassen met PBS en gedurende 5 minuten gepermeabiliseerd in 0.25% Triton (Sigma-Aldrich) in PBS. De cellen werden daarna geprobeerd met muis anti- γ -H2AX antilichaam (ab18311, Abcam, Cambridge, Verenigd Koninkrijk) (1:300 verdunning) en overnacht geïncubeerd bij 4°C. De volgende dag werden de cellen gewassen met PBS en gekleurd met geit anti-muis fluoresceïn isothiocyanaat (FITC)-gelabeld antilichaam (Sigma-Aldrich) (1:300 verdunning) bij 37°C gedurende 1 uur. De verdunningen voor de antilichamen werden bereid in 3% rund serumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA; Sigma-Aldrich) in PBS. Vervolgens werd drie maal gespoeld met PBS en twee maal met Milli-Q. De Lab-Teks werden gemonteerd op een microscopisch glaasje door middel van Vectashield met 4',6-diamidino-2-fenylindool (4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI); Vector Laboratories, Brussel, België).

De immunofluorescente beelden werden bekomen met behulp van een Nikon TE2000E epifluorescente microscoop (Nikon Instruments, Parijs Frankrijk). De analyse van de beelden van de γ -H2AX foci werd uitgevoerd met behulp van de ImageJ software (NIH; Bethesda, MD, Verenigde Staten). Per tijdstip werden minstens 100 nuclei geanalyseerd.

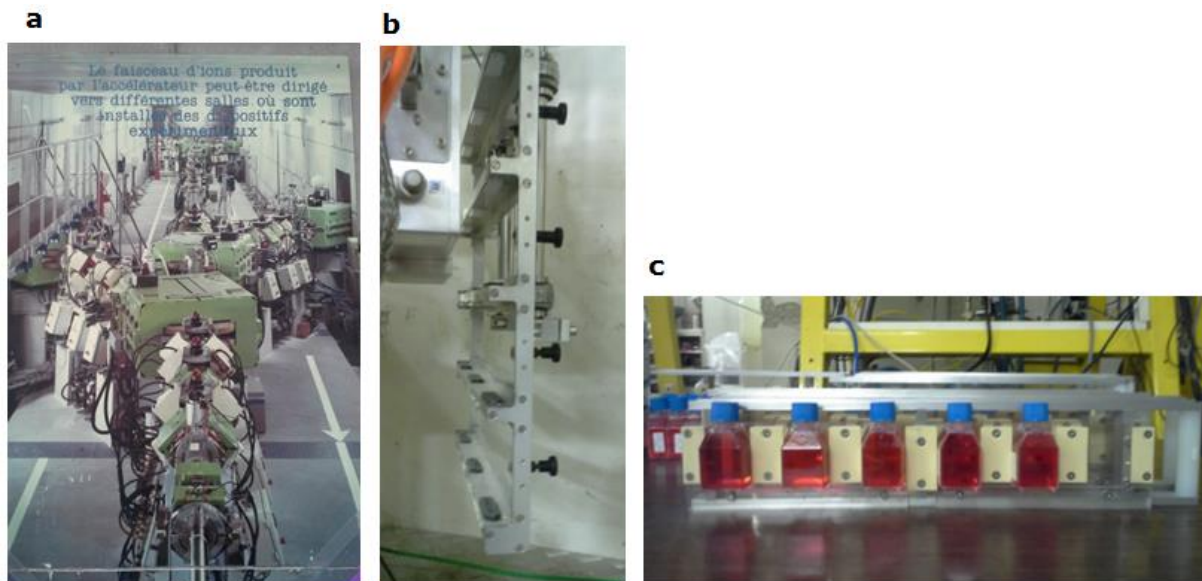
3.4 Bestralingsexperimenten met C-ionen

3.4.1 Bestralingscondities C-ionen

Zowel PC3 prostaatkanker cellen als Caco-2 colonkanker cellen werden bestraald met verschillende dosissen C-ionen in 'Le Grand Accélérateur National d'Ions Lourds' (GANIL) te Caen (Frankrijk) (Fig. 8a). De energie van de C-ionstraal bedroeg 75 MeV/u, het dosisdebiet bedroeg 2 Gy/min en de berekende LET ter hoogte van de stalen was 33.7 keV/ μ m. De spot size van de scannende bundel C-ionen bedroeg $\sim 4 \times 4$ mm².

Voor het vertrek naar GANIL werden de cellen uitgeplaat in 12.5 cm² celcultuurflessen. De celcultuurflessen werden volledig gevuld met medium en in een transporteerbare incubator geplaatst voor het transport naar GANIL. Na aankomst werd het medium vervangen en werden de cellen in de incubator geplaatst (37°C en 5% CO₂).

De celcultuurflessen werden volledig gevuld met medium voor de bestraling. Dit was nodig omdat de flesjes in een verticale positie bestraald werden (Fig. 8b-c). Onmiddellijk na de bestraling werd het medium bijna volledig verwijderd. Er werd 2 ml medium in de celcultuurflessen gelaten waarin de cellen verder konden incuberen tot het gewenste tijdstip. De controlestalen werden op dezelfde manier behandeld.



Figuur 8. Bestralingsexperimenten met C-ionen werden uitgevoerd in 'Le Grand Accélérateur National d'Ions Lourds' (GANIL) te Caen (Frankrijk). a) Foto van de *fishbone*; de C-ionenstraal werd gevormd in de deeltjesversneller om dan via de *fishbone* naar de juiste bestralingskamer gestuurd te worden. b) De stahouder waarin racks (c) geplaatst werden voor de bestraling.

3.4.2 Colony survival assay

Er werd bestraald met verschillende dosissen C-ionen (0, 0.5, 1, 1.5, 2 en 3 Gy) om de stralingsgevoeligheid na te gaan van de PC3 en Caco-2 cellen. Per dosis werden twee replica's verwerkt. Vijf dagen voor de bestraling werden 10^5 cellen uitgeplaat in celcultuurflessen van 12.5 cm^2 . Onmiddellijk na de bestraling werd het medium verwijderd en werden de cellen getrypsiniseerd. De pellet werd geresuspendeerd in celcultuurmedium waarin 1% antibiotica werden toegevoegd (Sigma-Aldrich). In TABEL II zijn de concentraties van de celsuspensies weergegeven. Aan de hand van het aantal cellen werden deze celsuspensies aangemaakt.

TABEL II Concentratie celsuspensies voor de *colony survival assay* na bestraling met C-ionen

	Concentratie 1 (in 5ml)	Concentratie 2 (in 5ml)	Concentratie 3 (in 5ml)
Controle	800	1200	/
0.5 Gy	2000	3000	4000
1 Gy	3000	4000	5000
1.5 Gy	3000	4000	5000
2 Gy	2000	4000	6000
3 Gy	3000	6000	9000

Zowel het uitverdelen van deze celsuspensies, als de fixatie en de kleuring met een glutaraaldehydeoplossing gebeurde op dezelfde wijze als beschreven in paragraaf 3.3.2. De PE en de SF werden eveneens op dezelfde manier bepaald.

3.4.3 Cell cycle assay

De verdeling van de cellen in verschillende fasen van de celcyclus werd nagegaan met behulp van de *cell cycle assay*. Vijf dagen voor de bestraling werden $2 \cdot 10^5$ cellen uitgeplaat in 12.5 cm^2 flessen. Beide cellijnen werden bestraald met verschillende dosissen C-ionen (0, 0.5, 1, 1.5, 2 en 3 Gy). Op verschillende tijdstippen na de bestraling (24, 48 en 72u) werd het verloop van de celcyclus bestudeerd, zoals beschreven in paragraaf 3.3.3.

3.4.4 γ -H2AX assay

De vorming van de γ -H2AX foci in respons op de bestraling met C-ionen werd bestudeerd aan de hand van een γ -H2AX assay. Van beide cellijnen werden 10^5 cellen uitgeplaat in 12.5 cm^2 celcultuurflessen. Dit gebeurde vijf dagen voor de bestraling. Er werd bestraald met verschillende dosissen C-ionen (0, 0.5, 1 en 2 Gy) en op verschillende tijdstippen na de bestraling (30 minuten, 1, 2, 4, 8 en 24 uur) werden de cellen gefixeerd en de γ -H2AX foci gekleurd zoals beschreven in paragraaf 3.3.4.

3.5 Bestralingsexperimenten met protonen

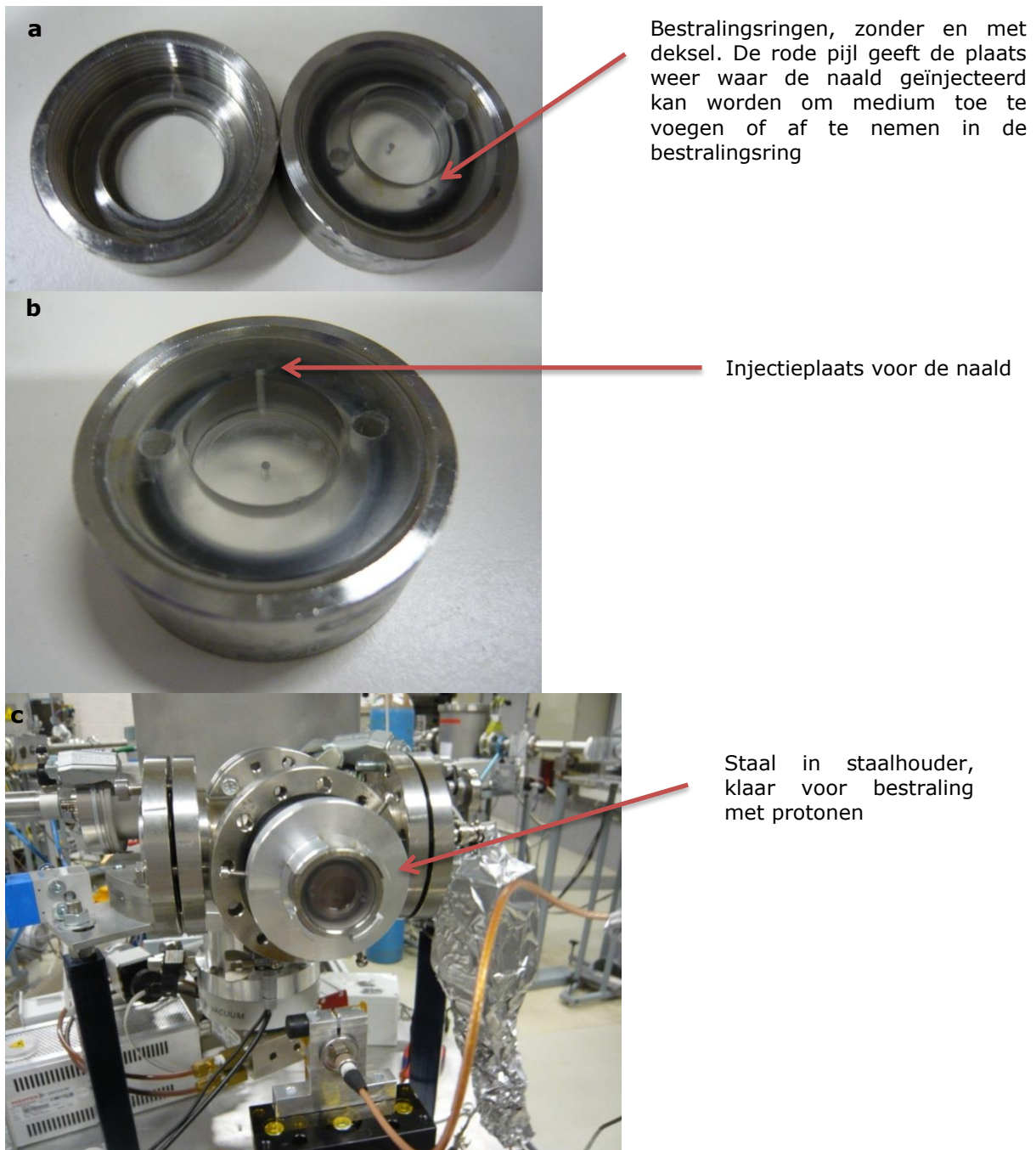
3.5.1 Bestralingscondities protonen

Om het transport naar Namen zo optimaal mogelijk te laten verlopen werd een 75 cm^2 celcultuurfles volledig gevuld met medium en in een transporteerbare incubator vervoerd. Na aankomst werd het medium vervangen en werden de cellen in de incubator geplaatst (37°C en 5% CO_2).

De PC3 prostaatcancer cellen werden bestraald met verschillende dosissen protonen (0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 en 3 Gy) met een LET van $10 \text{ keV}/\mu\text{m}$ in de bestralingsfaciliteit van het LARN (*Laboratoire d'Analyse par Reactions Nucleaires*) van de Universiteit van Namen. De deeltjesversneller genaamd ALTAÏS (*Accélérateur Linéaire Tandetron pour l'Analyse et l'Implantation des Solides*) is een 2 MV lineaire deeltjesversneller. Bij bestralingen met een lage dosis (0.02 – 0.25 Gy), werd het dosisdebiet ingesteld op $0.1 \text{ Gy}/\text{min}$, terwijl bij bestralingen met de hogere dosissen een dosisdebiet van $1 \text{ Gy}/\text{min}$ ingesteld.

Op de eerste dag werden de bestralingsringen voorbereid die geplaatst moesten worden in de staalhouder van de lineaire deeltjesversneller (Fig. 9a). Een Mylar film (Polyethyleentereftalaat (PET), Goodfellow Cambridge Limited, Verenigd Koninkrijk) werd bevestigd op de metalen bestralingsringen. Deze Mylar film vormde het membraan waarop de cellen werden aangebracht. De volgende dag werden de cellen aangebracht op de Mylar film. Hiervoor werd de membraan gecoat met een druppel van $15 \mu\text{l}$ fibronectine (Invitrogen by Life Technologies). Deze werd geïncubeerd gedurende 20 minuten bij 37°C . Ondertussen werden de PC3 cellen getrypsiniseerd en werd een celsuspensie bereid met een concentratie van $3.13 \cdot 10^6$ cellen/ml. In elke bestralingsring werd nadien het fibronectine verwijderd waarna $32 \mu\text{l}$ van de celsuspensie werd toegevoegd. Dit komt overeen met 10^5 cellen per bestralingsring. Vervolgens werden de bestralingsringen gedurende 6 uren in de incubator geplaatst zodat de cellen zich in 1 centrale druppel konden vasthechten. Daarna werden de bestralingsringen met behulp van een spuit gevuld met warm F-12K medium (ATCC) met 10% FBS (Gibco) (Fig. 9b). Voorafgaand aan de bestraling, op de derde dag, werden de bestralingsringen voorbereid. Het medium werd verwijderd met een spuit, daarna werden cellen, die zich buiten de druppel geplaatst hadden, verwijderd met een steriel wattenstaafje. Ten slotte werden de bestralingsringen nog gespoeld met PBS en werd vers F-12K medium (ATCC)

met 10% FBS (Gibco) toegevoegd. Er werd bestraald in verticale positie met verschillende dosissen protonen (0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 en 3 Gy) (Fig. 9c). Per dosis werden twee replica's verwerkt.



Figuur 9. Bestralingsexperimenten met protonen werden uitgevoerd met de lineaire deeltjesversneller ALTAÏS (Accélérateur Linéaire Tandetron pour l'Analyse et l'Implantation des Solides) aan de Universiteit van Namen. a) Bestralingsringen zonder en met deksel. Deze bestralingsringen zijn geschikt om te gebruiken bij stralingsexperimenten bij deze lineaire deeltjesversneller. b) Een bestralingsring voor de lineaire accelerator. De plaats waar de naald kan geïnjecteerd worden om medium en dergelijke toe te voegen of af te nemen is duidelijk zichtbaar. c) Het staal is geplaatst in de staalhouder, er kan nu bestraald worden met protonen.

3.5.2 Colony survival assay

De stralingsgevoeligheid van de PC3 prostaat kankercellen na bestraling met protonen werd bestudeerd aan de hand van de *colony survival assay*.

Onmiddellijk na de bestraling werd het medium verwijderd en werden de bestralingsringen gespoeld met PBS alvorens 500 μ l trypsine werd toegevoegd. De bestralingsringen werden dan gedurende 5 minuten geïncubeerd bij 37°C. Daarna werd 1 ml medium met 10% FBS en 1% antibiotica (Sigma-Aldrich) toegevoegd. Het aantal cellen werd bepaald met behulp van Moxi Z (ORFLO). Aan de hand van het aantal cellen werden celsuspensies met de gewenste concentratie aangemaakt volgens de concentraties weergegeven in TABEL III.

TABEL III Concentratie celsuspensies voor de *colony survival assay* na bestraling met protonen

	Concentratie 1 (in 5ml)	Concentratie 2 (in 5ml)	Concentratie 3 (in 5ml)
Controle	800	1200	/
0.02 Gy	800	1200	/
0.05 Gy	800	1200	/
0.1 Gy	800	1200	/
0.25 Gy	1000	1500	/
0.5 Gy	2000	3000	4000
1 Gy	3000	4000	5000
2 Gy	4000	6000	8000
3 Gy	5000	8000	12000

Zowel het uitverdelen van deze celsuspensies, als de fixatie en de kleuring met een glutaraaldehydeoplossing gebeurde op dezelfde wijze als beschreven in paragraaf 3.3.2. De PE en de SF werden eveneens op dezelfde manier bepaald.

3.6 Experimentele set-up

In TABEL IV wordt een overzicht gegeven van de assays die tijdens deze masterthesis werden uitgevoerd.

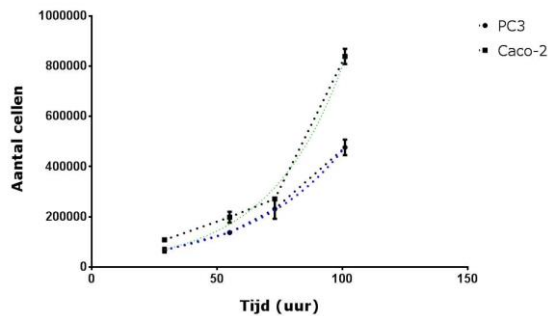
TABEL IIIIV Overzicht assays

Colony survival assay			
	X-stralen (LET < 10 keV/ μ m)	C-ionen (LET = 33.7 keV/ μ m)	Protonen (LET = 10 keV/ μ m)
PC3	0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 en 5 Gy	0, 0.25, 0.5, 1, 1.5 en 2 Gy	0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 en 3 Gy
Caco-2	0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 en 5 Gy	0, 0.5, 1, 1.5, 2 en 3 Gy	/
Cell cycle assay			
	X-stralen (LET < 10 keV/ μ m)	C-ionen (LET = 33.7 keV/ μ m)	Protonen
PC3	0, 0.1, 0.5, 1, 2 en 5 Gy	0, 0.5, 1 en 2 Gy	/
Caco-2	0, 0.1, 0.5, 1, 2 en 5 Gy	0, 0.5, 1 en 2 Gy	/
γ-H2AX assay			
	X-stralen (LET < 10 keV/ μ m)	C-ionen (LET = 33.7 keV/ μ m)	Protonen
PC3	0, 0.1, 0.5, 1, 2 en 5 Gy	0, 0.5, 1 en 2 Gy	/
Caco-2	0, 0.1, 0.5, 1, 2 en 5 Gy	0, 0.5, 1 en 2 Gy	/

4 Resultaten

4.1 Verdubbelingstijd PC3 en Caco-2 cellen

Uit de analyse van de verdubbelingstijd is gebleken dat de PC3 prostaatkanker cellen een verdubbelingstijd hebben van 25.92 uur [95% BI 23.12; 29.49], terwijl de verdubbelingstijd van de Caco-2 colonkanker cellen 20.17 uur [95% BI 17.91; 23.09] is. De exponentiële groei van de twee kankercellijnen is weergegeven in figuur 10.

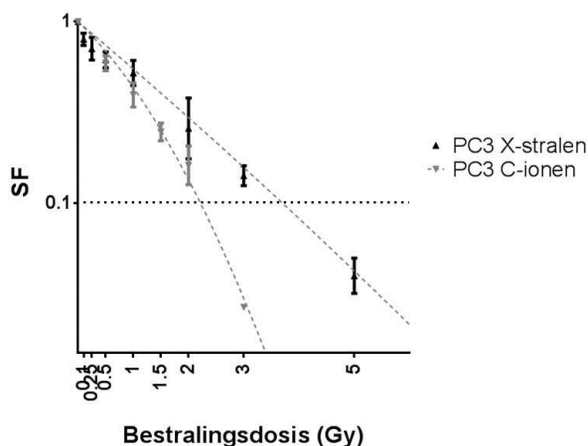


Figuur 10. Exponentiële groei van PC3 en Caco-2 cellen.

4.2 Colony survival assay

4.2.1 PC3 prostaatkanker cellen

De stralingsgevoeligheid van de PC3 cellen werd onderzocht na bestraling met X-stralen, C-ionen of protonen. Elf dagen na de bestraling werd de SF bepaald aan de hand van de *colony survival assay*. In figuur 11 zijn de overlevingscurves van de PC3 cellen weergegeven na bestraling met X-stralen of C-ionen. Bij de PC3 cellen bestraald met C-ionen daalde de SF met toenemende dosis. Bij bestralingsdosissen van 0.5 tot 5 Gy X-stralen was dit effect ook weer duidelijk waarneembaar; hoe hoger de bestralingsdosis, hoe lager de SF. Bij een bestralingsdosis van 0.1 tot 0.25 Gy X-stralen was dit echter niet het geval; hier werd er een stijging in celdood waargenomen. De PC3 cellen waren dus hypergevoelig voor de lage dosissen X-stralen.



Figuur 11. Dosisafhankelijke overlevingscurves van PC3 cellen na bestraling met X-stralen of C-ionen. De SF is weergegeven op een logaritmische schaal in functie van de

bestralingsdosis. De foutenbalken geven de standaarddeviatie weer van het gemiddelde van drie onafhankelijke bestralingsexperimenten.

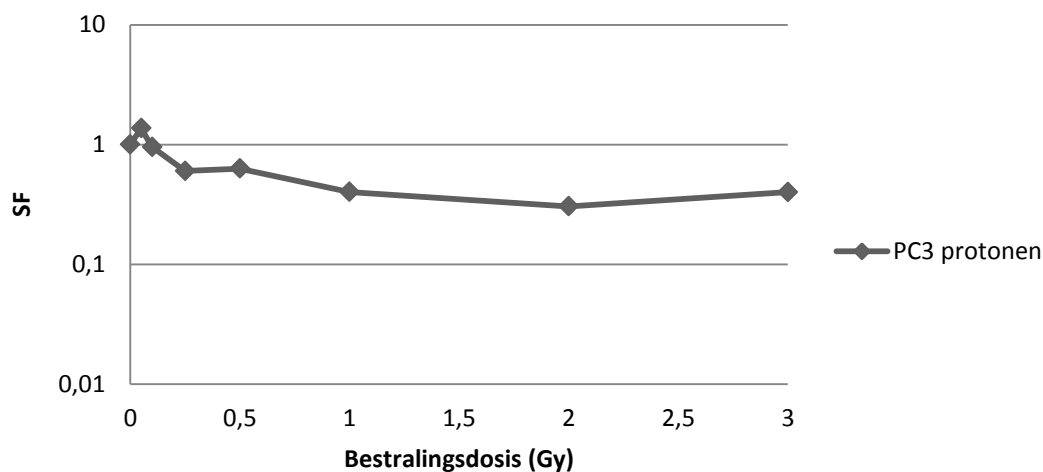
De resultaten van de *colony survival assay* werden geanalyseerd met het lineair kwadratisch model volgens de formule $SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$. De dosissen bij de bestraling van PC3 cellen met C-ionen varieerden van 0.5 tot 3 Gy. Parameters α en β waren respectievelijk 0.67 ± 0.10 en 0.17 ± 0.04 . De dosissen in de bestralingsexperimenten met X-stralen varieerden van 0.1 tot 5 Gy en de stralingsgevoelige parameters α en β waren 0.59 ± 0.12 en 0.01 ± 0.04 .

De RBE werd bepaald aan de hand van een SF van 10%. De dosis waarbij $SF_{10\%}$, bedroeg respectievelijk 3.68 en 2.20 Gy voor X-stralen en C-ionen. De RBE van de bundel C-ionen werd berekend met volgende formule:

$$RBE = \frac{D_{X\text{-stralen}}}{D_{\text{deeltjesstralen}}}$$

Waarvoor $D_{X\text{-stralen}}$ de dosis X-stralen waarbij $SF_{10\%}$ is en $D_{\text{deeltjesstralen}}$ is de dosis protonen of C-ionen waarbij $SF_{10\%}$. De berekende RBE van de C-ionen had een waarde van 1.67 bij de bestraling van de PC3 cellen.

De PC3 cellen werden ook bestraald met protonen om de stralingsgevoeligheid te analyseren. Het resultaat hiervan is weergegeven in figuur 12. De SF werd niet bepaald omwille van de onverwachte resultaten.

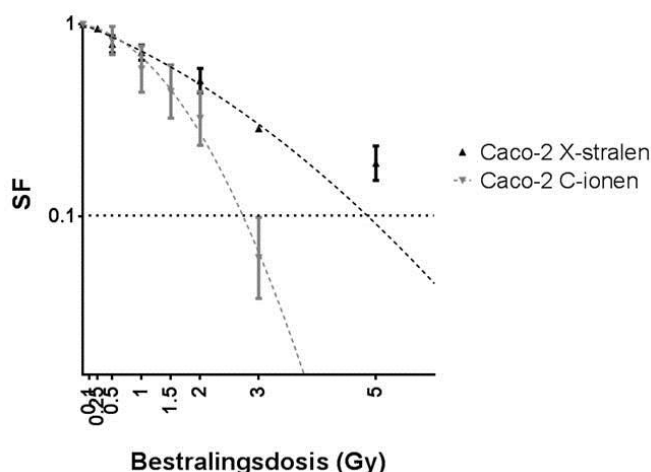


Figuur 12. Dosisafhankelijke overlevingscurve van PC3 cellen na bestraling met protonen. De SF is weergegeven op een logaritmische schaal in functie van de bestralingsdosis (n = 1).

4.2.2 Caco-2 colonkanker cellen

De stralingsgevoeligheid van de Caco-2 cellen werd onderzocht na bestraling met X-stralen of C-ionen (Fig. 13). Zowel na bestraling met X-stralen als na bestraling met C-ionen daalde de SF met een toenemende bestralingsdosis.

De resultaten werden geanalyseerd met het lineair kwadratisch model en de parameters α en β bedroegen respectievelijk 0.30 ± 0.07 en 0.03 ± 0.03 na de bestraling van Caco-2 cellen met X-stralen. De dosissen in de bestralingsexperimenten met X-stralen varieerden van 0.1 tot 5 Gy. Bij de bestralingsexperimenten met C-ionen bedroegen de parameters α en β respectievelijk 0.13 ± 0.16 en 0.26 ± 0.07 , hier varieerden de bestralingsdosissen van 0.5 tot 3 Gy. De berekende RBE van de C-ionen had een waarde van 1.87 bij de bestraling van de Caco-2 cellen.



Figuur 13. Dosisafhankelijke overlevingscurves van Caco-2 cellen na bestraling met X-stralen of C-ionen. De SF is weergegeven op een logaritmische schaal in functie van de bestralingsdosis. De foutenbalken geven de standaarddeviatie weer van het gemiddelde van drie onafhankelijke bestralingsexperimenten.

4.3 Cell cycle assay

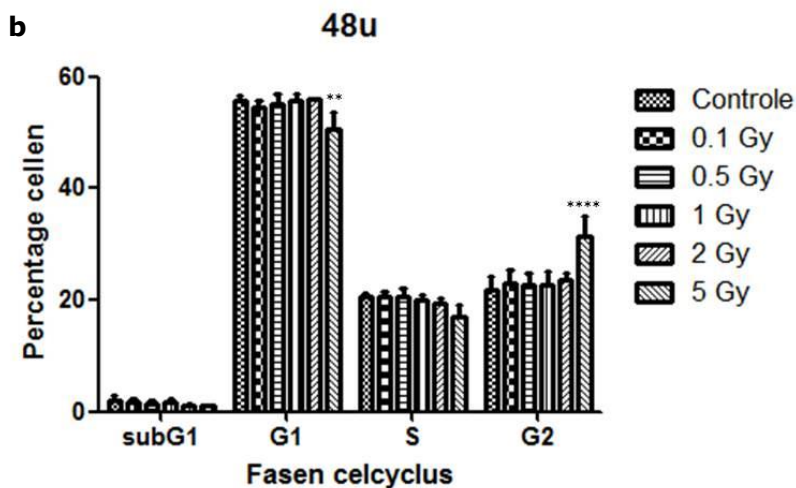
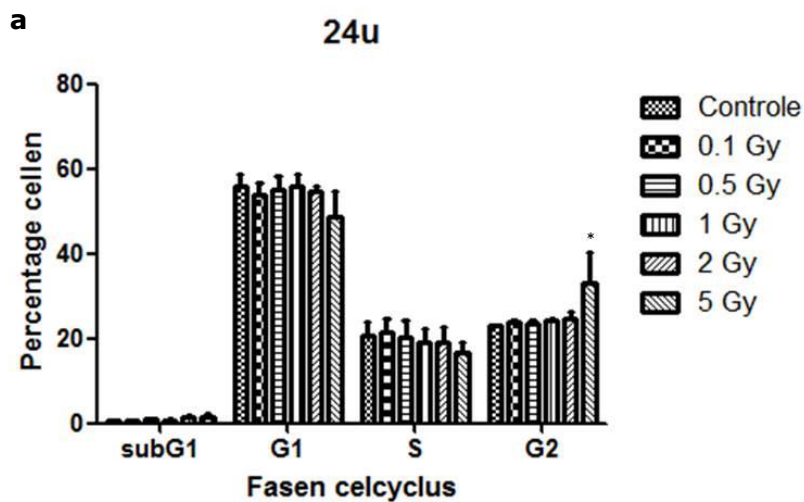
4.3.1 PC3 cellen bestraald met X-stralen

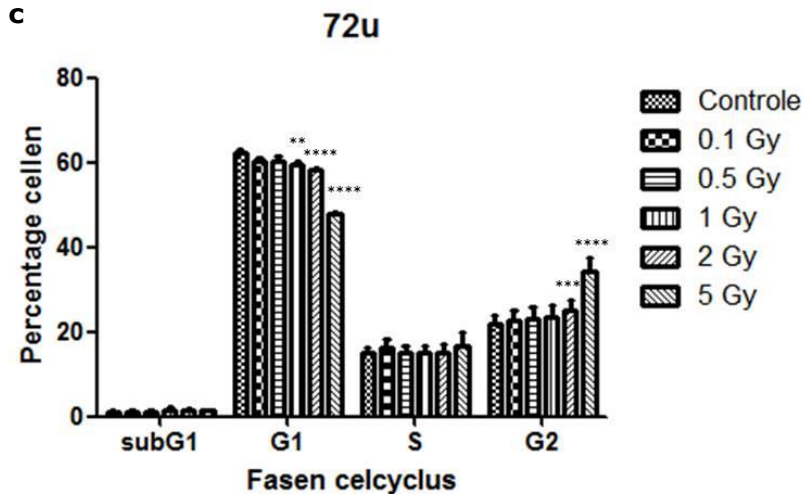
Om de impact van bestraling te onderzoeken op het verloop van de celcyclus werden PC3 cellen bestraald met verschillende dosissen X-stralen op het SCK•CEN. Het verloop van de celcyclus van de PC3 cellen werd op verschillende tijdstippen na de bestraling bepaald met flow cytometrie, na kleuring met PI. TABEL V toont de verdeling van de PC3 cellen in verschillende fasen van de celcyclus na bestraling met X-stralen.

TABEL IV Verdeling van de PC3 cellen in verschillende fasen van de celcyclus na bestraling met X-stralen (n = 3)

	Dosis	Verdeling celcyclus (%)							
		subG1		G1		S		G2	
24 uur	Controle	0.70 ± 0.03	55.68 ± 5.23	20.61 ± 5.50	23.01 ± 0.27				
	0.1 Gy	0.69 ± 0.20	53.88 ± 4.93	21.49 ± 5.40	23.94 ± 0.37				
	0.5 Gy	0.89 ± 0.30	55.07 ± 5.40	20.43 ± 6.61	23.61 ± 1.07				
	1 Gy	0.81 ± 0.33	55.81 ± 5.01	18.98 ± 5.54	24.39 ± 0.69				
	2 Gy	1.30 ± 1.26	54.72 ± 2.27	19.16 ± 5.94	24.82 ± 2.68				
	5 Gy	1.60 ± 1.00	48.74 ± 10.11	16.55 ± 4.02	33.11 ± 12.73				
48 uur	Controle	1.92 ± 1.75	55.74 ± 1.54	20.47 ± 1.36	21.88 ± 4.28				
	0.1 Gy	1.77 ± 1.11	54.61 ± 2.07	20.63 ± 1.54	22.99 ± 4.19				
	0.5 Gy	1.38 ± 0.94	55.16 ± 2.89	20.67 ± 2.67	22.78 ± 3.35				
	1 Gy	1.61 ± 1.19	55.79 ± 1.80	19.91 ± 1.73	22.69 ± 3.92				
	2 Gy	1.13 ± 0.25	55.94 ± 0.25	19.37 ± 1.79	23.57 ± 2.15				
	5 Gy	1.00 ± 0.40	50.53 ± 5.32	17.07 ± 3.76	31.41 ± 6.22				
72 uur	Controle	1.10 ± 0.37	62.13 ± 1.94	15.00 ± 2.08	21.78 ± 3.93				
	0.1 Gy	1.08 ± 0.34	60.09 ± 1.53	16.29 ± 3.72	22.54 ± 4.26				
	0.5 Gy	1.21 ± 0.46	60.41 ± 2.09	15.25 ± 2.62	23.13 ± 5.07				
	1 Gy	1.65 ± 0.75	59.49 ± 1.42	15.22 ± 2.75	23.64 ± 4.63				
	2 Gy	1.53 ± 0.48	58.17 ± 0.68	15.18 ± 2.93	25.13 ± 3.74				
	5 Gy	1.33 ± 0.26	47.82 ± 0.86	16.78 ± 5.42	34.08 ± 6.04				

In figuur 14 is het verloop van de celcyclus weergegeven op drie tijdstippen na de bestraling van de PC3 cellen met X-stralen. Een bestralingsdosis van 5 Gy X-stralen resulteerde 24 uur na de bestraling in een significante stijging van 10.10% van het aantal cellen in de G2 fase ten opzichte van de controle (Fig. 14a). Het verloop van de celcyclus op 48 uur na bestraling met 5 Gy X-stralen gaf een significante daling (5.41%) van het percentage cellen in de G1 en een significante stijging (9.56%) van het percentage cellen in de G2 fase ten opzichte van de controle (Fig. 14b). Figuur 14c toont dat er op 72 uur na bestraling van de PC3 cellen met X-stralen significante veranderingen werden waargenomen. Zo daalde het percentage cellen in de G1 fase significant vergeleken met de controle en dit zowel na bestraling met 1, 2 als 5 Gy met respectievelijk 2.64, 3.96 en 14.31%. Dit ging gepaard met een significante stijging van het percentage cellen in de G2 fase na bestraling met 2 en 5 Gy X-stralen met respectievelijk 3.35 en 12.30% ten opzichte van controle.





Figuur 14. Verloop van de celcyclus 24 uur (a), 48 uur (b) en 72 uur (c) na bestraling van PC3 cellen met X-stralen. De foutbalken geven de standaarddeviatie weer van het gemiddelde van vier replica's per experiment ($n = 3$). * p ten opzichte van de controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

4.3.2 PC3 cellen bestraald met C-ionen

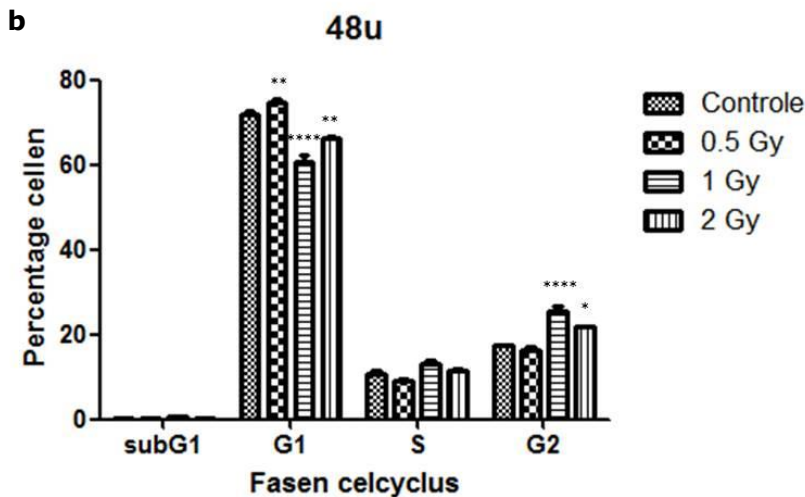
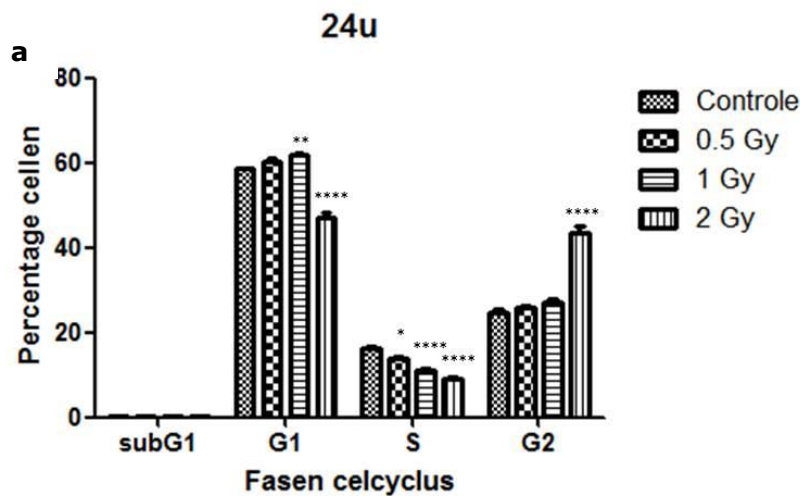
De impact van C-ionenstralen op het verloop van de celcyclus in PC3 cellen werd geanalyseerd met flow cytometrie na kleuring met PI op verschillende tijdstippen. TABEL VI toont de verdeling van de PC3 cellen in verschillende fasen van de celcyclus na bestraling met C-ionen.

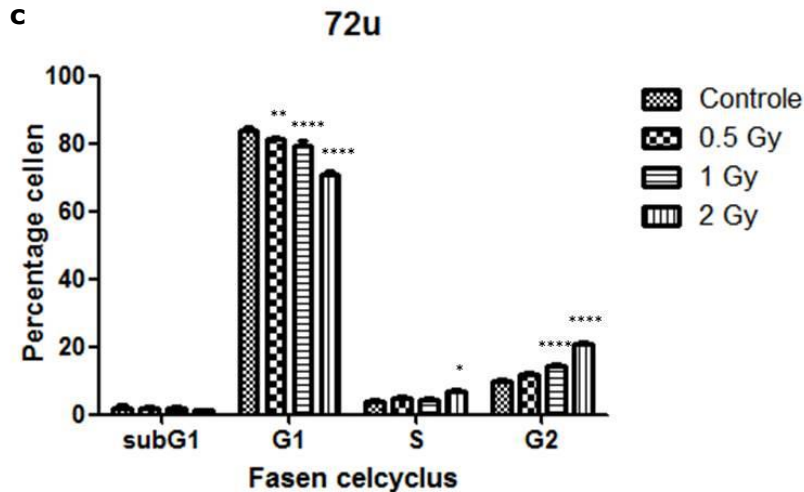
TABEL VI Verdeling van de PC3 cellen in verschillende fasen van de celcyclus na bestraling met C-ionen ($n = 1$)

	Dosis	Verdeling celcyclus (%)							
		subG1		G1		S		G2	
24 uur	Controle	0.36 ± 0.08	58.49 ± 0.72	16.35 ± 0.84	24.81 ± 1.03				
	0.5 Gy	0.30 ± 0.08	60.11 ± 1.68	13.78 ± 0.96	25.81 ± 1.11				
	1 Gy	0.29 ± 0.04	61.74 ± 0.78	11.06 ± 1.08	26.90 ± 1.68				
	2 Gy	0.38 ± 0.03	47.20 ± 2.06	9.04 ± 1.12	43.38 ± 3.08				
48 uur	Controle	3.58 ± 1.21	69.16 ± 2.84	12.79 ± 3.09	14.46 ± 1.50				
	0.5 Gy	2.70 ± 2.38	72.20 ± 2.75	11.58 ± 2.09	13.52 ± 2.63				
	1 Gy	3.27 ± 1.65	58.83 ± 3.21	16.10 ± 2.67	21.79 ± 2.58				
	2 Gy	1.59 ± 1.00	65.99 ± 2.14	13.12 ± 1.86	19.30 ± 0.85				
72 uur	Controle	1.87 ± 1.45	84.06 ± 1.81	4.06 ± 1.03	10.01 ± 0.85				
	0.5 Gy	1.94 ± 0.74	81.16 ± 1.11	4.94 ± 0.61	11.96 ± 0.26				
	1 Gy	1.59 ± 1.12	79.53 ± 2.12	4.43 ± 1.19	14.45 ± 0.78				
	2 Gy	1.29 ± 0.55	71.01 ± 1.51	6.76 ± 1.12	20.93 ± 0.56				

Uit de resultaten blijkt dat er 24 uur na de bestraling met 0.5 Gy C-ionen een significante daling van 2.57% werd waargenomen in het aantal cellen in de S fase ten opzichte van de controle (Fig. 15a). De bestraling met 1 Gy C-ionen resulteerde in significante stijging (3.25%) van het aantal cellen in de G1 fase en een significante daling (5.29%) van het aantal cellen in de S fase in vergelijking met de controle. Verder werd ook een significante daling van 11.29% waargenomen in het percentage cellen in de G1 fase en een significante stijging van 18.57% in het percentage cellen in de G2 fase ten opzichte van de controle bij een dosis van 2 Gy C-ionen (Fig. 15a). Uit figuur 16b blijkt dat er op

48 uur na de bestraling met 0.5 Gy C-ionen een significante stijging van 3.04% werd waargenomen in het aantal cellen in de G1 fase ten opzichte van de controle. Bestralingen met 1 Gy C-ionen resulteerde 48 uur na de bestraling in een significante daling van 10.33% en een significante stijging van 7.33% in respectievelijk de G1 en de G2 fase ten opzichte van de controle. De daling in de G1 fase (3.17%) en stijging in de G2 fase (4.84%) ten opzichte van de controle werd ook waargenomen 48 uur na de bestraling met 2 Gy C-ionen (Fig. 15b). Uit figuur 15c blijkt dat de bestraling met 0.5 Gy C-ionen een significante daling (2.90%) veroorzaakte in de G1 fase ten opzichte van de controle. Bestralingsexperimenten met 1 en 2 Gy C-ionen vertoonde 72 uur na de bestraling wederom een significante daling (respectievelijk 4.53 en 13.05%) van het aantal PC3 cellen in de G1 fase en een significante stijging (respectievelijk 4.44 en 10,92%) van het aantal PC3 cellen in de G2 fase ten opzichte van de controle. De bestraling met 2 Gy C-ionen resulteerde tevens in een significante stijging van 2.7% van het aantal PC3 cellen in de S fase vergeleken met de controle.





Figuur 15. Verloop van de celcyclus 24 uur (a), 48 uur (b) en 72 uur (c) na bestraling van PC3 cellen met C-ionen. De foutbalken geven de standaarddeviatie weer van het gemiddelde van vier replica's (n = 1). * p ten opzichte van de controle: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

4.3.3 Caco-2 cellen bestraald met X-stralen

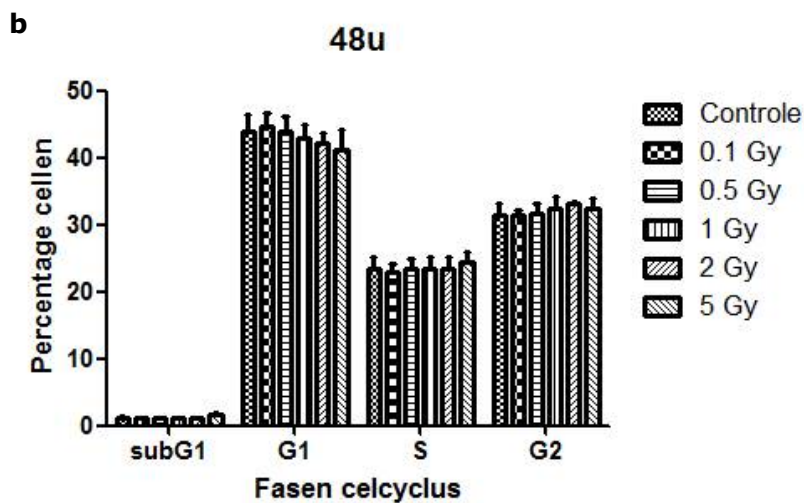
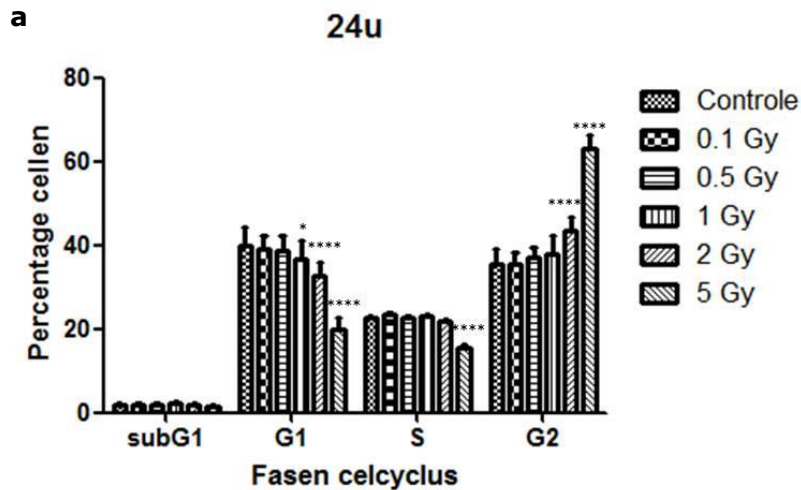
Ook Caco-2 cellen werden bestraald met X-stralen en de verdeling van de cellen in verschillende fasen werd gemeten met flow cytometrie na kleuring met PI. De verdeling van de Caco-2 cellen in de celcyclus is weergegeven in TABEL VII.

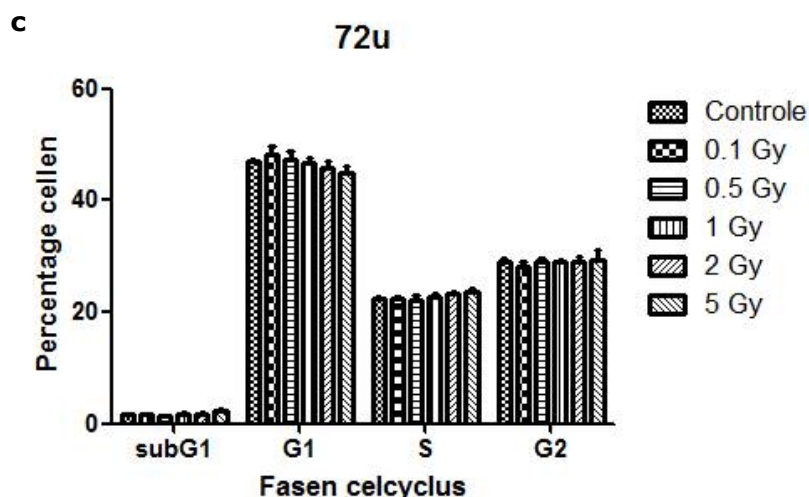
TABEL VII Verdeling van de Caco-2 cellen in verschillende fasen van de celcyclus na bestraling met X-stralen (n = 3)

	Dosis	Verdeling celcyclus (%)							
		subG1		G1		S		G2	
24 uur	Controle	1.71 ± 0.84	40.05 ± 7.25	22.64 ± 0.62	35.59 ± 6.20				
	0.1 Gy	1.83 ± 1.09	39.02 ± 5.73	23.61 ± 0.55	35.54 ± 4.48				
	0.5 Gy	1.78 ± 0.94	38.64 ± 6.18	22.57 ± 0.99	37.00 ± 4.27				
	1 Gy	2.11 ± 0.98	36.85 ± 7.13	23.04 ± 1.01	37.99 ± 7.09				
	2 Gy	1.82 ± 0.67	32.58 ± 5.92	22.05 ± 0.39	43.54 ± 5.65				
	5 Gy	1.64 ± 0.72	19.67 ± 5.13	15.47 ± 1.19	63.22 ± 5.05				
48 uur	Controle	1.16 ± 0.26	43.99 ± 4.20	23.46 ± 2.76	31.38 ± 3.26				
	0.1 Gy	1.13 ± 0.04	44.59 ± 3.50	22.81 ± 2.35	31.47 ± 1.14				
	0.5 Gy	1.07 ± 0.15	43.87 ± 3.93	23.39 ± 2.78	31.67 ± 2.73				
	1 Gy	1.18 ± 0.08	42.93 ± 3.37	23.41 ± 2.85	32.47 ± 2.86				
	2 Gy	1.10 ± 0.03	42.27 ± 2.48	23.43 ± 2.84	33.20 ± 0.38				
	5 Gy	1.76 ± 0.18	41.26 ± 4.87	24.47 ± 2.54	32.51 ± 2.59				
72 uur	Controle	1.59 ± 0,29	47.02 ± 0.45	22.26 ± 1.02	29.13 ± 0.84				
	0.1 Gy	1.67 ± 0,03	48.07 ± 2.82	22.28 ± 0.90	27.98 ± 2.00				
	0.5 Gy	1.46 ± 0,14	47.42 ± 2.13	22.25 ± 1.34	28.87 ± 1.23				
	1 Gy	1.66 ± 0,42	46.58 ± 1.92	22.68 ± 1.13	29.08 ± 0.44				
	2 Gy	1.83 ± 0,15	45.88 ± 1.90	23.18 ± 0.75	29.11 ± 1.43				
	5 Gy	2.40 ± 0.23	44.84 ± 2.22	23.56 ± 1.15	29.20 ± 3.31				

Enkel 24 uur na de bestraling met X-stralen werden significante verschillen in het verloop van de celcyclus waargenomen. De bestraling met 1 Gy X-stralen resulteerde in een significante daling van 3.20% van het aantal cellen in de G1 fase vergeleken met de

controle. Na de bestraling met 2 Gy X-stralen werd een significante daling (7.47%) in de G1 fase en een significante stijging (7.95%) in de G2 fase in vergelijking met de controle waargenomen. Ten slotte leidde de bestraling met 5 Gy X-stralen tot een significante daling in de G1 en S fase (respectievelijk 20.38% en 7.17%) en een significante stijging van 27.63% van het aantal cellen in de G2 fase ten opzichte van de controle (Fig. 16a). Uit figuren 16 b-c bleek dat 48 en 72 uur na de bestraling van Caco-2 cellen geen significante veranderingen meer werden waargenomen in het verloop van de celcyclus (Fig. 16b-c).





Figuur 16. Verloop van de celcyclus 24 uur (a), 48 uur (b) en 72 uur (c) na bestraling van Caco-2 cellen met X-stralen. De foutbalken geven de standaarddeviatie weer van het gemiddelde van vier replica's per experiment ($n = 3$). * p ten opzichte van de controle: * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

4.3.4 Caco-2 cellen bestraald met C-ionen

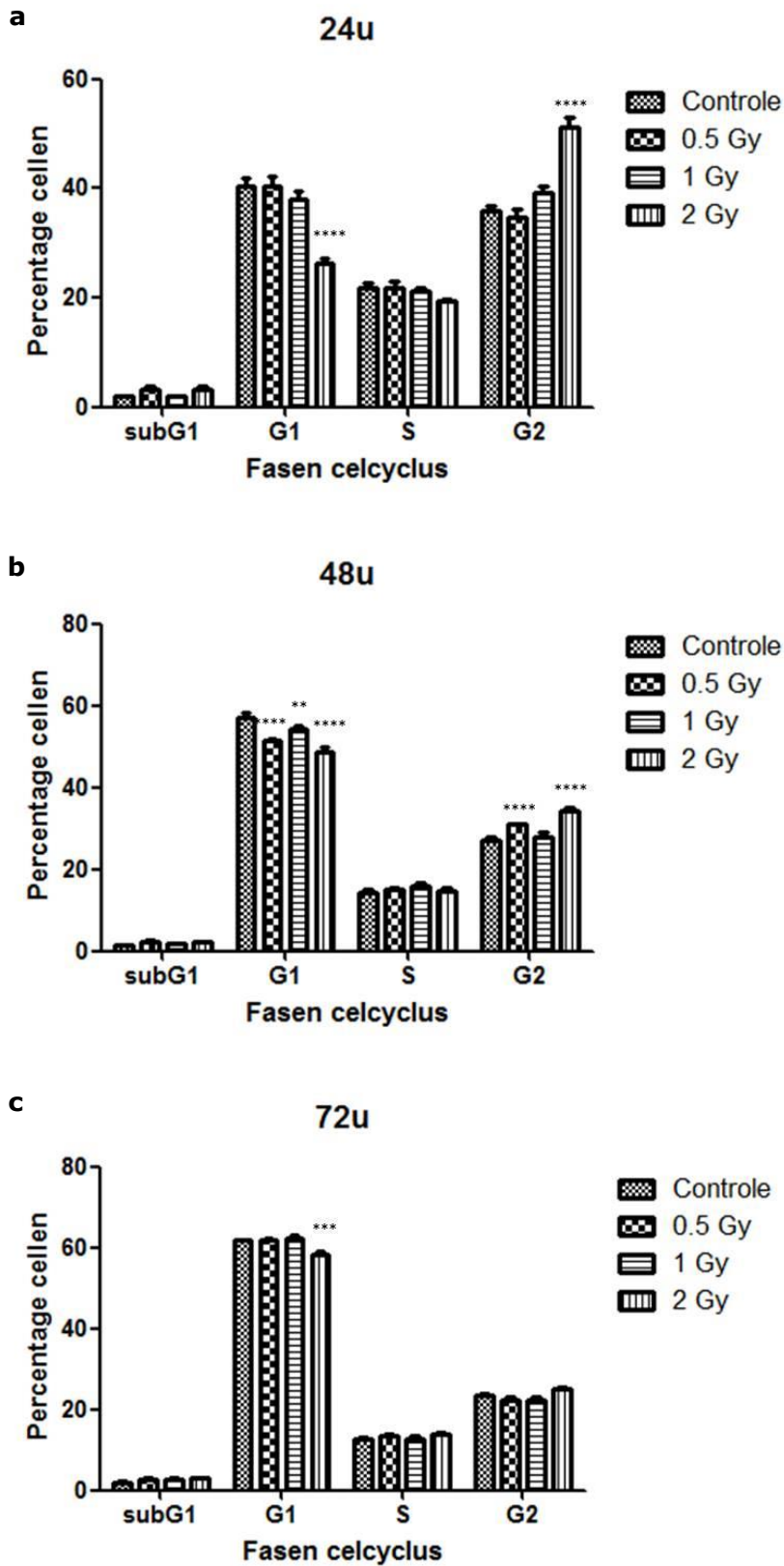
Caco-2 cellen werden ook bestraald met C-ionen in GANIL om de impact van de C-ionen op de celcyclus te onderzoeken aan de hand van flow cytometrie, na kleuring met PI. TABEL VIII geeft de verdeling van de Caco-2 cellen weer in verschillende fasen van de celcyclus.

Tabel VIII Verdeling van de PC3 cellen in verschillende fasen van de celcyclus na bestraling met C-ionen ($n = 1$)

	Dosis	Verdeling celcyclus (%)							
		subG1		G1		S		G2	
24 uur	Controle	1.87 ± 0.28	40.41 ± 2.73	21.91 ± 1.18	35.81 ± 1.55				
	0.5 Gy	3.11 ± 1.36	40.50 ± 3.19	21.81 ± 2.32	34.57 ± 3.33				
	1 Gy	1.85 ± 0.15	37.99 ± 2.80	21.05 ± 1.53	39.10 ± 2.69				
	2 Gy	3.07 ± 1.51	26.35 ± 1.90	19.26 ± 1.03	51.32 ± 3.43				
48 uur	Controle	1.51 ± 0.32	57.08 ± 2.64	14.45 ± 1.20	26.96 ± 1.75				
	0.5 Gy	2.38 ± 0.29	51.35 ± 0.78	15.22 ± 0.72	31.05 ± 0.33				
	1 Gy	1.74 ± 0.15	54.23 ± 1.59	16.05 ± 1.13	27.98 ± 2.57				
	2 Gy	2.26 ± 0.03	48.81 ± 2.26	14.72 ± 1.19	34.22 ± 1.83				
72 uur	Controle	1.95 ± 0.22	61.85 ± 0.32	12.75 ± 0.58	23.44 ± 0.97				
	0.5 Gy	2.67 ± 0.43	61.70 ± 1.36	13.47 ± 0.89	22.16 ± 1.44				
	1 Gy	2.78 ± 0.72	62.39 ± 1.13	12.76 ± 1.04	22.08 ± 2.12				
	2 Gy	2.93 ± 0.61	58.39 ± 1.16	13.78 ± 1.09	24.89 ± 0.89				

In figuur 17 is het verloop van de celcyclus weergegeven na de bestraling van Caco-2 cellen met C-ionen. Een bestraling met 2 Gy C-ionen resulteerde 24 uur na de bestraling in zowel een significante daling (14.06%) van het percentage cellen in de G1 fase als een significante stijging (15.51%) van het percentage cellen in de G2 fase ten opzichte van de controle (Fig. 17a). De bestraling met 0.5 en 2 Gy C-ionen vertoonde 48 uur na de bestraling eveneens een significante daling (respectievelijk 5.73 en 8.27%) van het percentage cellen in de G1 fase als een significante stijging (respectievelijk 4.09 en 7.26%) van het percentage cellen in de G2 fase vergeleken met de controle (Fig. 17b).

Enkel in de G1 fase werd op 72 uur na bestraling met 2 Gy C-ionen nog een significante daling van 3.46% waargenomen ten opzichte van de controle (Fig. 17c).



Figuur 17. Verloop van de celcyclus 24 uur (a), 48 uur (b) en 72 uur (c) na bestraling van Caco-2 cellen met C-ionen. De foutbalken geven de standaarddeviatie weer van het

gemiddelde van vier replica's (n = 1). * p ten opzichte van de controle: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

4.4 γ -H2AX assay

DNA schade en herstel zijn van uitermate belang wanneer cellen delen. Zoals reeds vermeld is de DSB de meest lethale schade die door straling wordt geïnduceerd. Zowel in GANIL als op het SCK•CEN werden daarom stalen voor γ -H2AX analyse genomen. Wegens tijdsgebrek werd de analyse nog niet uitgevoerd. Door middel van het opvolgen van de vorming en het verdwijnen van γ -H2AX foci via immunofluorescentie-microscopie zal een beeld kunnen gegeven worden over de herstelkinetiek van deze cellijnen na bestraling met X-stralen of C-ionen.

5 Discussie

Kanker is in de westerse wereld nog steeds één van de meest voorkomende ziektes met een hoog sterftecijfer. Daarom is het essentieel dat er verder op zoek gegaan wordt naar behandelingen die de overlevingskansen doen stijgen. Radiotherapie, meer bepaald externe radiotherapie, is een veelgebruikte behandeling voor verschillende soorten kankers. Onderzoekers proberen om de conventionele radiotherapie met X-stralen op verschillende manieren te optimaliseren. Hierdoor wordt de tumor efficiënter behandeld en het normale omliggende weefsel beter gespaard, waardoor er minder bijwerkingen optreden. Naast de conventionele radiotherapie kan ook hadrontherapie uitgevoerd worden. Dit is een meer geavanceerde vorm van radiotherapie en maakt gebruik van versnelde, geladen deeltjes zoals protonen en C-ionen. Hadrontherapie wordt in verschillende landen reeds toegepast voor kankertherapie. Er is echter nog weinig geweten over de verschillen in biologische effecten tussen de conventionele vorm van therapie en hadrontherapie. Ook is er weinig geweten over de effecten van hadrontherapie op lange termijn. In het hadron project van het SCK•CEN worden de effecten van verschillende bestralingssoorten op *in vitro* humane kankercellen bestudeerd.

5.1 Stralingsgevoeligheid van PC3 en Caco-2 cellijnen

Het lineair kwadratisch model werd toegepast op de resultaten van de *colony survival assay* om de stralingsgevoeligheid van de PC3 en de Caco-2 cellen te onderzoeken na bestraling met C-ionen of X-stralen. Volgens dit model is de overleving van de PC3 cellen gedaald tot 10% wanneer deze cellen werden blootgesteld aan 3.68 Gy X-stralen of 2.20 Gy C-ionstralen. De bestraling van de Caco-2 cellen met 5.08 Gy X-stralen of 2.72 Gy C-ionstralen resulteerde ook in een overleving van 10%. Deze resultaten tonen dan ook aan dat de PC3 cellen meer gevoelig waren voor beide stralingssoorten vergeleken met Caco-2 cellen. Het verschil in gevoeligheid tussen de twee cellijnen is echter wel hoger na bestraling met X-stralen dan na bestraling met C-ionen. De RBE bedroeg respectievelijk 1.67 en 1.87 voor de PC3 en Caco-2 cellen, de RBE van de C-ionstralen is dus iets hoger voor de Caco-2 colonkanker cellen dan voor de PC3 prostaatkanker cellen. Wat aantoont dat de efficiëntie van C-ionstralen beter was bij meer radioresistente cellen zoals de PC3 cellen. De RBE van therapeutische C-ionstralen is echter nog hoger en varieert van 3 – 4 ter hoogte van de tumor. Dit verschil kan verklaard worden doordat de RBE onder andere afhankelijk is van de LET, zoals reeds besproken werd in de inleiding (Fig. 4). De LET van de therapeutische C-ionstralen kan stijgen tot 100 – 120 keV/μm ter hoogte van de tumor, terwijl de LET van de experimentele C-ionstralen in GANIL ~33.7 keV/μm bedroeg ter hoogte van de stalen. Suzuki *et al.* (2000) onderzocht de invloed van de LET op de RBE in 16 verschillende cellijnen. De cellijnen werden bestraald met C-ionstralen met een verschillende LET (LET = 13 en LET ~77 keV/μm). De RBE waarden werden berekend aan de hand van dosis die nodig was om de overleving te doen dalen tot 10% en varieerde van 1.06 – 1.33 voor de 13 keV/μm C-ionstraal en van 2.00 – 3.01 voor de ~77 keV/μm C-ionstraal. In deze studie werd dus aangetoond dat de RBE afhankelijk is van factoren zoals het biologisch model (de cellijn) en de LET van de bundel C-ionen.

Bij de bestraling van PC3 cellen met een lage dosis X-stralen (0.1 en 0.25 Gy) werd een hypergevoeligheid waargenomen. Dit fenomeen werd reeds in de literatuur beschreven. Wéra *et al.* (2012) beschreef de hypergevoeligheid van humane A549 longkanker carcinoma cellen na bestraling met lage dosissen X-stralen (0.125 – 0.5 Gy) en ³²P beta-deeltjes (0.125 – 0.5 Gy). Ook na bestraling met lage dosissen protonen (0.02 – 0.2 Gy; 10 keV/μm) werd vastgesteld dat deze cellen hypergevoelig waren aan bestraling (Wéra *et al.*, 2013). (Heuskin *et al.*, 2013) beschreef eveneens dat A549 cellen hypergevoelig

waren aan lage dosissen protonen (0.02 – 0.075 Gy; 25 keV/μm). Zij verklaren dit fenomeen aan de hand van de verschillende cellulaire herstelmechanismen die geactiveerd worden wanneer de cel DNA schade herkent. Vaak zijn deze mechanismen afhankelijk van de fase van de celcyclus waarin de cel zich bevindt. Bij lage bestralingsdosissen kan het zijn dat de hoeveelheid DNA schade zo klein is dat de cel dit als dusdanig niet herkent. De DNA schade wordt daardoor niet hersteld en dat leidt tot meer celdood en bijgevolg ook tot een lagere overlevingsfractie.

De stralingsgevoeligheid van de PC3 cellen werd ook onderzocht na bestraling met protonen. De RBE van de experimentele protonenbundel werd niet bepaald omwille van de onverwachte resultaten; overleving daalde niet onder 10% en bij een dosis van 3 Gy protonen werd zelf een stijging waar de overleving gedetecteerd. Er werd verwacht dat de hypergevoeligheid van de PC3 cellen kon waargenomen worden na bestraling met lage dosissen protonen, maar dit was niet het geval. Er zijn verschillende hypothesen om te verklaren waarom het onderzoek van de stralingsgevoeligheid van de PC3 cellen niet het verwachte resultaat gaf na bestraling met protonen. Om de stalen te kunnen bestralen met protonen moesten bestralingsringen voorbereid worden. In deze bestralingsringen moesten de PC3 cellen zich hechten op een fibronectin coating. Het is mogelijk dat de cellen hierdoor gemakkelijker clusteren nadat deze getrypsiniseerd en uitgeplaat werden. Doordat de cellen clusters gaan vormen kunnen de cellen elkaars groei bevorderen. Dit zou kunnen resulteren in een hogere overleving. Ook viel bij de analyse van de resultaten op dat de PE van de controlestalen zeer laag was in vergelijking met de andere bestralingsexperimenten. Mogelijks is hier een fout gemaakt in het maken van de verdunningsreeks. Ten slotte moet ook vermeld worden dat er maar één onafhankelijk bestralingsexperiment met protonen uitgevoerd werd.

5.2 Impact van lage en hoge LET ioniserende stralen op het verloop van de celcyclus

Ioniserende stralen met een lage of hoge LET induceren verschillende soorten DNA lesies, waaronder ook DSB. Deze straling geïnduceerde DSB worden beschouwd als de meest ernstige vorm van DNA schade. NHEJ en HR zijn twee belangrijke pathways die in staat zijn om DSB te herstellen. Welk herstelmechanisme zal optreden hangt af van de fase van de celcyclus. NHEJ kan namelijk in alle fasen van de celcyclus geactiveerd worden, terwijl HR enkel tijdens late S fase optreedt. De celcyclus wordt op verschillende punten gecontroleerd. Indien DNA schade gedetecteerd wordt, treedt een arrest van de celcyclus op zodat de cel de DNA schade kan herstellen. Wanneer de DNA schade niet hersteld kan worden, kan de cel geen mitotische deling ondergaan en celdood wordt geïnduceerd.

Het verloop van de celcyclus na de bestraling met X-stralen of C-ionen in PC3 en Caco-2 cellen werd op drie tijdstippen geanalyseerd aan de hand van flow cytometrie na kleuring met PI. Na de bestraling van PC3 cellen met 2 Gy C-ionen werd een persistente G2 arrest waargenomen; deze persistente G2 arrest werd dus waargenomen tot 72 uur na de bestralingsexperimenten. De G2 arrest ging gepaard met een significante daling van het aantal cellen in de G1 fase. Bestraling van PC3 cellen met 2 Gy X-stralen resulteerde echter niet in een persistente G2 arrest. Wanneer de PC3 cellen daarentegen bestraald werden met 5 Gy X-stralen werd er wel een persistente G2 arrest waargenomen. De RBE van de C-ionenstralen in GANIL werd berekend op 1.67, vandaar dat de C-ionenstralen bij een lagere bestralingsdosis een persistente G2 arrest kunnen induceren.

Na de bestraling van de Caco-2 cellen met 2 Gy C-ionen werd tot 48 uur na de bestraling een G2 arrest waargenomen. Het verloop van de celcyclus was na 72 uur genormaliseerd. Bij de bestraling van Caco-2 cellen met 2 en 5 Gy X-stralen werd er enkel na 24 uur een G2 arrest waargenomen. De berekende RBE van de C-ionenstralen in GANIL bedroeg 1.87 bij de bestraling van de Caco-2 cellen. Een lagere dosis C-ionen

induceerde dus een G2 arrest die langer werd waargenomen, vergeleken met de bestraling met X-stralen.

De bestralingsexperimenten tonen aan dat de respons op straling geïnduceerde DNA schade verschillend is in PC3 en Caco-2 cellen. Bestraling met X-stralen gaven een persistente G2 arrest bij 5 Gy bij PC3 cellen, terwijl deze G2 arrest bij Caco-2 cellen niet meer werd waargenomen op 48 uur na de bestraling. De bestraling van PC3 cellen met C-ionen leidde weer tot een persistente G2 arrest, maar bij de Caco-2 cellen werd deze G2 arrest na 72 uur niet meer waargenomen. Ondanks dat de RBE van de C-ionenstralen bij Caco-2 cellen hoger is dan bij PC3 cellen (respectievelijk 1.87 en 1.67), is de effectiviteit van de C-ionenstralen groter bij de bestraling van de PC3 cellen. Maalouf *et al.* (2009) toonden aan dat C-ionen met een LET van 33.6 keV/μm, vergelijkbaar met de LET van de C-ionen tijdens deze masterproef, een G2 arrest induceerde die langer duurde (24 – 72 uur) dan na de bestraling met X-stralen (24 uur) na de bestraling van twee types van hoofd- en nekanker cellijnen. De C-ionen waren ook in deze studie meer effectief in het induceren van een verandering in het verloop van de celcyclus dan de lage LET X-stralen.

5.3 De invloed van lage en hoge LET bestralingen op de vorming en het verdwijnen van de γ -H2AX foci

Eén van de eerste gebeurtenissen na de inductie van DSB door ioniserende stralen, is de vorming van γ -H2AX (fosforylatie van histon H2AX). Per DSB wordt er één γ -H2AX foci gevormd. Er zijn verschillende methoden om met behulp van antilichamen deze γ -H2AX foci te detecteren, zoals immunofluorescentie-microscopie, flow cytometrie en immunoblotting (Valdiglesias *et al.*, 2013). Vooral immunofluorescentie-microscopie en flow cytometrie worden veel gebruikt. Het voordeel van immunofluorescentie-microscopie is dat γ -H2AX foci tegelijkertijd gelokaliseerd en gekwantificeerd kunnen worden. Dit is interessant wanneer de hoeveelheid DNA schade en bijhorende herstelkinetiek wordt vergeleken op bepaalde tijdstippen na de bestraling met lage of hoge LET stralen. Het nadeel van de microscopische visualisatie van de γ -H2AX foci is dat het zeer arbeidsintensief is en relatief veel tijd in beslag neemt. Er zijn ondertussen veel software programma's ontwikkeld, zoals ImageJ (NIH), die zorgen voor een gemakkelijkere en snellere analyse van de resultaten. Deze software programma's maken het mogelijk om bij de analyse van de γ -H2AX foci ook rekening te houden met de parameter *spot occupancy*. Deze parameter is interessant wanneer cellen bestraald worden met hoge LET deeltjesstralen omdat dit aanleiding geeft tot geclusterde lesies. In deze geclusterde lesies kunnen γ -H2AX foci elkaar overlappen. Wanneer de *spot occupancy* mee in rekening wordt gebracht, kan het aantal γ -H2AX foci toch correct gekwantificeerd worden.

De γ -H2AX foci kunnen ook geanalyseerd worden met behulp van high-throughput flow cytometrie (Bonner *et al.*, 2008; Valdiglesias *et al.*, 2013). Flow cytometrie garandeert een snelle meting van de γ -H2AX niveaus in een groot aantal cellen. De γ -H2AX niveaus kunnen per fase van de celcyclus gemeten worden. Flow cytometrie heeft een lagere specificiteit dan immunofluorescentie-microscopie, maar uit een studie van Porcedda *et al.* (2008) blijkt dat beide technieken zijn even geschikt voor de evaluatie van γ -H2AX.

De γ -H2AX foci van de bestralingsexperimenten met X-stralen en C-ionen zouden in deze masterproef geanalyseerd worden via immunofluorescentie-microscopie. Wegens tijdsgebrek werd de analyse nog niet uitgevoerd. Zowel de vorming als het verdwijnen van de γ -H2AX foci zouden geëvalueerd worden op verschillende tijdstippen. Dit zou meer informatie geven over de herstelkinetiek van de PC3 en Caco-2 cellen na bestraling met verschillende stralingssoorten.

6 Besluit

Het hadron project van het SCK•CEN, waarin deze masterproef kader, heeft als doel om de effecten van verschillende stralingssoorten op *in vitro* humane kankercellen te bestuderen.

In deze masterproef werden humane prostaat adenocarcinoma kankercellen (PC3) en humane colon adenocarcinoma kankercellen (Caco-2) als *in vitro* model gebruikt om de effecten van X-stralen, protonen en C-ionen te analyseren.

PC3 prostaatkanker cellen waren gevoeliger aan de bestraling met X-stralen en C-ionen dan Caco-2 colonkanker cellen. De RBE van de bundel C-ionen in GANIL werd berekend op 1.67 en 1.87 voor de PC3 en Caco-2 cellen respectievelijk. **De efficiëntie van de C-ionen is beter bij de meer radioresistente PC3 prostaatkanker cellen dan bij de Caco-2 colonkanker cellen.** Er kan geen besluit getrokken worden over de impact van protonstralen op PC3 prostaatkanker cellen omdat dit experiment onverwachte resultaten opleverde.

De bestraling van PC3 prostaatkanker cellen resulteerde in een persistente G2 arrest na de bestraling met een 5 Gy X-stralen of 2 Gy C-ionen. De G2 arrest verhinderde dat de kankercellen konden delen, omdat de G2 arrest verhinderde dat de cellen een mitotische deling zouden ondergaan. **Er was dus een lagere dosis C-ionen nodig, vergeleken met X-stralen, om eenzelfde effect (persistente G2 arrest) te verkrijgen in de PC3 cellen.** Bestraling met 2 en 5 Gy X-stralen leidde tot een G2 arrest in Caco-2 colonkanker cellen die maar werd waargenomen tot 24 uur na bestraling. De bestraling met 2 Gy C-ionen op Caco-2 colonkanker cellen resulteerde daarentegen in een G2 arrest die werd waargenomen tot 48 uur na de bestraling. **Een lagere dosis C-ionen induceerde dus een G2 arrest in Caco-2 cellen dat langer werd waargenomen ten opzichte van de bestraling met X-stralen.**

Wegens tijdsgebrek werd de vorming en het verdwijnen van de γ -H2AX foci, gevormd ten gevolge van straling geïnduceerde DSB, nog niet uitgevoerd. De analyse hiervan zou meer informatie opleveren over de herstelkinetiek van Pc3 en Caco-2 cellen na de bestraling met X-stralen of C-ionen.

Referenties

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell* (Fifth Edition ed.). New York: Garland Science.
- Allen, C., Borak, T., Tsujii, H., & Nickoloff, J. (2011). Heavy charged particle radiobiology: using enhanced biological effectiveness and improved beam focusing to advanced cancer therapy. *Mutat. Res.*(711), 150-157.
- Ando, K., & Kase, Y. (2009). Biological characteristics of carbon ion-therapy. *Int. J. Radiat. Biol.*(85), 715-728.
- Azzam, E., Jay-Gerin, J., & Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters*(327), 48-60.
- Bee, L., Fabris, S., Cherubini, R., Mognato, M., & Celotti, L. (2013). The efficiency of homologous recombination and non-homologous end joining systems in repairing double-strand breaks during cell cycle progression. *PLoS ONE*(8), e69061.
- Bonner, W., Redon, C., Dickey, J., Nakamura, A., Sedelnikova, O., Solier, S., et al. (2008). gammaH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer.*(8), 957-967.
- Borek, C. (2004). Antioxidants and radiation therapy. *J. Nutr.*(134), 3207-3209.
- Cooper, G. (2006). *The cell: a molecular approach* (Fourth edition ed.). Sinauer Associates, Inc.
- Durante, M., & Loeffler, J. (2010). Charged particles in radiation oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*(7), 37-42.
- Errington, R., Ashby, D., Gore, S., Abrams, K., Myint, S., Bonnett, D., et al. (1991). High energy neutron treatment for pelvic cancers: study stopped because of increased mortality. *BMJ*(302), 1045-1051.
- Fokas, E., Kraft, G., An, H., & Engelenhart-Cabillic, R. (2009). Ion beam radiobiology and cancer: Time to update ourselves. *Biochim. et Biophys*(1796), 216-229.
- Franken, N., Rodermond, H., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*(1), 2315-2319.
- Girdhani, S., Sachs, R., & Hlatky, L. (2013). Biological effects of proton radiation: What we know and don't know. *Radiat. Res.*(179), 257-272.
- Guibot, C., Adjadj, E., Rubino, C., Schamsaldin, A., Grimaud, E., Hawkins, M., et al. (2005). Malignant breast tumors after radiotherapy for a first cancer during childhood. *J. Clin. Oncol.*(23), 197-204.
- Hada, M., & Georgakilas, A. (2008). Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *J. Radiat. Res.*(49), 203-210.
- Hall, E. (2006). Intensity-modulated radiation therapy, protons, and the risk of second cancers. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*(65), 1-7.
- Hall, E., & Giaccia, A. (2006). *Radiobiology for the radiologist* (Sixth edition ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Hall, E., & Hei, T. (2003). Genomic instability and bystander effects induced by high-LET radiation. *Oncogene*(22), 7034-7042.

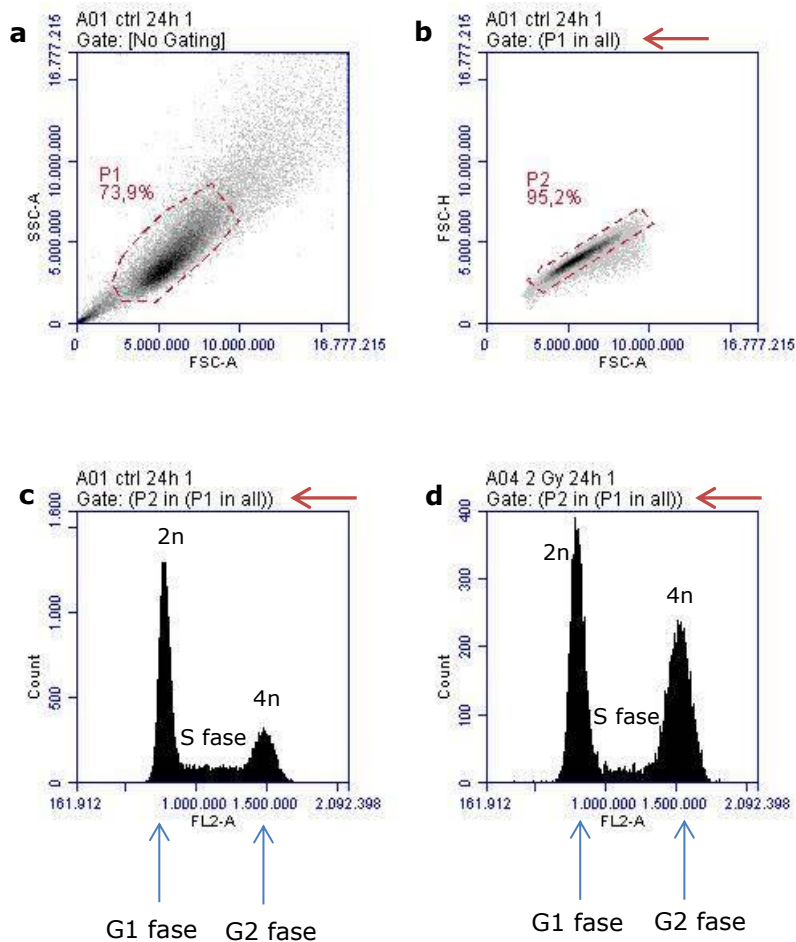
- Heuskin, A., Michiels, C., & Lucas, S. (2014). Low dose hypersensitivity following in vitro cell irradiation with charged particles: Is the mechanism the same as with X-ray radiation? *Int. J. Radiat. Biol.*(90), 81-89.
- Heuskin, A., Wéra, A., Riquier, H., Michiels, C., & Lucas, S. (2013). Low-dose hypersensitivity and bystander effect are not mutually exclusive in A549 lung carcinoma cells after irradiation with charged particles. *Radiat. Res.*(180), 491-498.
- Jäkel, O. (2006). Heavy ion radiotherapy. In *New technologies in radiation oncology* (pp. 365-378). Berlin, New York: W. Schlegel, T. Bortfeld.
- Jeggo, P., & Löbrich, M. (2006). Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair*(5), 1192-1198.
- Kargiotis, O., Geka, A., Rao, J., & Kyritsis, A. (2010). Effects of irradiation on tumor cell survival, invasion and angiogenesis. *J. Neurooncol.*(100), 323-338.
- Lievens, Y. (2007). Hadrontherapie: de stralen van de toekomst. *Azimus Zorg, onderzoek en ontwikkeling*(8), 14-18.
- Maalouf, M., Alphonse, G., Colliaux, A., Beuve, M., Trajkovic-Bodennec, S., Battiston-Montagne, P., et al. (2009). Different mechanisms of cell death in radiosensitive and radioresistant p53 mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines exposed to carbon ions and X-rays. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*(74), 200-209.
- Marc, M., & Langenegger, A. (2010). *Proton therapy: scattering versus scanning*. Retrieved maart 2014, from Medical physics web: www.medicalphysicsweb.org
- Marples, B., Wouters, B., Collins, S., Chalmers, A., & Joiner, M. (2004). Low-dose hyper-radiosensitivity: a consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-damaged G2-phase cells. *Radiat. Res.*(161), 247-255.
- Miralbell, R., Lomax, A., Cella, L., & Schneider, U. (2002). Potential reduction of the incidence of radiation-induced second cancers by using proton beams in the treatment of pediatric tumors. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*(54), 824-829.
- Munshi, A., Hobbs, M., & Meyn, R. (2005). Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol. Med.*(110), 21-28.
- National Cancer Institute. (2014). *What is cancer?* Retrieved februari 2014, from National Cancer Institute at the National Institute of Health: www.cancer.gov
- Particle Therapy Co-Operative Group. (2014, maart). *Facilities in operation*. Retrieved maart 2014, from Particle Therapy Co-Operative Group: <http://www.ptcog.ch>
- Particle Therapy Co-Operative Group. (2014, maart). *Particle therapy facilities under construction*. Retrieved maart 2014, from Particle Therapy Co-Operative Group: <http://www.ptcog.ch>
- Porcedda, P., Turinetti, V., Brusco, A., Cavalieri, S., Lantelme, E., Orlando, L., et al. (2008). A rapid flow cytometry test based on histon H2AX phosphorylation for the sensitive and specific diagnosis of ataxia telangiectasia. *Cytometry A.*(73), 508-516.
- Prize, K., Pinto, M., Newman, H., & Michael, B. (2001). A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering. *Radiat. Res.*(156), 572-576.

- Raju, M. (1995). Proton radiobiology, radiosurgery and radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol. Phys.*, 67, 237-259.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., & Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.*(12), 162-169.
- Sahbani, S., Girouard, S., Cloutier, P., Sanche, L., & Hunting, D. (2014). The relative contributions of DNA strand breaks, base damage and clustered lesions to the loss of DNA functionality induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.*(181), 99-110.
- Schipler, A., & Iliakis, G. (2013). DNA double-strand-breaks complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acid Res.*, 1-17.
- Schmid, T., Dollinger, G., Beisker, W., Hable, V., Greubel, C., Auer, S., et al. (2010). Differences in the kinetics of gamma-H2AX fluorescence decay after exposure to low and high LET radiation. *Int. J. Radiat. Biol. Phys.*(86), 628-691.
- SCK•CEN. (2012). *60 jaar ervaring in nucleaire wetenschap en technologie*. Retrieved maart 2014, from SCK•CEN Studiecentrum voor Kernenergie: www.sckcen.be
- Stichting Kankerregistratie. (2011). Retrieved februari 2014, from Stichting tegen Kanker: www.tegenkanker.be
- Stichting tegen Kanker. (2014). *Wat is kanker?* Retrieved februari 2014, from Stichting tegen Kanker: www.kanker.be
- Suzuki, M., Kase, Y., Yamaguchi, H., Kanai, T., & Ando, K. (2000). Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams. *Int. J. Radiation oncology Biol. Phys.*(48), 241-250.
- Tobias, C., Lawrence, J., Born, J., McCombs, R., Roberts, E., Anger, H., et al. (1958). Pituitary Irradiation with high-energy proton beams a preliminary report. *Cancer Res.*(18), 121-134.
- UZ Leuven. (2014, februari). *Nieuw centrum voor protontherapie in strijd tegen kanker*. Retrieved april 2014, from UZ Leuven Radiotherapie - oncologie: <http://www.uzleuven.be>
- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M., & Bonassi, S. (2013). gammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat. Res.*(753), 24-40.
- Vlaamse Liga Tegen Kanker. (2014). *Behandeling*. Retrieved februari 2014, from Vlaamse Liga tegen Kanker: www.tegenkanker.be
- Wang, H., Liu, S., Zhang, P., Zhang, S., Naidu, M., Wang, H., et al. (2009). S-phase cells are more sensitive to high-linear energy transfer radiation. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*(74), 1236-1241.
- Wéra, A., Borlon, C., Nuttens, V., Riquier, H., Feron, O., Michiels, C., et al. (2012). Comparison of the clonogenic survival of A549 non-small cell lung adenocarcinoma cells after irradiation with low-dose-rate beta particles and high-dose-rate X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*(88), 253-257.
- Wéra, A., Heuskin, A., Riquier, H., Michiels, C., & Lucas, S. (2013). Low-LET proton irradiation of A549 non-small cell lung adenocarcinoma cells: dose response and RBE determination. *Radiat. Res.*(179), 273-281.

Wilson, R. (1946). Radiological use of fast protins. *Radiology*(47), 487-491.

Appendix

Met behulp van de BD Accuri™ C6 flow cytometer (Becton, Dickinson and Company) werd de verdeling van de cellen in de celcyclus gemeten. Met de bijhorende BD Accuri™ C6 software werd de data geanalyseerd.



Figuur 18. De selectie van de celpopulatie en de verdeling van de cellen in verschillende fasen van de celcyclus. a-b) Scatter plots waarin de subpopulatie geselecteerd werd. c-d) Verdeling van de PC3 cellen in de celcyclus van respectievelijk een controlestaal en een staal dat bestraald werd met 2 Gy C-ionen.

In figuur 18a werd de zijwaartse lichtverstrooiing (*side scatter*, SSC) in functie van de voorwaartse lichtverstrooiing (*forward scatter*, FSC) weergegeven. De SSC geeft informatie over de interne structuur van de cel, terwijl de FSC meer informatie geeft over de celgrootte. In de eerste *scatter* plot werd de celpopulatie van interesse geselecteerd. In figuur 18b werd de *gate* ingesteld zodat enkel de cellen in P1 werd weergegeven (zie rode pijl). In deze grafiek staat de voorwaartse lichtverstrooiing zowel op de x-as als op de y-as uitgezet, hierdoor konden de doubletten gescheiden worden van de subpopulatie. De cellen werden gekleurd met PI, dus werd de intensiteit van het fluorescentiesignaal gemeten in het FL-2 kanaal. Figures 18c-d tonen het aantal cellen in functie van de intensiteit van de PI fluorescentie. Bij deze plots werd de *gate* zo ingesteld dat enkel de cellen in de P2 en P1 populatie geanalyseerd werden. De cellen in de G1 fase hebben een

DNA inhoud van $2n$, terwijl de cellen na de DNA synthese (S fase) een DNA inhoud hebben van $4n$ (G2 fase). Figuur 18c toont de verdeling van PC3 controle cellen in de celcyclus. De verdeling van PC3 cellen na bestraling met 2 Gy C-ionen is weergegeven in figuur 18d. Er is duidelijk een toename van het aantal cellen in de G2 fase op 24 uur na de bestraling met 2 Gy C-ionen. Door markers te plaatsen die de verschillende fasen van de celcyclus afbakenen, kon het percentage cellen per fase van de celcyclus berekend worden.