

Aus dem Bereich Biophysik  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. M. Löbrich

**Biophysikalische Untersuchung zur Wirkung verschieden  
energetischer Photonenstrahlung**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2008

Vorgelegt von  
Hans-Peter Kegel  
geboren am 20.04.1981 in Homburg



---

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Ionisierende Strahlen in der Medizin.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Grundlagen.....</b>	<b>10</b>
2.2.1. Physikalische Grundlagen.....	10
2.2.2. Strahlenwirkung in biologischen Systemen .....	16
2.2.2.1. DNA-Schäden durch ionisierende Strahlen .....	18
2.2.2.2. Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	19
2.2.2.3. Homologe Rekombination .....	20
2.2.2.4. Non Homologous End Joining .....	21
2.2.2.5. Die Rolle des Proteins Artemis bei der DSB-Reparatur .....	23
<b>2.3. Ziele der Arbeit.....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. Chemikalien und Lösungen .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2. Antikörper .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3. Zelllinien und Zellkultur .....</b>	<b>29</b>
3.3.1. MRC5: Primäre menschliche Lungenfibroblasten .....	30
3.3.2. HSF-1: Primäre menschliche Hautfibroblasten.....	30
3.3.3. Callum Jones: Primäre menschliche Hautfibroblasten.....	30
3.3.4. F01-240: Primäre menschliche Hautfibroblasten.....	31
3.3.5. 180BR: Primäre menschliche Hautfibroblasten .....	31
<b>3.4. Bestrahlungsgeräte .....</b>	<b>31</b>
3.4.1. C <sub>K</sub> -Röntgenröhre mit 0,28 keV .....	31
3.4.2. Röntgenröhre mit 25 kV Röhrenspannung.....	33
3.4.3. Röntgenröhre mit 120 kV Röhrenspannung.....	34
3.4.4. Bestrahlung mit <sup>137</sup> Caesium- $\gamma$ -Strahlung.....	35
<b>3.5. Strahlenmessgeräte.....</b>	<b>35</b>
3.5.1. Physikalische Dosimetrie an der 120 kV- und 25 kV-Röntgenröhre .....	36
3.5.2. Fricke-Dosimetrie .....	36
<b>3.6. Bestrahlungsbedingungen .....</b>	<b>38</b>
3.6.1. Bestrahlung auf Deckgläsern .....	38
3.6.2. Bestrahlung auf Mylarfolie .....	38
<b>3.7. Methoden zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen .....</b>	<b>39</b>
3.7.1. $\gamma$ -H2AX-Methode .....	39
3.7.2. Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	40
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Bestimmung der DSB-Induktion mit der <math>\gamma</math>-H2AX-Methode .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2. Untersuchung zum Einfluss des Materials der Zellunterlage auf die DSB-Induktion .....</b>	<b>47</b>

---

<b>4.3. Ergebnisse der Pulsfeld-Gelelektrophorese.....</b>	<b>49</b>
<b>4.4. DSB-Reparatur .....</b>	<b>52</b>
4.4.1. H2AX-Foci Analyse von reparaturprofizienten Zellen.....	52
4.4.2. $\gamma$ -H2AX-Foci Analyse von Reparatur-defizienten Zellen.....	55
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1. DSB-Induktion.....</b>	<b>63</b>
5.1.1. Einfluss der Sekundärelektronen aus dem Material der Zellunterlage DSB-Induktion .....	65
<b>5.2. DSB-Reparatur .....</b>	<b>69</b>
5.2.1. Reparatur in Wildtypzellen.....	69
5.2.2. Reparatur in Artemis-defizienten Zellen und Ligase4-defizienten Zellen .....	72
5.2.3. Bestimmung der DSB-Induktion mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese .....	78
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>81</b>
<b>7. PUBLIKATION / DANKSAGUNG.....</b>	<b>89</b>
<b>8. LEBENS LAUF .....</b>	<b>91</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BP	Basenpaar
C <sub>K</sub>	Carbon- K- Shell
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DNA- PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA- PKcs	katalytische Untereinheit der DNA- anhängigen Prpteinkinase
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESB	DNA-Einzelstrangbruch
FAR	<i>fraction of radioactivity released</i>
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
G0- Phase	Ruhephase der Zelle ( <i>gap-Phase</i> )
G1- Phase	Ruhe- / Wachstumsphase der Zelle nach der Zellteilung
G2- Phase	Ruhe- / Wachstumsphase der Zelle vor der Zellteilung
Gy	Gray (Einheit der Strahlungsdosis)
H2A	Histon H2A
H2AX	phosphoryliertes Histon H2A
HR	Homologe Rekombination
HSF	menschliche Hautfibroblasten ( <i>Human Skin Fibroblasts</i> )
IR	ionisierende Strahlung ( <i>ionizing radiation</i> )
Kbp	kilobasenpaar
kV	Kilovolt
LET	linearer Energie- Transfer
LIG4-Gen	Ligase-4-Gen
M- Phase	Mitose
Mbp	Megabasenpaar
MDS	<i>Multiply damaged site</i>
MEM	Basismedium ( <i>Minimal essential medium</i> )
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren ( <i>non essential amino acids</i> )
NHEJ	nicht homologe Endverknüpfung ( <i>non-homologous end joining</i> )
PBS	phosphatgepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PFGE	Pulsfeld- Gelelektrophorese

RBW	relative biologische Wirksamkeit
RT	Raumtemperatur
S- Phase	Synthesephase
UV	Ultraviolett
VDJ	<i>variable diversity joining</i>
nm	Nanometer
µm	Mikrometer
d	Tage
h	Stunden

## 1. Zusammenfassung

Seit Entdeckung der Röntgenstrahlen kommt in der Medizin ionisierende Strahlung mit unterschiedlichen Photonenenergien in Diagnostik und Therapie zum Einsatz. Ionisierende Strahlung kann die Struktur wichtiger biologischer Moleküle verändern und durch Veränderungen am Erbgut der Zellen letztlich zur Krebsentstehung führen. Bisher wurde aus praktischen Überlegungen die relative biologische Wirksamkeit (RBW) für alle Photonenenergien mit 1 angegeben. Verschiedene Untersuchungen zeigen jedoch, dass niederenergetische Röntgenstrahlung mit einer Maximalenergie von 29 kV (Mammographie-Röntgenstrahlung) verglichen mit hochenergetischer Röntgenstrahlung oder  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -Strahlung deutlich mehr neoplastische Transformationen, chromosomale Translokationen oder dizentrische Chromosomen erzeugt. Untersuchungen in der menschlichen Hybrid-Zelllinie CGL1 ergaben sogar eine RBW von 8 für Mammographie-Röntgenstrahlung mit einer Maximalenergie von 29 keV im Vergleich zu  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung in Bezug auf neoplastische Transformationen. Ein Grossteil der biologisch relevanten Schäden wird dabei durch innerhalb der Zelle entstehende geladene Teilchen, so genannte Sekundärelektronen verursacht. Verschiedene Arbeiten belegen, dass insbesondere niederenergetische Elektronen („track-end“-Elektronen), die einen Grossteil ihrer Energie in einem sehr kleinen Volumen im Zellkern deponieren, vermehrt zu „komplexen“ DNA-Doppelstrangbrüchen führen. Dabei handelt es sich um DNA-Doppelstrangbrüche mit zusätzlichen Schäden am DNA-Gerüst in der Nähe des Bruches. Hierzu zählen unter anderem Basenschäden, Einzelstrangbrüche oder DNA-Proteinvernetzungen. Bisher existieren nur wenige veröffentlichte Daten über die biologische Wirksamkeit der in der medizinischen Diagnostik verwendeten Röntgenstrahlen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Anzahl oder Komplexität der strahleninduzierten DSBs mit abnehmender Photonenenergie zunehmen und die gegenüber hochenergetischen Röntgenstrahlen erhöhte RBW für neoplastische Transformationen und chromosomale Aberrationen auch auf der Ebene von DSBs erklärt werden kann. Das Spektrum der in dieser Arbeit untersuchten Photonenenergien reicht von der ultraweichen  $C_K$ -Röntgenstrahlung (0,280 keV), über Mammographie-ähnliche Röntgenstrahlung (29 kV), CT-ähnliche Röntgenstrahlung (120 kV) bis  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -Strahlung (660 keV). Es wurde gezeigt, dass durch 120 kV-Röntgenstrahlung annähernd doppelt so viele DSBs induziert werden wie durch 29 kV-Röntgenstrahlung oder Gammastrahlung, wenn die Zellen auf einer Glasunterlage

bestrahlt werden. Der Grund hierfür sind Sekundärelektronen, die über den Photoeffekt von Materialien mit hoher Ordnungszahl (hier Silizium des Glases) emittiert werden. Ohne zusätzliche Emission von Sekundärelektronen aus dem die Zellen umgebenden Material ist die Induktion von 25 kV-, 120 kV- und Gammastrahlung annähernd gleich. C<sub>K</sub>-Röntgenstrahlung hingegen induziert unabhängig vom Material der Zellunterlage ca. doppelt so viele DSBs. Da die Metallo-β-Lactamase Artemis bei der Prozessierung komplexer DSBs eine wichtige Rolle spielt, konnte in Artemis-defizienten Zelllinien die Komplexität der induzierten DSBs untersucht werden. Es zeigte sich, dass nach Bestrahlung mit C<sub>K</sub>-Röntgenstrahlung über 10% mehr Artemis-abhängige und damit komplexe DSBs entstehen als nach Bestrahlung mit den höherenergetischen Photonenstrahlungen. Insbesondere scheinen Sekundärelektronen mit Energien unterhalb von 17 keV eine große biologische Wirksamkeit in Bezug auf Induktion und Komplexität der DSBs zu haben. Allerdings konnte die hohe RBW von bis zu 8 für Mammographie-ähnliche Röntgenstrahlung zumindest auf Ebene der DSBs und mit Hilfe der γ-H2AX-Foci-Methoden nicht erklärt werden.

## Summary

Since the discovery of X-rays there is a wide field for the use of ionizing radiations of different photon-energies in diagnostics and therapy. Ionizing radiation can mutate important biological molecules and lead to induction of cancer by genetic damage. Hitherto the Relative Biological Effectiveness (RBE) for all photon energies was quoted with 1. However, several studies show that low-energetic X-rays with a maximum photon energy of about 29 kV (as used in Mammograms) induces much more neoplastic transformations, chromosomal translocations and dicentric chromosomes than photon-radiation with higher energy. Studies with the human hybrid cell-line CGL1 attest a RBE of 8 to 29 keV x-rays for neoplastic transformations relative to  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -rays. A majority of relevant biological damage is caused by charged particles generated inside the cell, called secondary electrons. Studies have shown that particularly low energetic electrons (so called „track-end electrons“) can lead to an increased number of complex DSBs because they deposit the majority of their energy inside the nucleus in a very small volume. The complex DSBs include DSBs with additional damage on the DNA-structure around the break like base-damage, single strand breaks or DNA-protein-crosslinks. Hitherto there are existing only a few published data on the RBE of radiations used in medical diagnostics and therapy. In this present paper we examined if the number or complexity of radiation induced DSBs increase with decreasing photon energy and if this can explain the raised RBE for neoplastic transformations and chromosomal aberrations relative to high energetic radiation on the level of DSBs. The range of analyzed photon energies goes from  $\text{C}_K$ -X-rays (0,280 keV) over Mammogram-like X-rays (29 kV), CT-like X-rays (120 kV) to  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -rays (660 keV). We could show that 120 kV X-rays induce nearly twice as much DSBs as 29 kV X-rays or  $\gamma$ -rays if the cells are grown on a glass-coverslips. The cause therefor is the emission of secondary electrons via the photo-effect from materials with high atomic number (here: silicium from the glass). Without additional emission of these secondary electrons we could show that the DSB-induction for 25 kV-, 120 kV- X-rays and  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -rays is similar. Independent of the surrounding material, the induction of  $\text{C}_K$ -X-rays is twice as much. As the Metallo- $\beta$ -Lactamase Artemis is an important factor by the repair of complex DSBs, with Artemis-defective cell-lines we could investigate the complexity of induced DSBs. We could show that the fraction of Artemis-dependent breaks (complex breaks) is 10% higher after irradiation with  $\text{C}_K$ -X-rays than with the other photon energies. Particularly secondary electrons with energies far below 17 keV seem to have a high RBE

concerning the induction and complexity of DSBs. However the used methods couldn't explain the high RBE of 8 found in other studies for mammogram-like X-rays at least on the level of DSB-induction or complexity.

## 2. Einleitung

### 2.1. Ionisierende Strahlen in der Medizin

Seit Entdeckung der Röntgenstrahlen im Jahre 1895 finden ionisierende elektromagnetische (em) Strahlen Anwendung in der Medizin in Diagnostik und Therapie. Dabei kommen für die verschiedensten Anforderungen Strahlungen mit unterschiedlichen Energien zum Einsatz. In der Radiodiagnostik wird eine möglichst gute Abbildung der darzustellenden Strukturen bei gleichzeitig möglichst niedriger Strahlenbelastung des Patienten angestrebt. Der Einsatz unterschiedlicher Photonenenergien ermöglicht es, Gewebe mit unterschiedlichen Dichten und Morphologien röntgenologisch darzustellen. So erfordern Gewebe mit geringer Dichte, wie beispielsweise die Brust bei der Mammographie, eine Strahlung geringer Photonenenergie, um dennoch eine kontrastreiche Darstellung zu ermöglichen. Hingegen müssen die Photonen zur Aufnahme von Geweben höherer Dichte eine höhere Energie besitzen, um nicht vollständig vom Gewebe absorbiert zu werden. Andernfalls könnten Details nicht sichtbar gemacht werden. In der Mammographie kommen Röntgenröhren mit einer Betriebsspannung von ca. 29 kV zum Einsatz, während die Röntgenröhren in CT-Geräten mit einer Beschleunigungsspannung von ca. 120 kV betrieben werden. In der Strahlentherapie kommen je nach Tumorart- und Lokalisation sowohl Teilchenstrahlung, als auch elektromagnetische Strahlen unterschiedlicher Photonenenergien zum Einsatz. Nach dem zunächst euphorischen und relativ unbekümmerten Einsatz der neu entdeckten Strahlung, kam es bei medizinischem Personal, die sich ungeschützt der Strahlung ausgesetzt hatten, sowie auch bei den Patienten zu Strahlenschäden.

Zu den akuten Strahlenschäden gehörten beispielsweise die „Röntgenverbrennungen“ an den Händen und Armen der ersten Radiologen (Lloyd, 1968). Auch Spätfolgen wie die Induktion verschiedener Tumorerkrankungen oder Schäden am Erbgut konnte man im Laufe der Zeit mit der ionisierenden Strahlung in Verbindung bringen. Studien haben gezeigt, dass die relative biologische Wirksamkeit (RBW) ionisierender elektromagnetischer Strahlung keinesfalls für alle Photonenenergien gleich ist. Studien belegen, dass die biologische Wirksamkeit einer em-Strahlung von ihrem LET abhängt. C<sub>K</sub>-Röntgenstrahlung mit einer Photonenenergie von 0,28 keV erzeugt beispielsweise deutlich mehr neoplastische Transformationen (Frankenberg *et al.*, 1995) oder Chromosomenaberrationen (Schmid *et al.*,

2002) als Vergleichsstrahlung höherer Photonenenergie. Die von Frankenberg et al. durchgeführten Untersuchungen bescheinigen der in der Mammographie verwendeten Röntgenstrahlung mit einer Maximalenergie von 29 keV sogar eine RBW von 8 im Vergleich zu  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung für neoplastische Transformationen in der menschlichen Hybrid-Zelllinie CGL1 (Frankenberg *et al.*, 2002).

## 2.2. Grundlagen

### 2.2.1. Physikalische Grundlagen

#### 2.2.1.1. Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit Materie

Unter ionisierender Strahlung versteht man Teilchen- oder Wellenstrahlung, die in der Lage ist, Atome direkt oder indirekt zu ionisieren. Dazu gehört auch die Röntgen- und Gammastrahlung. Hierbei handelt es sich um em-Wellenstrahlung, die sich lediglich durch den Ort ihrer Entstehung unterscheidet. Gammastrahlung entsteht bei Kernprozessen. Röntgenstrahlen werden technisch z.B. in Röntgenröhren erzeugt, wo durch ein hohes elektrisches Feld schnell beschleunigte Elektronen auf eine Anode treffen und dort ihre Energie entweder in Form von Röntgenbremsstrahlung oder in Form der charakteristischen Eigenstrahlung (auch als diskrete Strahlung bezeichnet) abgeben. Bremsstrahlung entsteht, wenn die beschleunigten Elektronen im Felde des Atomkerns abgebremst werden. Die Differenz der kinetischen Energie des Elektrons wird in Form em-Strahlung abgegeben. Bei diesem Bremsspektrum handelt es sich um ein kontinuierliches Spektrum. Die Maximalenergie der entstehenden Photonen ist durch die Beschleunigungsspannung der Röntgenröhre vorgegeben. Ein anderer Teil der Elektronen erzeugt die charakteristische Strahlung oder diskrete Strahlung. Diese entsteht, wenn die auf das Anodenmaterial auftreffenden Elektronen Hüllelektronen des Anodenmaterials herausschlagen. Beim Wiederauffüllen der entstandenen Elektronenlücke durch ein kernferneres Elektron wird Energie in Form em-Strahlung emittiert. Diese ist umso energiereicher, je näher die Elektronenlücke zum Atomkern gelegen ist. Die Wellenlänge der charakteristischen Röntgenstrahlung ist von der Zahl der Elektronenschalen und somit vom verwendeten Anodenmaterial abhängig. Man kann die Strahlung als einen Strom von Photonen beschreiben,

wobei jedes einzelne Photon eine bestimmte Energie besitzt, die sich aus der Frequenz der Strahlung ergibt ( $E = h\nu$ ;  $\nu$  = Frequenz in Hz,  $h$  = Planck'sches Wirkungsquantum). Für die Betrachtung strahlenbiologischer Vorgänge ist diese Vorstellung hilfreich, da jedes einzelne Quant genügend Energie besitzt, zu ionisieren und damit chemische Strukturen zu verändern. Bei elektrisch geladener Teilchenstrahlung spricht man von direkter Ionisation, da sie bei der Wechselwirkung mit Materie direkt Orbitalelektronen aus einem Atom oder Molekül herausschlagen und dieses damit direkt ionisieren kann. Bei em-Strahlung spricht man von indirekter Ionisation, da die Photonen ungeladen sind und erst in Wechselwirkungsprozessen geladene Teilchen erzeugt werden. Diese treten dann ihrerseits wieder mit Materie in Wechselwirkung.

Ionisierende Strahlung führt zu einer Reihe von Wechselwirkungen mit Materie, die letztendlich auch für die biologische Wirksamkeit einer Strahlung verantwortlich sind. Die Photonen sind aufgrund ihrer hohen Energie in der Lage, chemische Verbindungen in den Zellen zu verändern. Dabei geben sie ihre Energie teilweise oder vollständig an ein Elektron aus der Atomhülle eines Atomverbandes ab. Das Atom kann zum Beispiel in einen angeregten Zustand versetzt oder gar ionisiert werden. Zur Ionisation kommt es, wenn die Strahlung ausreichend Energie besitzt, Elektronen aus der Atomhülle eines Atoms zu lösen. Es bleibt somit ein positiv geladenes Teilchen zurück. Die wesentlichen physikalischen Effekte, die zur Wechselwirkung mit Materie und damit zur Schwächung einer eintreffenden Strahlung führen, sind der Photoeffekt, die Streuung (klassische Streuung und Comptonstreuung) und die Paarbildung, wobei letztere erst bei Photonenenergien über 1,02 MeV auftritt und deshalb hier vernachlässigt werden kann. Bei allen Prozessen können sowohl Photonen als auch freie Elektronen als Sekundärstrahlung auftreten. Welcher Vorgang hier überwiegt hängt von der Energie der einfallenden Photonen und der schwächenden Substanz ab. Bei Photonenenergien um 60 keV beträgt der Anteil der durch Photo- bzw. Comptonelektronen deponierten Energie jeweils ca. 50%. Zu kleineren Photonenenergien hin überwiegt der Anteil der durch Photoelektronen deponierten Energie, bei höheren Photonenenergien der Anteil der durch Comptonelektronen deponierten Energie. Einen Überblick über die Energieverteilung zwischen Photo- und Comptonelektronen in Abhängigkeit von der Energie der eintreffenden Photonen gibt Tabelle 1 wieder.

Auf die Energieabsorption durch den Photo- und den Comptoneffekt soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Wellenlänge  $\times 10^{-10}\text{m}$	Energie der Strahlungsquanten  keV	Energie der Photoelektronen  keV	Energie der Compton-Elektronen		Anteil an der gesamten Elektronenenergie	
			maximal  keV	im Mittel  keV	Photo-Elektronen  %	Compton-Elektronen  %
1,213	10,2	9,7	0,39	0,19	99,9	0,1
0,809	15,3	14,8	0,87	0,43	99,6	0,4
0,404	30,7	30,2	3,28	1,62	93,7	6,3
0,303	40,9	40,4	5,64	2,79	83,3	16,7
0,202	61,4	60,9	11,86	5,83	52,4	47,6
0,135	91,8	91,3	24,34	11,89	20,3	79,7
0,101	122,8	122,3	39,76	19,50	8,4	91,6
0,0735	168,7	168,2	67,02	32,93	3,0	97,0
0,0506	245,0	244,5	120,1	59,49	0,9	99,1
0,0404	306,9	306,4	167,2	83,55	0,4	99,6
0,0243	510,3	509,8	340,6	176,0	0,1	99,9
0,0121	1025	1024,5	817,3	452,6	~0	~100

**Tabelle 1:** Verteilung zwischen Photo- und Comptoneffekt in Abhängigkeit von der Energie der eintreffenden Photonen. Die Paarbildung ist hier nicht aufgeführt, da sie bei den in dieser Arbeit verwendeten Photonenenergien nicht auftritt. (aus: Glocker & Macherauch, 1971).

### 2.2.1.2. Photoeffekt

Beim Photoeffekt kommt es zur Wechselwirkung zwischen dem eintreffenden Photon und den Elektronen der Atomhülle. Das Photon überträgt seine gesamte Energie auf ein Elektron der Atomhülle. Das Elektron wird vom Atom gelöst und das Atom damit ionisiert. Beim Wiederbesetzen der Elektronenlücke mit einem kernferneren Elektron wird die Energiedifferenz des Elektrons zwischen seinem ursprünglichen und seinem neuen Platz in Form em-Strahlung abgegeben. Die Energie der abgegebenen Strahlung ist für jedes Element charakteristisch, da es für jede Atomart nur bestimmte, für diese charakteristische Zahlenwerte der Energieniveaus gibt. Man spricht deshalb auch von charakteristischer Eigenstrahlung. Die Wiederbesetzung der Elektronenlücke kann ebenso stufenweise erfolgen, z.B. kann ein freigewordener Platz in der K-Schale zunächst von einem Elektron aus der L-Schale und dieser wiederum von einem Elektron aus der M-Schale ersetzt werden.

Bei der Photoabsorption entstehen neben em-Strahlung auch noch Sekundärelektronen, die so genannten Photoelektronen. Diese spielen eine große Rolle für die biologische Wirksamkeit.

Wie bereits erwähnt, nehmen die Elektronen der Atomhülle praktisch die gesamte Energie der einfallenden Photonen auf und verlassen die Atomhülle. Da die Ablösearbeit der Elektronen im Vergleich zu der Energie der eintreffenden Photonen relativ gering ist, besitzen die Photoelektronen fast die gesamte Energie des Photons. Die entstehenden Photonen haben demnach eine einheitliche Energie, wenn auch die einfallende Photonenstrahlung monoenergetisch ist. Dies ist im Wesentlichen bei der Bestrahlung mit der  $C_K$ -Strahlung der Fall, nicht jedoch bei Bestrahlung mit der 25 kV- und der 120 kV-Röntgenstrahlung, da hier ein breites Photonenspektrum vorliegt. Eine Besonderheit ist, dass bei der Photoabsorption die Rückgruppierung der Elektronenanordnung auch ohne Aussendung von em-Strahlung ablaufen kann. In diesem Fall wird die Energie zur Lösung eines weiteren Elektrons aufgewendet, das als *AUGER*-Elektron bezeichnet wird. Dieser Effekt tritt vorzugsweise bei leichtatomigen Elementen auf und wird auch als „strahlungsloser Übergang“ bezeichnet. Nach Kellerer et al (2002) beträgt die Energie der intrazellulär freigesetzten Auger-Elektronen im Wesentlichen 500 eV. Die Schwächung der einfallenden Strahlung lässt sich mit dem Massenabsorptionskoeffizienten  $\tau/\rho$  beschreiben:

$$\tau/\rho = C \lambda^3 Z^3$$

( $\lambda$ =Wellenlänge,  $Z$ =Ordnungszahl,  $C$ =materialunabhängige universelle Konstante)

Man sieht also, dass die Schwächung durch den Photoeffekt ungefähr proportional zu  $Z^3$  ist. Diese Tatsache kann auch für biologische Vorgänge wichtig sein und wird in Kapitel 5.1.1. diskutiert.

### 2.2.1.3. Comptoneffekt

Neben der Schwächung durch den Photoeffekt, kann es oberhalb einer gewissen Energiegrenze zur Compton-Streuung kommen. Bei diesem Vorgang tritt ein Strahlungsquant in Wechselwirkung mit einem lose gebundenen Hüllelektron. Es überträgt einen Teil seiner Energie auf dieses und fliegt mit einer geringeren Energie weiter. Dabei wird es in einem bestimmten Winkel gestreut. Das aus dem Atomverband gelöste Comptonelektron besitzt eine Energie, die der Differenz aus der ursprünglichen Energie des Photons und der Energie nach der Wechselwirkung mit dem Elektron entspricht. Das Elektron wird in einem vom Streuwinkel des Photons abhängigen Emissionswinkel emittiert. Da die Energieabgabe des einfallenden Photons auf das Elektron von der Streurichtung abhängt und diese Wahrscheinlichkeitsgesetzen unterliegt, haben die Comptonelektronen auch bei

monoenergetischer Primärstrahlung alle möglichen Energien. Maximalwert und Mittelwert der Energie der Comptonelektronen gibt Tabelle 1 wieder.

#### 2.2.1.4. Dosis, Linearer Energietransfer und Relative Biologische Wirksamkeit

Trifft ionisierende elektromagnetische Strahlung auf Materie, so deponiert sie Energie durch Ionisation und Anregung. Die hierbei entstehende Sekundärstrahlung kann sowohl aus Teilchen (Photoelektronen, Comptonelektronen)- als auch aus Wellenstrahlung (charakteristische Eigenstrahlung, Streustrahlung) bestehen. Die Sekundärstrahlung kann die betrachtete Materie verlassen oder weiterhin ihre Energie in ihr deponieren. Zur Quantifizierung biologischer Effekte durch ionisierende Strahlung verwendet man den Begriff der Energiedosis. Darunter wird die pro Massenelement  $\Delta m$  deponierte Energie  $\Delta E_{\text{abs}}$  verstanden:

$$D = \frac{\Delta E_{\text{abs}}}{\Delta m} [\text{Gy}] = [\text{J/kg}]$$

In biologischen Systemen erfolgt die Energiedeposition elektromagnetischer Strahlung im Wesentlichen durch Sekundärelektronen (Nikjoo & Goodhead, 1991b). Diese hinterlassen entlang ihrer Bahnspur abhängig von ihrer Energie eine mehr oder weniger hohe Zahl an Ionisationen. Abhängig von der Dichte der auftretenden Ionisationen unterscheidet man hier zwischen dicht- und dünn ionisierender Strahlung. Die in dieser Arbeit betrachteten Röntgen- und Gammastrahlen werden zu den dünn ionisierenden Strahlen gezählt. Beispielsweise erzeugt die Spur eines Elektrons, ausgelöst durch  $\gamma$ -Strahlung, das einen  $8\mu\text{m}$  durchmessenden Zellkern durchquert ca. 70 Ionisationen. Im Vergleich zu den ca. 23000 Ionisationen, die ein 4 MeV Alpha-Teilchen erzeugen kann, ist dies wenig (Goodhead, 1992). Jedoch kann es auch bei Einwirkung dünn ionisierender Strahlung einzelne Bereiche im Zellkern geben, in denen eine hohe Anzahl Ionisationen auf kleinem Raum vorliegt. Ein durch dünn ionisierende Strahlung erzeugtes Elektron kann beispielsweise seine gesamte kinetische Energie im Bereich weniger nm im Zellkern deponieren. Kommt die Bahnspur eines Elektrons also innerhalb des betrachteten Bereichs zum Erliegen, spricht man von „track-end“-Elektronen. Je näher die Orte der Ionisationsereignisse beieinander liegen, desto dichter ionisierend ist die Strahlung. Um dies zu beschreiben, führt man den Linearen Energie

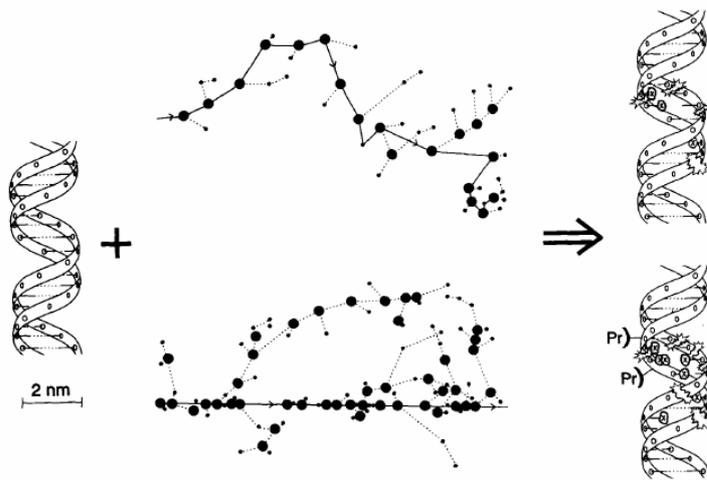
Transfer (LET) ein. Er gibt die pro Wegstrecke im betrachteten Volumen („lokal“) absorbierte Energie in keV/ $\mu\text{m}$  an:

$$\text{LET} = \frac{\text{lokal absorbierte Energie}}{\text{durchlaufene Wegstrecke}} \quad [\text{keV}/\mu\text{m}]$$

Vereinbarungsgemäß gilt eine Elektronenreichweite von ca. 5 nm (entsprechend 100 eV) als „lokal“. Wie bereits erwähnt wird die Energiedosis (die pro Massenelement absorbierte Energie) zur Beschreibung biologischer Effekte verwendet. Allerdings haben unterschiedliche Strahlenarten bei gleicher Dosis unterschiedliche Auswirkungen auf ein biologisches System. So erzeugen beispielsweise eine bestimmte Dosis  $\alpha$ -Strahlung, je nach betrachtetem biologischem Endpunkt, weitaus mehr Schäden als die gleiche Dosis  $\gamma$ -Strahlung (Brooks, 1975; Nikjoo *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2003). Um diesen Effekt zu berücksichtigen, führt man in der Strahlenbiologie den Begriff der Relativen Biologischen Wirksamkeit ein. Sie ist definiert durch das Verhältnis der Dosis einer Bezugsstrahlung zu der Dosis einer zu vergleichenden Strahlung, mit der am gleichen biologischen Objekt die gleiche biologische Wirkung zu erzielen ist:

$$\text{RBW} = \left[ \frac{D(250 \text{ kV-Röntgen})}{D(\text{Test})} \right]_{\text{Isoeffekt}}$$

Üblicherweise wird als Referenzstrahlung 250 kV- Röntgen- oder  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -Strahlung verwendet. Aus diesen Überlegungen leitet sich ein Qualitätsfaktor für die verschiedenen Strahlenarten ab, der die biologische Wirksamkeit dieser Strahlung gegenüber der Referenzstrahlung beschreibt. Dieser wird für Elektronen, Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung mit 1 angegeben und für  $\alpha$ -Teilchen mit 20.

**Abbildung 1**

Schematische Darstellung der Unterschiede in der Wirkung dünn- und dicht ionisierender Strahlung. Oben: Simulation der Ionisationsspur eines 500 eV Elektrons. Unten: Simulation der Spur eines 4 MeV  $\alpha$ -Teilchens. Rechts sind die durch die Teilchenspuren erzeugten DNA-Schäden dargestellt.

Basenschäden: ⊗

DNA-Proteinvernetzungen: Pr

Ionisationen: ●

Anregungen: •

(Goodhead, 1994)

## 2.2.2. Strahlenwirkung in biologischen Systemen

### 2.2.2.1. Direkte und indirekte Effekte

Die biologische Wirksamkeit ionisierender Photonenstrahlung beruht im Wesentlichen auf ihrer DNA-schädigenden Wirkung. Sie ist in der Lage, über verschiedene Wechselwirkungsprozesse (siehe Kapitel 2.2.1.) chemische Verbindungen zu verändern. In der Strahlenbiologie unterscheidet man direkte und indirekte Strahlenwirkung. Die direkte Strahlenwirkung tritt vorwiegend bei dicht ionisierender Strahlung wie z.B. nach dem Beschuss mit  $\alpha$ -Teilchen auf. Das Strahlungsteilchen wechselwirkt mit einem Atom oder Molekül der DNA und versetzt es in einen angeregten oder ionisierten Zustand, was wiederum zu strukturellen Veränderungen führen kann (ref). Dünn ionisierende Strahlung wie die hier betrachtete em-Strahlung, hingegen führt vor allem über die indirekte Strahlenwirkung zu DNA-Schäden. Dabei entstehen unter dem Einfluss der Strahlung freie Radikale in der Zelle, die in DNA-Nähe diffundieren und dort Schaden anrichten können. Durch den hohen Wassergehalt der Zelle sind insbesondere die ionisierten Formen des Wassermoleküls für die indirekte Strahlenwirkung verantwortlich. Trifft ein Photon oder ein geladenes Teilchen auf ein Wassermolekül, können folgende Reaktionen ablaufen:

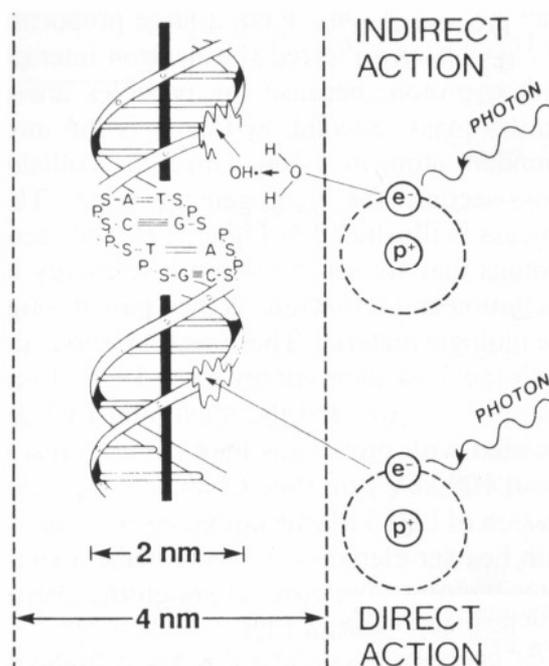


$\text{H}_2\text{O}^+$  ist ein einfach positiv geladenes hochreaktives Ionenradikal mit einem ungepaarten Elektron in der äußeren Hülle. Die primären Ionenradikale haben eine sehr kurze

Halbwertszeit von nur ca.  $10^{-10}$  sec, können aber mit weiteren Wassermolekülen wechselwirken und das ebenfalls hochreaktive Hydroxyl-Radikal ( $\text{OH}\cdot$ ) bilden:



Da das Hydroxyl-Radikal wiederum nur Halbwertszeit von ca.  $10^{-10}$  sec besitzt (Acworth *et al.*, 1999), werden für die DNA-Schäden nur solche Radikale verantwortlich gemacht, die in einem Bereich von wenigen Nanometern um die DNA entstehen (Goodhead, 1994). Durch ihr hohes Redoxpotential von ca. +2 V treten Hydroxyl-Radikale mit fast jeder Art von Molekülen in biologischen Systemen in Wechselwirkung (Gutteridge, 1994). Untersuchungen mit Radikalfängern deuten darauf hin, dass ca. 65% der durch ionisierende em-Strahlung verursachten Schäden auf Hydroxyl-Radikale zurückzuführen sind (Chapman *et al.*, 1973; Roots & Okada, 1972).



**Abbildung 2**

Direkte und indirekte Strahlenwirkung: Bei der direkten Strahlenwirkung kommt es zur unmittelbaren Wechselwirkung eines durch die ionisierende Strahlung ausgelösten Sekundärelektrons mit der DNA (untere Bildhälfte). Beim indirekten Effekt kommt es zunächst zur Bildung von freien Radikalen durch Wechselwirkung eines Sekundärelektrons mit den in der Zelle vorhandenen Wassermolekülen (hier ein Hydroxyl-Radikal  $\text{OH}\cdot$ , obere Bildhälfte). Das Radikal wiederum kann dann die DNA schädigen. Man nimmt an, dass Radikale, die in einem Umfeld von ca. 4 nm um die DNA-Doppelhelix herum erzeugt werden, mit der DNA wechselwirken können. Der direkte Effekt tritt bevorzugt bei dicht ionisierender Strahlung auf, der indirekte bei dünn ionisierender Strahlung. (S: Zucker, P: Phosphor, A: Adenin, T: Thymin, G: Guanin, C: Cytosin); aus: (Hall, 2000).

### 2.2.2.1. DNA-Schäden durch ionisierende Strahlen

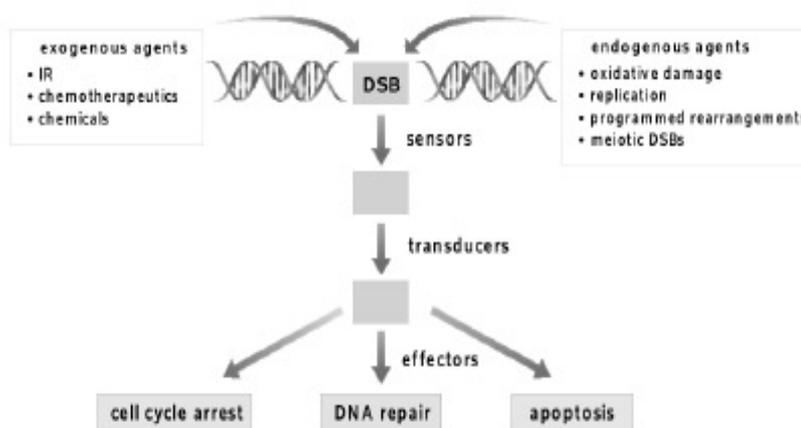
Schon sehr früh nach Entdeckung der ionisierenden Strahlen und insbesondere ihrer Anwendung in der Medizin, kamen Erkenntnisse über deren zellschädigende Wirkung. Der ungeschützte Umgang mit ionisierender Strahlung durch Radiologen und technisches Personal führte beispielsweise zu verbrennungsähnlichen Hautreaktionen und im späteren Verlauf zu bösartigen Tumoren (Lloyd, 1968). Sichere Hinweise, dass die DNA der strahlensensibelste Bestandteil unserer Zellen ist, lieferten „Microbeam“-Experimente, in denen gezielt einzelne Zellorganellen bestrahlt wurden (Cole *et al.*, 1963; Munro, 1970). Ionisierende em-Strahlung führt über die direkte oder indirekte Strahlenwirkung zu chemischen Reaktionen, die an der DNA zu mehr oder weniger schwerwiegenden Veränderungen führen können. Im einfachsten Falle können einzelne Basen in ihrer Struktur verändert werden. Desaminierungen oder Depurinierungen kommen ebenso wie der komplette Verlust einer Base (Deletion) mehrere tausend Mal pro Tag in den Zellen des menschlichen Körpers vor. Sie entstehen exogen unter der Einwirkung von beispielsweise UVB-Strahlung, aber auch endogen unter der oxidativen Wirkung von Stoffwechselprodukten (Richter *et al.*, 1988). Berechnungen ergeben, dass 1 Gy einer ionisierenden Strahlung ca. 2500-3000 Basenschäden und ca. 1000 Einzelstrangbrüche pro Zelle erzeugt. Diese Schäden können durch die Basenexzisionsreparatur oder die Nukleotidexzisionsreparatur behoben werden. Abhängig von der Base auf dem komplementären DNA-Strang wird die fehlerhafte Base ersetzt. Da die Reparatur von Basenschäden und Einzelstrangbrüchen relativ fehlerfrei abläuft, spielen diese DNA-Schäden bei strahlenbedingten Folgen wie Mutationen keine große Rolle (Ward, 1995). Unter Einwirkung sowohl dünn- als auch dicht ionisierender Strahlung kann es zur inhomogenen Verteilung der Energieabgabe innerhalb der Zelle kommen, so dass es zu lokalen Häufungen von freien Radikalen kommen kann („Blobs“) (Ward, 1990). Finden sich diese Anhäufungen innerhalb eines gewissen Radius um die DNA, kann es zu Mehrfachschädigungen der DNA kommen, die als „Multiply damaged sites“ (MDS) bezeichnet werden. Diese MDS können neben Basenschäden auch Einzelstrangbrüche (ESBs) enthalten. Befinden sich zwei ESBs an gegenüberliegenden Stellen der DNA-Stränge (nicht mehr als 10 bp auseinander), kommt es zur Bildung von DSBs (Friedland *et al.*, 1999).

Untersuchungen zeigen, dass DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) die entscheidende Läsion nach Einwirkung ionisierender Strahlung in Bezug auf Überlebensfähigkeit der Zelle (Chu, 1997; Kanaar *et al.*, 1998), chromosomale Instabilität (Myung & Kolodner, 2003) oder

Mutagenität sind (Zhang *et al.*, 2006). In mehrzelligen Organismen kann bereits ein DSB zum Zelltod führen, wenn dieser zur Inaktivierung eines wichtigen Genprodukts oder zur Apoptose führt (Jackson, 2002).

### 2.2.2.2. Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die in eukaryoten Zellen entstehenden DSBs müssen zur korrekten Weitergabe der genetischen Information bzw. zum Erhalt der Lebensfähigkeit der Zelle erkannt und beseitigt werden. Deshalb finden sich in eukaryoten Zellen mehrere Systeme, die DSBs erkennen und reparieren können. Andernfalls kann nur noch der induzierte Zellzyklusarrest, die Apoptose oder der mitotische Zelltod die Weitergabe von schadhaftem genomischem Material verhindern. Die Erkennung und Beseitigung der DSBs erfolgt in eine Art Signal-Transduktionskaskade (siehe Abbildung 3). Dabei stellt die räumliche Veränderung der DNA- oder Chromatinstruktur, die durch Sensorproteine erkannt wird, das Signal zur Einleitung der Kaskade dar. Das Signal wird durch so genannte Transducer-Proteine verstärkt und zu den Effektor-Proteinen geleitet. Diese sorgen für die Ausführung des jeweiligen Reparaturvorgangs. In eukaryoten Zellen sind im Wesentlichen zwei Reparaturwege für die Prozessierung von DSBs verantwortlich: zum einen das Nicht Homologe Endjoining (NHEJ) und zum anderen die Homologe Rekombination (HR). Welchen Reparaturweg die Zelle wann einschlägt, ist noch nicht vollständig geklärt, hängt aber im Wesentlichen von der Zellzyklusphase ab, in der sich die Zelle zum Zeitpunkt des Schadens befindet.



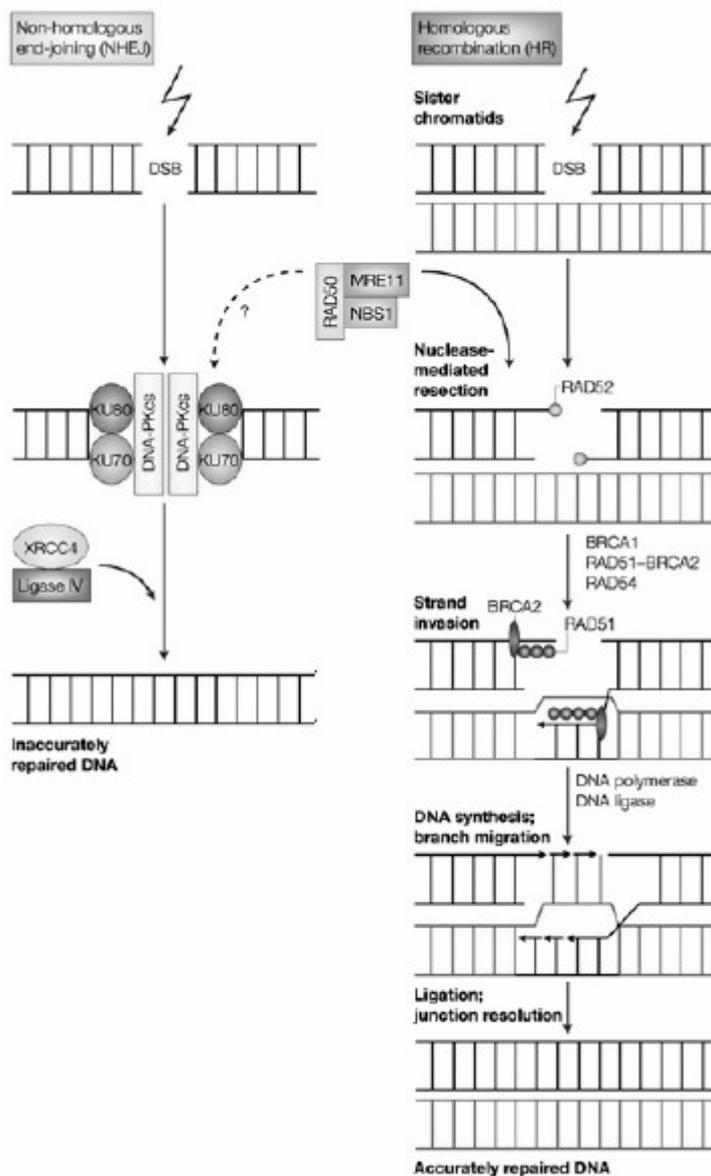
**Abbildung 3**

Schematische Darstellung der zellulären Signal-Transduktionskaskade, die nach Auftreten eines DSB abläuft: Sensorproteine erkennen die räumliche Änderung der DNA-Struktur, Transducer-Proteine verstärken das Schadenssignal und leiten es an Effektorproteine weiter. (Aus: (Khanna & Jackson, 2001)

### 2.2.2.3. Homologe Rekombination

Die HR verwendet als Vorlage zur Reparatur von DSBs DNA-Informationen in Form homologer Sequenzen des homologen Chromosoms oder des intakten Schwesterchromatids. DSBs werden somit fehlerfrei repariert. Da intakte DNA-Sequenzen als Vorlage benötigt werden, kann dieser Reparaturweg demnach nur eingeschlagen werden, wenn Chromosomen mit zwei Schwesterchromatiden oder homologe Chromosomen vorliegen (in der G<sub>2</sub>-Phase nach Chromosomenduplikation bzw. in der S-Phase) (Rothkamm *et al.*, 2003). Allerdings scheint die HR in höheren Eukaryoten, im Gegensatz zu niederen Eukaryoten wie beispielsweise der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, eine geringere Rolle als NHEJ zu spielen (Rothkamm *et al.*, 2003). Zudem scheint die HR zwischen homologen Chromosomen in Säugerzellen unterdrückt zu werden. Dies könnte an der in Säugerzellen hohen Zahl repetitiver Sequenzen (ca. 40% des Genoms) liegen, die die Gefahr von Fehlreparaturereignissen und chromosomalen Translokationen zwischen homologen Regionen birgt (Takata *et al.*, 1998). Die HR wurde ursprünglich in Bakterien und Hefen untersucht. Es wurde aber schnell klar, dass dieser Reparaturweg auch von den Zellen höherer Organismen eingeschlagen wird (Jackson, 2002). In Säugerzellen sind im Wesentlichen die Proteine der RAD52-Epistasisgruppe (radiation sensitive) an den Prozessen der HR beteiligt. Die meisten dieser Gene wurden im Zusammenhang mit Mutationen identifiziert, die zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit der betroffenen Zelle führen. Hierzu gehören die Proteine RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, sowie MRE11 und NBS1 (Hall, 2000; Thompson & Schild, 2002). Zunächst lokalisiert der MRN-Komplex, bestehend aus Mre11, Rad50 und NBS1 an den DSB und verknüpft über Rad50 die beiden losen DNA-Enden miteinander, um sie in räumlicher Nähe zu halten (Krogh & Symington, 2004). Dann findet eine nukleolytische Resektion des Bruchendes in 5'→3'-Richtung statt, wodurch ein 3'-ss-Überhang entsteht. Hieran ist wahrscheinlich ein Komplex aus Rad50p, Mre11p und NBS1 beteiligt, dem nun freies 3'-ss-Ende lagert sich RPA (replication protein) an, welches die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert (Lisby *et al.*, 2004). Im Folgenden nimmt die Rekombinase Rad51 den Platz von RPA ein und es entsteht ein Rad51-Nukleoproteinfilament (Symington, 2005). Dieses Nukleoproteinfilament sucht nun die homologe Sequenz auf dem unbeschädigten Schwesterchromatid oder Schwesterchromosom. Unter Ausbildung eines D-Bogens dringt das Filament in die DNA ein und mit Hilfe von Rad54 (DNA-ATPase) beginnt die DNA-Synthese in 5'→3'-Richtung. Nach Ablauf dieses

Vorganges werden die DNA-Enden durch die Ligase1 ligiert und eventuelle *Holliday*-Junctions aufgelöst. Damit ist die Reparatur des DSB abgeschlossen.



**Abbildung 4**

Schematische Darstellung der Vorgänge des NHEJ und der HR.

Bei der HR spielen die Proteine der Rad52-Epistasiegruppe eine wichtige Rolle. Zunächst bindet Rad52 an die Strang-Enden. Rad51 bildet ein Nukleoproteinfilament, welches unter Ausbildung eines D-Bogens in den homologen, unbeschädigten Strang des Schwesterchromosoms oder Schwesterchromatids eindringt. Unter Einwirkung von Rad54 beginnt die DNA-Synthese in 5'->3'-Richtung; anschließend werden die DNA-Stränge durch die Ligase1 ligiert. (Aus: (Shiloh, 2003)

### 2.2.2.4. Non Homologous End Joining

Das Non Homologous End Joining (NHEJ) spielt in Säugerzellen in den meisten Zellzyklusphasen die wichtigste Rolle bei der DSB-Reparatur. Im Gegensatz zur HR werden hier die DNA-Bruchenden direkt miteinander verknüpft. Es wird keine intakte DNA-Sequenz

als Vorlage benötigt, womit das NHEJ vor allem in der G<sub>1</sub> und G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus an der DSB-Reparatur beteiligt ist (Rothkamm *et al.*, 2003). Dieser Reparaturweg läuft schnell ab, ist aber fehleranfälliger als die HR (Pfeiffer *et al.*, 2004). Das NHEJ ist jedoch nicht nur an der Reparatur strahleninduzierter DSBs beteiligt, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der für die Antikörper- und T-Zell-Vielfalt verantwortliche V(D)J-Rekombination. Zu den Kernkomponenten des NHEJ gehört das DNA-PK-Holoenzym (DNA-dependent protein kinase), bestehend aus dem DNA-bindenden Heterodimer Ku70/80, der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs (catalytic subunit) und dem XRCC4/Ligase4-Komplex (Jackson, 2002; Jeggo, 1998). Zellen, die einen Defekt in einem dieser Gene tragen, sind zum einen generell sehr strahlenempfindlich und haben zum anderen eine verminderte Aktivität in der V(D)J-Rekombination (Chang *et al.*, 1993; Riballo *et al.*, 1999; Wachsberger *et al.*, 1999). Zudem scheint das NHEJ im Gegensatz zur HR besonders an der schnellen Reparatur von DSBs beteiligt zu sein (Kuhne *et al.*, 2004). Die Mehrzahl der strahleninduzierten Brüche ist durch das NHEJ bereits nach ca. einer Stunde repariert (Kuhne *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2001). Wie bereits erwähnt, ist die DSB-Reparatur über das NHEJ fehleranfälliger als die Reparatur über die HR, die Folgen der NHEJ-vermittelten Reparatur sollten jedoch tolerierbar sein, wenn die Zahl an induzierten DSBs so gering ist, dass die ursprünglich zusammenhängenden Bruchenden wieder zusammengefügt werden. Die Gefahr, dass kleine Sequenzveränderungen an den Bruchenden (diese treten während des NHEJ auf) eine kritische Region eines wichtigen Gens betreffen, ist relativ gering. Dies liegt an der niedrigen Zahl kodierender Sequenzen im Genom der Säugerzellen (Pfeiffer *et al.*, 2004).

Das NHEJ beginnt mit der Bindung des Ku70/80 Heterodimers an die DNA-Bruchenden. Danach rekrutiert Ku70/80 die DNA-PKcs (die katalytische Untereinheit der DNA-PK), ein 470 kDa großes Polypeptid, welches eine Serin-Threonin Kinase-Aktivität besitzt. Möglicherweise schützt dieses die Bruchenden vor unspezifischen Nukleasen und hält ausserdem die Bruchenden zusammen (Cromie *et al.*, 2001; DeFazio *et al.*, 2002). Die DNA-PKcs aktiviert den XRCC4/Lig4-Komplex. Dieser verbindet die Bruchenden miteinander und beendet somit das NHEJ (Drouet *et al.*, 2005; Jeggo, 1998; Pfeiffer *et al.*, 2004; Smith & Jackson, 1999).

Weisen die DNA-Stränge inkompatible Bruchenden auf, und das ist bei den durch ionisierende Strahlung verursachten DSBs meist der Fall (Pastwa *et al.*, 2003), sind vor der Verknüpfung weitere Prozessierungen der Bruchenden nötig. Hierbei spielen zum Beispiel das phosphorylierte Histon H2AX (Sedelnikova *et al.*, 2003), der MRN-Komplex (Bakkenist & Kastan, 2003) und die Nuklease Artemis (Riballo *et al.*, 2004) eine große Rolle.

### 2.2.2.5. Die Rolle des Proteins Artemis bei der DSB-Reparatur

Das Protein Artemis gehört zu den Metallo- $\beta$ -Lactamasen und wurde ursprünglich als Bestandteil der V(D)J-Rekombination gefunden, wo es durch die DNA-PKcs phosphoryliert, eine 5'->3'-Endonukleaseaktivität erlangt. Im Zuge der V(D)J-Rekombination kommt es zur Bildung von DSBs und zur Neuordnung genetischer Information. Dabei entstehen unter anderem DNA-Bruchenden, die durch so genannte Haarnadelstrukturen geschützt sind. Dies betrifft die Enden kodierender Sequenzen für Immunglobulin- oder T-Zell-Rezeptoren. Durch die Endonuklease-Aktivität von Artemis werden diese Haarnadelstrukturen aufgelöst. Defekte im Artemis-Gen führen zu einem schweren Immundefekt (*severe combined immuno deficiency*), welcher mit fehlender Reifung von B- und T-Lymphozyten (Moshous *et al.*, 2001) einhergeht. Liegt eine Nullmutation im Artemis-Gen vor, so kommt es zudem zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit der Zellen. In diesem Fall spricht man vom *radiation sensitive-SCID* (RS-SCID (Ege *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2002; Moshous *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 1998). Untersuchungen zum DSB-Reparaturverhalten von Artemis-defizienten Zellen zeigen, dass diese im Gegensatz zu Ligase-4-defizienten Zellen, zunächst ein ähnliches Reparaturvermögen wie Wildtypzellen (WT-Zellen) aufweisen. Erst nach längeren Reparaturzeiten (ab etwa 4 h) zeigt sich der Reparaturdefekt in Form einer langsamer ablaufenden Reparaturkinetik. Schließlich verbleiben in den Artemis-defizienten Zellen ca. 10% der DSBs unrepariert. Untersuchungen zeigten, dass ATM-defiziente Zellen (Ataxia Teleangiectatica Mutated) denselben Reparaturdefekt aufweisen, was zu der Annahme führte, dass Artemis und ATM wahrscheinlich am gleichen Unterweg des NHEJ beteiligt sind (Foray *et al.*, 1997; Kuhne *et al.*, 2004; Riballo *et al.*, 2004). In diesem „Modell“ fungiert ATM am Anfang der DNA-Schadensantwort und phosphoryliert eine Reihe von Substraten (unter anderem Artemis) die bei der DSB-Reparatur benötigt werden (Kurz & Lees-Miller, 2004; Riballo *et al.*, 2004). Neuere Studien gehen allerdings davon aus, dass die Aktivierung von Artemis durch die DNA-PK-Autophosphorylierung ausgelöst wird (Goodarzi *et al.*, 2006).

Des Weiteren kommt Artemis eine besondere Bedeutung bei der Reparatur einer Art DSB-Untergruppe, den komplexen DSBs zu. Unter komplexen DSBs werden solche verstanden, die an ihren Bruchenden zusätzliche Basenschäden, Proteinvernetzungen oder überhängende Bruchenden aufweisen. Dies zeigen Untersuchungen an Artemis-defizienten Zellen mit Agenzien, die entweder einfache, direkt ligierbare Bruchenden verursachen oder besonders komplexe Bruchenden mit zusätzlichen Basenschäden und Überhängen. Wird zum Beispiel zur DSB-Induktion die Chemikalie Etoposid (ein Topoisomerase II-Inhibitor) verwendet, die

nur einfache gut ligierbare Bruchenden erzeugt, haben Artemis-defiziente Zellen gegenüber WT-Zellen keinen Reparaturdefekt (Riballo *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Hingegen verbleibt nach Bestrahlung mit  $\alpha$ -Teilchen, die vermehrt komplexe DSBs erzeugen, ein größerer Anteil DSBs unrepariert. In dieser Arbeit soll unter anderem mit Hilfe von Artemis-defizienten Zellen untersucht werden, ob Unterschiede in der Komplexität der durch verschieden energetische Photonenstrahlung verursachten DSBs bestehen.

### 2.3. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollen Unterschiede in der Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW) verschieden energetischer Photonenstrahlung untersucht werden. Versuche zeigen, dass die RBW einer ionisierenden em-Strahlung von ihrer Photonenenergie, genauer gesagt vom linearen Energietransfer (LET) abhängt. Die einzelnen Studien zeigen teilweise unterschiedliche Daten für die RBW, je nach gemessenem biologischem Endpunkt. C<sub>K</sub>-Röntgenstrahlung beispielsweise mit einer Photonenenergie von 0,28 keV erzeugt deutlich mehr neoplastische Transformationen (Frankenberg *et al.*, 1995) oder Chromosomenaberrationen (Schmid *et al.*, 2002) als Vergleichsstrahlung höherer Photonenenergie. Die von Frankenberg *et al.* durchgeführten Untersuchungen bescheinigen der in der Mammographie verwendeten Röntgenstrahlung mit einer Maximalenergie von 29 keV sogar eine RBW von 8 im Vergleich zu <sup>60</sup>Co- $\gamma$ -Strahlung für neoplastische Transformationen in der menschlichen Hybrid-Zelllinie CGL1. (Frankenberg *et al.*, 2002). Die Frage, ob die RBW von niederenergetischer Photonenstrahlung, wie beispielsweise der Mammographie-Röntgenstrahlung stark unterschätzt wird, ist auch im Hinblick auf die Nutzen-Risiko-Abwägung der Mammographie-Untersuchungen von Bedeutung. Zum Vergleich der Strahlenwirkung der verschiedenen Strahlenarten wurden in dieser Arbeit Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Gemessen wurden die DSBs mithilfe der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode, die es ermöglicht, DSBs per Immunfluoreszenz lichtmikroskopisch sichtbar zu machen und auszuzählen. Das Spektrum der in dieser Arbeit verwendeten Photonenenergien reicht von der C<sub>K</sub>-Strahlung mit 0,28 keV (LET: 21,5 keV/ $\mu$ m) über die Mammographie-ähnliche Röntgenstrahlung mit 25 keV (LET: 6 keV/ $\mu$ m) und die CT-ähnliche Röntgenstrahlung mit 120 keV (LET: 2 keV/ $\mu$ m) bis zur <sup>137</sup>Cs-Gammastrahlung mit 660 keV (LET: 0,3 keV/ $\mu$ m).

Versuche mit reparaturprofizienten Zellen sollten zeigen, ob grundsätzliche Unterschiede in Induktion und Reparatur der durch die verschiedenen Strahlenarten erzeugten DSBs bestehen. Weitere Versuche mit Zellen, die einen Gendefekt tragen, der sie für komplexe DSBs besonders anfällig macht, sollten zeigen, ob die Komplexität der induzierten Brüche mit abnehmender Photonenergie zunimmt. Außerdem wurde der Einfluss der Sekundärelektronen auf die DSB-Induktion untersucht, die vom Material der Zellunterlage emittiert werden.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1. Chemikalien und Lösungen

Name	Zusammensetzung / Bemerkung	Herkunft
Blöckchenagarose	1,4% <i>Low gelling temperature Sigma7</i> in PBS	Biorad
DAPI ( <i>Mounting Medium</i> mit DAPI 1:6)	(4',6-Diamidino-2-phenylindol), 1,5 µg/ml	Vector Shield
DNA-Längenstandard für PFGE	DNA von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Biorad
EDTA-Puffer	10ml 1 M TRIS- Cl, pH 7,5, 2ml 0,5 M EDTA pH 8 ad 1000ml MilliQ- Wasser	Roth
EDTA-Trypsin	0,1% Trypsin (Biochrom), 0,5mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 8	Biochrom
Ethidiumbromid	1 mg Ethidiumbromid auf 100 ml Tris	Serva
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Nicht hitzeinaktiviert	Biochrom
Formaldehyd	säurefrei ≥ 37 %	Roth
Fricke-Lösung	29 mg NaCl, 139 mg FeSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O 11ml konzentrierte H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ad 500 ml Aqua bidest.	
Lysispuffer	Mit 1% N- Lauroylsarcosin- Na <sup>+</sup> - Salz und 0,1% PronaseE (gelöst in 0,5 M EDTA, pH 8)	Lauroylsarcosin: Merck PronaseE: Merck
<i>Minimum Essential Medium</i> (MEM with <i>EARLE`s SALTS without L- Glutamin</i> )	Zusätzlich je Flasche 55ml FCS 5ml NEAA 5ml Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Best.Nr. 21090- 922)
<i>Mounting Medium</i>	<i>Mounting Medium for Fluorescence</i>	Vector Laboratorys
<i>Non essential amino acids</i> (NEAA )100x		Biochrom
Penicillin/Streptomycin	10.000 IU/ml Penicillin G und 10.000 µg/ml Streptomycinsulfat	Biochrom
<i>Phosphat buffered saline</i> (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,45)	
<i>Pulse Field Certified Agarose</i>	0,8 % <i>Pulse Field Certified Agarose</i>	Biorad
Triton-X	reinst	Roth

**Tabelle 2:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Lösungen

Gerät	Hersteller	Modell
Brutschränke	Firma Binder, Tuttlingen	CB/50
Mikroskope	Zeiss	Axio Plan 2 und AxioLab 2
Millipore-Anlage	TKA-Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert	TKA-DI 2000,
Schüttler	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau	RT45
Sterilbank 1.	Luft- und Reinraumtechnik GmbH	BDK UVF 6.12 S,
Sterilbank 2	Labotect NAPCO	NapFlow 1200 GS
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge	5804 R

**Tabelle 3:** Übersicht über die verwendeten Laborgeräte

### 3.2. Antikörper

Die  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode beruht darauf, dass das Histon H2AX nach Bestrahlung phosphoryliert wird und im nun phosphorylierten Zustand ( $\gamma$ -H2AX genannt) durch Antikörper markiert und damit lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden kann. Nach Fixierung der Zelle und Permeabilisierung des Zellkerns wird zunächst 1 h bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/FCS zum Entfernen nicht gebundenen Antikörpers wird mit dem Sekundärantikörper inkubiert (entweder 1 h bei Raumtemperatur oder ca. 12 h bei ca. 7°C). Tabelle 4 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

<b>Primärantikörper:</b> <i>Anti-phospho- Histone H2AX (Ser139), mouse monoclonal IgG</i>	200 µg Protein G befreites IgG in 200 µl 0,1 M Tris-glycin, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05 % Natriumazid und 30 % Glycerol	Upstate
<b>Sekundärantikörper:</b> <i>Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG</i>	2 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphat, 0,1 M NaCl pH 7,5, 5 mM Natriumazid	Alexa Fluor

**Tabelle 4:** Übersicht über die verwendeten Antikörper

Für die  $\gamma$ -H2AX-Färbung wurden die Antikörper folgendermaßen verdünnt:

**Primärantikörper:** 1:200 in PBS

**Sekundärantikörper:** 1:480 in PBS / FCS

### 3.3. Zelllinien und Zellkultur

Für die Experimente in dieser Arbeit wurden fünf verschiedene primäre menschliche Fibroblasten-Zelllinien kultiviert. Es handelt sich dabei um zwei Wildtypzelllinien und drei Zelllinien mit einem Gendefekt. Zwei Zelllinien tragen einen Defekt im Artemis-Gen (CJ179 und F01-240) und eine Zelllinie trägt einen Defekt im Ligase-4-Gen (180BR). Tabelle 5 gibt einen Überblick über die verwendeten Zelllinien. Die Zellen wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> Anteil bei 37°C in großen Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche) kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mithilfe von PBS gewaschen, um das im Kulturmedium vorhandene FCS zu entfernen. Nach dem Ablösen der am Flaschenboden befindlichen Zellen mithilfe von EDTA-Trypsin, konnten die Zellen in frisches Medium aufgenommen und aufgesplittet werden. Zum Bestrahlungszeitpunkt befanden sich alle Zellen im konfluenten Stadium, wobei sich mehr als 90% der Fibroblasten in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus befinden.

Die einzelnen Zellen und ihre Kultivierung sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

Zelllinie	Karyotyp
MRC5	Wildtyp
HSF1	Wildtyp
CJ179	Artemis-defizient
F01-240	Artemis-defizient
180BR	LIG4-defizient

**Tabelle 5:** Übersicht über die verwendeten Zellen und ihrer Gendefekte

### 3.3.1. MRC5: Primäre menschliche Lungenfibroblasten

MRC5-Zellen sind primäre menschliche Fibroblasten mit normalem Karyotyp aus dem Lungengewebe eines 14 Wochen alten männlichen Fötus (Jacobs *et al.*, 1970). Sie stammen von der „*European Collection of animal Cell Cultures*“ (ECACC-Nummer: 84101801). Die Zellen wurden in MEM mit 10% fötalem Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% NEAA kultiviert. Sie wurden etwa einmal pro Woche im Verhältnis 1:2 bis 1:3 gesplittet bzw. auf Deckgläser ausgesetzt und waren nach ca. einer Woche Wachstum konfluent und somit zum Bestrahlen bereit.

### 3.3.2. HSF-1: Primäre menschliche Hautfibroblasten

HSF1-Zellen entstammen der Leistengegend eines Kleinkindes. Die Kultivierung erfolgte in MEM mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin sowie 1% NEAA. Die Passagierung erfolgte wie bei den MRC5-Zellen.

### 3.3.3. Callum Jones: Primäre menschliche Hautfibroblasten

Es handelt sich hierbei um eine Zelllinie mit einem Defekt im Artemis-Gen (Artemis<sup>-/-</sup>). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in MEM mit 20% fötalem Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% NEAA. Die Zellen wurden etwa einmal pro Woche im Verhältnis 1:2 bis 1:3 gesplittet bzw. auf Deckgläser ausgesetzt und waren etwa nach einer Woche Wachstum konfluent und somit zum Bestrahlen bereit. Die Zellen wurden uns von Dr.

P. Jeggo, Sussex Centre for Genome Damage and Stability, University of Sussex, Brighton, UK, zur Verfügung gestellt.

### **3.3.4. F01-240: Primäre menschliche Hautfibroblasten**

Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Zelllinie mit einem Defekt im Artemis-Gen. Die Zellen wurden in MEM mit 20% fötalem Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% NEAA kultiviert. Die Zellen wurden etwa einmal pro Woche im Verhältnis 1:2 bis 1:3 gesplittet bzw. auf Deckgläser ausgesetzt und waren etwa nach einer Woche Wachstum konfluent und somit zum Bestrahlen bereit.

### **3.3.5. 180BR: Primäre menschliche Hautfibroblasten**

Diese Zelllinie stammt aus der Haut eines 14 jährigen Leukämiepatienten, welcher eine Überreaktion auf die ihm zugeführte Strahlentherapie zeigte. Die Zellen besitzen einen hypomorphen Defekt im LIG4-Gen (LIG4<sup>+/-</sup>), welches am NHEJ beteiligt ist und die Zellen deshalb sehr strahlensensibel macht. Bezogen wurden sie von der „*European Collection of Animal Cell Cultures*“ (ECACC-Nummer: 90011862). Sie wurden in MEM mit 20% fötalem Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% NEAA kultiviert. Auch sie konnten etwa einmal pro Woche im Verhältnis 1:2 bis 1:3 gesplittet werden.

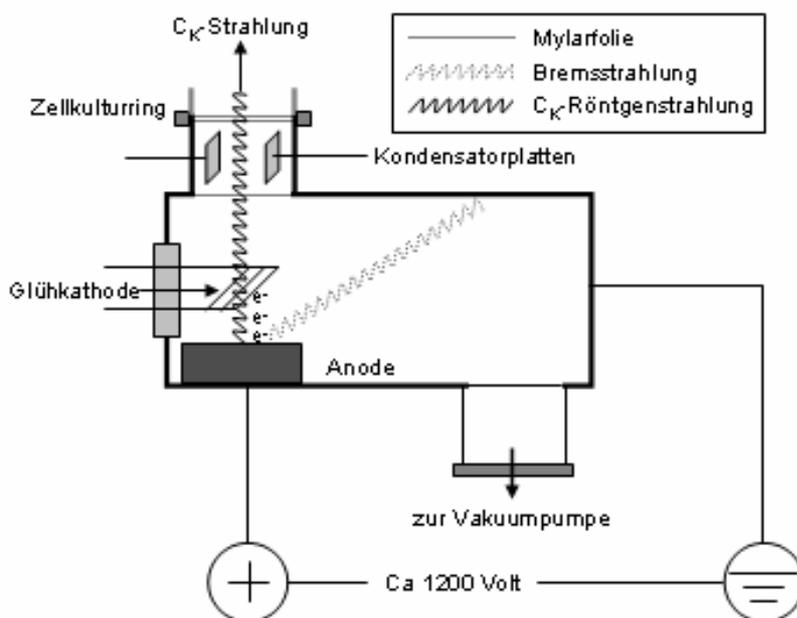
## **3.4. Bestrahlungsgeräte**

### **3.4.1. C<sub>K</sub>-Röntgenröhre mit 0,28 keV**

Hierbei handelt es sich um eine spezielle C<sub>K</sub>-Röntgenröhre, die uns von Prof. D. Frankenberg aus Göttingen zur Verfügung gestellt wurde. Sie besteht aus einem Edelstahlrohr, in dessen Inneren eine Anode aus Kohlenstoff und eine darüberliegende Glühkathode eingebracht sind. Die Glühkathode besteht aus 5 einzelnen Drähten. Darunter ist die Anode aus Kohlenstoff angebracht, die auf ein positives Potential von etwa 1200 Volt gebracht wird. Die beschleunigten Elektronen lösen aus den K-Schalen der Kohlenstoffatome Elektronen heraus,

wobei beim Wiederauffüllen der Schalen Energie in Form von 280 eV-Photonen emittiert wird. Die Anordnung der Anode unter der Kathode gewährleistet, dass die neben der charakteristischen  $C_K$ -Strahlung auftretende Bremsstrahlung weniger als 0,5% der austretenden Nutzstrahlung ausmacht. Da ein Grossteil der Bremsstrahlung in einem Winkel von  $45^\circ$  zur Anode emittiert wird, trifft dieser Anteil auf die Stahlwände der Röhre und wird dort absorbiert. Die  $C_K$ -Strahlung hingegen wird in alle Raumrichtungen emittiert und kann somit teilweise die Röhre über das Austrittsfenster verlassen. Die  $C_K$ -Röntgenstrahlen passieren vor ihrem Austritt eine untere und eine obere Mylarfolie eine mit Wasserstoff geflutete Kammer. Schließlich durchdringen sie die mit den Zellen bewachsene Mylarfolie.

In der mit Wasserstoff gefluteten Kammer befinden sich zwei Kondensatorplatten, die eine Art Ionisationskammer bilden. Mit deren Hilfe ist eine Bestimmung der Dosisleistung im Austrittsfenster möglich. Die Röhre selbst wird ständig von einer Turbomolekularpumpe und einer Drehschieberpumpe auf einem Vakuum von etwa  $5 \times 10^{-6}$  mbar gehalten. Die Wasserstoffkammer und damit auch der Austrittsflansch der Röhre werden durch ein Kühlsystem auf circa  $3^\circ\text{C}$  heruntergekühlt. Zur Bestimmung der Dosisleistung dienen eine externe Ionisationskammer, sowie die beiden internen Kondensatorplatten. Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau der  $C_K$ -Röhre.

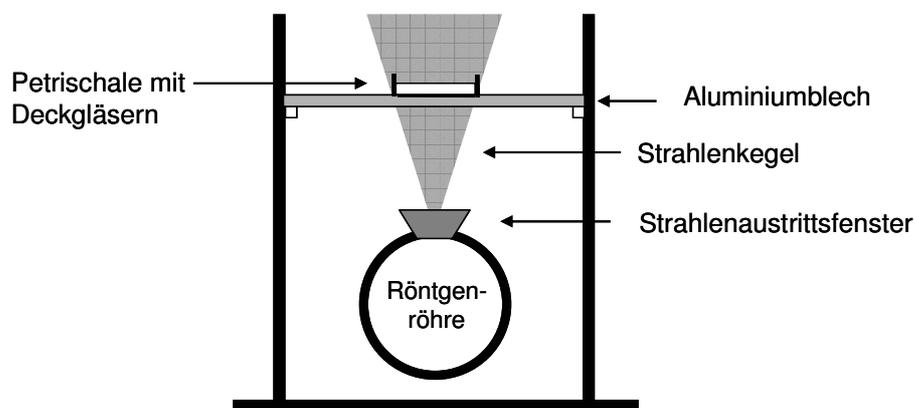


**Abbildung 5:** Schemazeichnung der  $C_K$ -Röntgenröhre.

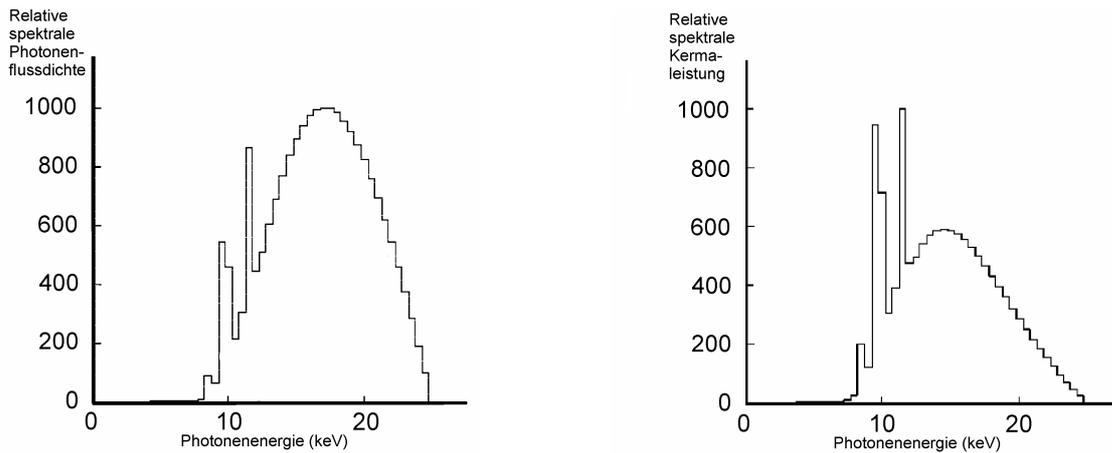
Die  $C_K$ -Röntgenstrahlen werden in der Kohlenstoffanode erzeugt und verlassen senkrecht zu ihr die Röhre. Da die Bremsstrahlung vorwiegend in einem Winkel von  $45^\circ$  zur Kohlenstoffanode emittiert wird, wird sie von den Wänden des Röhrenkörpers absorbiert. Die  $C_K$ -Strahlen passieren auf ihrem Weg zunächst eine Mylarfolie, dann die mit  $\text{H}_2$  geflutete Kammer mit den Kondensatorplatten und schließlich eine weitere Mylarfolie. ( $e^-$  kennzeichnet die von der Glühkathode ausgesandten Elektronen).

### 3.4.2. Röntgenröhre mit 25 kV Röhrenspannung

Die Bestrahlung der Proben mit einer maximalen Photonenergie von 25 keV wurde an der Röntgenröhre der Arbeitsgruppe von Prof. Hütermann, Abteilung für Biophysik der Universität des Saarlandes, durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine Feinstrukturrohre mit Wolframanode und Beryllium-Austrittsfenster, die mit 15 mA Röhrenstrom betrieben wurde. Die Röhre brachte bei einer Filterung von 0,5 mm Aluminium eine Dosisleistung von 0,55 Gy/min. Die Bestrahlungszeiten für 1 Gy betragen 1 min 50 sec, für 2 Gy 3 min 40 sec und für 2,4 Gy 4 min 23 sec. Die Dosisleistung wurde hier mittels des PTW Dosimeters SN4 und der Weichstrahlionisationskammer bestimmt. Der Abstand der Proben vom Röhrenaustrittsfenster betrug 18 cm. Mit dem Programm X-Spect (Algorithmus nach *Birch/Marshall*) konnte mit Hilfe von Dr. H.-D. Nagel (Philips Medizin Systeme) die ungefähre Verteilung der bei dieser Konstellation entstehenden Photonenergien berechnet werden. Das Spektrum der Photonenergien reicht von ca. 8 keV bis 25 keV mit einem Intensitätsmaximum bei 15 keV und ist damit dem Spektrum der üblichen Mammographieröntgengeräte sehr ähnlich (siehe Abbildung 7). Diese werden in der Regel mit 29 kV, einer Molybdänanode und einem Millimeter Berylliumfilterung betrieben.



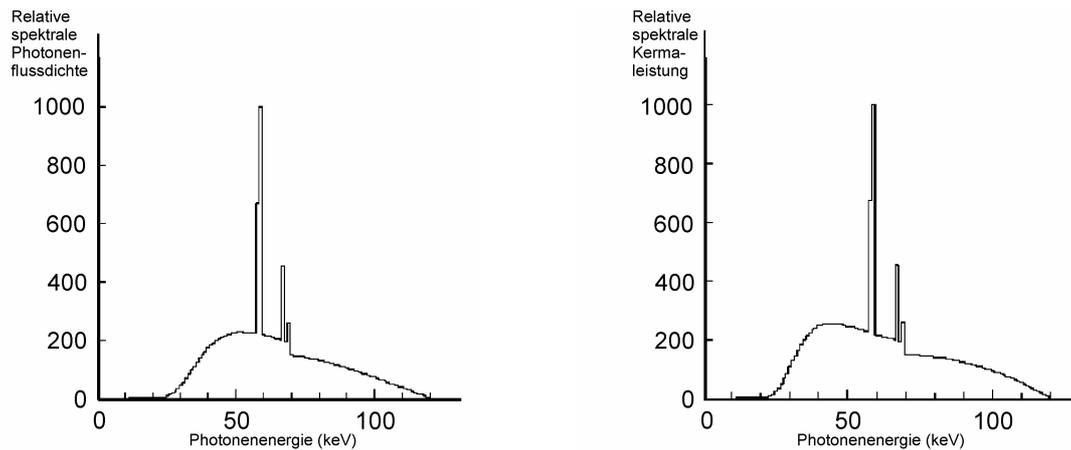
**Abbildung 6:** Schematisierter Bestrahlungsaufbau an den Röntgenröhren



**Abbildung 7:** Verteilung der relativen spektralen Photonflussdichte (links) und der relativen spektralen Kermaleistung (rechts) an der 25 kV-Röntgenröhre. (Berechnet mit Hilfe von Dr. H.-D. Nagel, Philips Medizinsysteme. Programm: X-spect, Algorithmus nach *Birch/Marshall*).

### 3.4.3. Röntgenröhre mit 120 kV Röhrenspannung

Die Bestrahlung der Proben mit einer maximalen Photonenergie von 120 keV wurde an einer Feinstrukturröhre mit Wolframanode und Beryllium-Austrittsfenster durchgeführt. Die Röntgenröhre erbrachte bei 14 mA Röhrenstrom und einer Filterung von 10 mm Aluminium eine Dosisleistung von 0,88 Gy/min. Dies ergab für 1 Gy eine Bestrahlungszeit von 1min 7 sec und für 2 Gy eine Bestrahlungszeit von 2 min und 15 sec. Die Dosisleistung wurde zum einen mittels des PTW Dosimeters SN4 einmal mit Weichstrahlkammer und einmal mit Hartstrahlkammer gemessen. Zum anderen kam Fricke-Dosimetrie zum Einsatz (siehe 3.5. Strahlenmessgeräte). Der Abstand der Proben vom Röhrenaustrittsfenster betrug hier 30 cm. Die Filterung wurde so gewählt, dass das Phtonenspektrum dem der in CT-Geräten verwendeten Röntgenröhren ähnelt. Abbildung 8 zeigt die für diese Röhre berechneten Spektren. Links ist die relative Verteilung der Photonenergien zu sehen, rechts die relative Verteilung der Kermaleistung.



**Abbildung 8:** Verteilung der relativen spektralen Photonenflussdichte (links) und der relativen spektralen Kermaleistung (rechts) an der 120 kV-Röntgenröhre. (Berechnet mit Hilfe von Dr. H.-D. Nagel, Philips Medizinsysteme. Programm: x-spect, Algorithmus nach *Birch/Marshall*).

### 3.4.4. Bestrahlung mit $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung

Die Bestrahlung der Zellen mit  $\gamma$ -Strahlung erfolgte an der Gammaquelle der Blutbank der chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Saarland. Es handelt sich hierbei um einen Vollschutzautomaten (STS Braunschweig, Typ OB 29/4), der mit einem  $^{137}\text{Cs}$ -Strahler ausgerüstet ist. Das Radioisotop befindet sich in einem Stab, der bei Bestrahlungsbeginn automatisch seitlich an die Bestrahlungskammer gefahren wird. Dieser oszilliert während der Bestrahlung. Die Proben befinden sich in einem Behälter aus Stahlblech, welcher während der Bestrahlung rotiert. Somit werden die Proben homogen aus allen Richtungen bestrahlt. Die Filterung besteht bauartbedingt aus einem Millimeter Stahlblech. Die Dosisleistung konnte hier nur mittels chemischer Dosimetrie ermittelt werden, da ein Einbringen einer Messkammer in das Gerät nicht möglich war. Sie betrug zum Zeitpunkt der Versuche 3,2 Gy/min. Somit betrug die Bestrahlungszeit für 1 Gy 19 sec, für 2 Gy 38 sec und für 3,2 Gy 61 sec. Die Photonenenergie von  $^{137}\text{Cs}$  beträgt 662 keV.

### 3.5. Strahlenmessgeräte

Die Bestimmung der Dosisleistung für die Experimente erfolgte in Abhängigkeit von der Bestrahlungseinrichtung und der verwendeten Energie der Strahlung mit physikalischer

Dosimetrie mit Ionisationsmesskammern oder mit chemischer Dosimetrie mit Fricke-Lösung. Bei der 120 kV-Röhre konnten beide Verfahren angewandt werden. Somit wurde der Mittelwert aus beiden als Berechnungsgrundlage für die Bestrahlungszeit herangezogen. Bei der 25 kV-Röhre konnte lediglich die Ionisationsmesskammer und an der Gammaquelle lediglich die Fricke-Dosimetrie zum Einsatz kommen. Für die Dosimetrie an der C<sub>K</sub>-Röntgenröhre kamen spezielle physikalische Dosimeter zum Einsatz.

### 3.5.1. Physikalische Dosimetrie an der 120 kV- und 25 kV-Röntgenröhre

Die Dosisleistung an den Röntgenröhren wurde mit einem Dosimeter der PTW Freiburg (Typ SN4) ermittelt. Das Gerät kann mit zwei Ionisationsmesskammern versehen werden, welche für unterschiedliche Photonenenergien geeicht sind. Einen Überblick gibt Tabelle 6. An der 120 kV-Röntgenröhre wurde mit der Weich- und der Hartstrahlionisationskammer gemessen und der Mittelwert verwendet. Die Messung der Dosisleistung an der 25 kV-Röntgenröhre erfolgte aufgrund der niedrigen Energie mit der Weichstrahlkammer.

	<b>Bemerkung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Energiebereich</b>	<b>Dosis(leistungs)bereich</b>
<b>Dosisleistungsmessgerät</b>	Typ SN4	PTW Freiburg		
Detektor 1	Ionisations- Weichstrahlkammer Nr. M23342-751	PTW Freiburg	7,5-100 keV	ab 200 mGy/min.
Detektor 2	Ionisations- Hartstrahlkammer Nr. M23331-453	PTW Freiburg	ab 70 keV	ab 200 mGy/min.
<b>Fricke- Dosimetrie</b>	Zusammensetzung der Fricke- Lösung siehe Tabelle 2	selbst angesetzt	ab 50 keV	40 - 400 Gy

**Tabelle 6:** Dosimeter und Ionisationsmesskammern

### 3.5.2. Fricke-Dosimetrie

Die Fricke-Dosimetrie ist ein chemisches Strahlenmessverfahren, bei dem die Extinktionsänderung in einer Eisen-2-sulfat-Lösung zur Bestimmung der absorbierten Dosis

herangezogen wird. Die hier verwendete Lösung eignet sich für Photonenenergien von 50 keV bis 30 MeV und konnte damit an der 120 kV-Röntgenröhre und der Gammaquelle zum Einsatz kommen. Der anwendbare Dosisbereich liegt zwischen 40 und 400 Gy.

Zur Zusammensetzung der Fricklösung siehe Tabelle 2. Das Verfahren beruht auf der Radiolyse von Wasser und den oxydierenden Eigenschaften der Radiolyseprodukte. Unter dem Einfluss der ionisierenden Strahlen werden die Wassermoleküle in der Fricke-Lösung in Radikale zerlegt, welche wiederum die in der Lösung vorhandenen  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen oxidieren. In der Lösung laufen im Wesentlichen folgende Reaktionen ab:

1.  $\text{Fe}^{2+} + \text{OH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$
2.  $\text{H} + \text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2$
3.  $\text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}_2^-$
4.  $\text{HO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{OH} + \text{OH}^-$
5.  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \text{OH}^-$

Die Konzentration an  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen wird nach der Bestrahlung photometrisch bestimmt (Messwellenlänge des Photometers: 304 nm). Aus der gemessenen Extinktionsänderung und der Bestrahlungszeit lässt sich dann aus einer Gleichung die absorbierte Dosis errechnen.

Für die Durchführung einer Messung muss die Frickelösung zunächst auf RT erwärmt werden. Dann werden die Petrischalen mit derselben Menge Frickelösung gefüllt wie für die Versuche Medium benötigt wird. Nach der Bestrahlung wurde die Extinktionsänderung umgehend photometrisch bestimmt. Versuche haben gezeigt, dass die Frickelösung nach der Bestrahlung auch über Nacht stehen kann, ohne das Messergebnis zu verfälschen.

Berechnung der Dosis anhand der gemessenen Extinktion:

$$D = \frac{dE}{dm} = \frac{N_{\text{Fe}}}{V G} = \frac{L E U}{\epsilon l \rho G}$$

D= Dosis (Gy), L= Loschmidtsche Zahl ( $=6,023 \cdot 10^{23}$  l/mol), E= Extinktion, U= Umrechnung ( $= 1,602 \cdot 10^{-19}$  J/eV),  $\epsilon$ = molarer Extinktionskoeffizient ( $= 2,16 \cdot 10^3$  l/mol\*cm), l= Dicke der durchstrahlten Lösung (=1 cm),  $\rho$ = Dichte der bestrahlten Lösung ( $=1,024$  g/cm<sup>3</sup>), G= Ausbeute (= Anzahl der gebundenen Bestrahlungsprodukte pro 100 eV absorbierter Energie, = 0,1561/eV). Da die Dicke der durchstrahlten Lösung in die Gleichung eingeht, wurde eine kurze Versuchsreihe gemacht, um den Einfluss unterschiedlicher Füllhöhen der Probenbehälter abzuschätzen. Da die Füllhöhenunterschiede bei den einzelnen Probebehältern nur wenige Millimeter betragen, zeigten sich, wie erwartet, keine Unterschiede.

## 3.6. Bestrahlungsbedingungen

### 3.6.1. Bestrahlung auf Deckgläsern

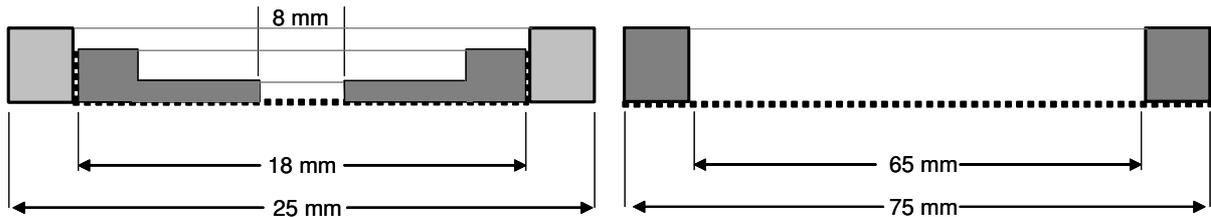
Zur Messung der DSBs nach Röntgen- und  $^{137}\text{Cs}$ -Gammastrahlung wurden die Zellen zunächst auf Deckgläsern aus Quarzglas bestrahlt. Die Deckgläser befanden sich in einer Petrischale aus Polystyrol, welche mit 2 ml Medium aufgefüllt wurde. Die Petrischalen wurde für die Bestrahlung in den Röntgenröhren direkt auf den Aluminiumfilter gestellt, der bei der 120 kV-Röhre 30 cm und bei der 25 kV-Röhre 18 cm vom Röhrenaustrittsfenster platziert war. Eine signifikante Schwächung der Strahlung durch das Acrylglas und das Deckglas fand nur bei der 25 kV-Strahlung statt und wurde bei der Dosimetrie berücksichtigt. Die genannten Materialien führten hier zu einer Schwächung der Dosisleistung um den Faktor 1,55.

In der Gammaquelle diente Pappkarton, welcher sich im Edelstahl-Bestrahlungsgefäß befand, als Unterlage für die Petrischalen.

### 3.6.2. Bestrahlung auf Mylarfolie

Die besonders weiche und damit wenig durchdringende  $C_K$ -Strahlung mit 0,28 keV erforderte eine entsprechend dünne Zellunterlage. Zu diesem Zweck wurden die Zellen auf eine etwa 2  $\mu\text{m}$  dicke Mylarfolie ausgesetzt, die den Boden eines Kunststoffringes mit 75 mm Durchmesser bildete. Diese Ringe (siehe Abbildung 9 rechts) konnten auf das ebenfalls aus Mylarfolie bestehende Strahlenaustrittsfenster der  $C_K$ -Röhre gesetzt werden. Während der Bestrahlung nahmen die Proben die Temperatur des Röhrenkopfes an (ungefähr 3°C).

In späteren Versuchen wurden die Ringe ebenso an den Röntgenröhren und der Gammaquelle eingesetzt. Für die  $\gamma$ -H2AX-Antikörperfärbung musste die mit den bestrahlten Zellen bewachsene Mylarfolie vom großen Ring auf einen kleineren Ring umgespannt werden, um Antikörper einzusparen. Dazu wurde aus der Mitte des großen Ringes ein kreisförmiges Stück Mylarfolie ausgestanzt und zwischen einen inneren Ring aus Stahl, und einen äußeren aus Kunststoff gespannt (siehe Abbildung 9 links).



**Abbildung 9:** Querschnitt der Bestrahlungsringe. Links: kleiner Ring für die Antikörperfärbung, Rechts: großer Ring für die Bestrahlung.

### 3.7. Methoden zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen

#### 3.7.1. $\gamma$ -H2AX-Methode

Die  $\gamma$ -H2AX-Methode dient dem immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von DSBs. In dieser Arbeit galt es, die durch die unterschiedlichen Strahlenarten induzierten Brüchen quantitativ auszuwerten und mögliche Unterschiede in der DSB-Reparatur zu untersuchen. Zur Bestimmung des DSB-Induktionswertes, das heißt der unmittelbar nach Bestrahlung auftretenden Zahl an DSBs, wurden die Zellen nach Bestrahlung für 15 min im Brutschrank inkubiert, bevor mit der Fixierung und Färbung begonnen wurde. Versuche zeigten, dass das H2AX-Signal nach dieser Zeit gut ausgeprägt war. Ebenso wurde die Zahl an DSBs nach längeren Reparaturzeiten bestimmt. Hierzu wurden die Zellen nach der Bestrahlung wieder im Brutschrank inkubiert, wo die Zellen unter optimalen Bedingungen ihre DNA-Schäden reparieren konnten. Die Reparaturzeiten betragen je nach Experiment und Zelllinie auf 2, 4, 6, 8, 24 h, 3 Tage und 7 Tage.

Die Proben wurden in einer Isolierbox mit Wärmeakkus bei etwa 37°C zur Bestrahlungseinrichtung gebracht. Nach Bestrahlung der Proben wurden sie entweder sofort wieder in den Brutschrank gestellt, oder im Falle der Gammabestrahlung, in einer Isolierbox mit Wärmeakkus bei etwa 37°C zum Brutschrank transportiert. Die Reparaturzeit wurde ab dem Zeitpunkt gestoppt, zu dem die Zellen wieder auf 37°C gebracht wurden. Nach Ablauf der Reparaturzeit erfolgte eine 15-minütige Fixierung der Zellen in Formaldehyd. Daraufhin wurden die Zellen 3 mal 10 Minuten in PBS gewaschen und anschließend 5 Minuten lang in eiskaltem Triton-X permeabilisiert. Danach wurde drei mal 10 Minuten in PBS/FCS (1% FCS) gewaschen, und anschließend mit Primärantikörper inkubiert. Dazu wurden die Deckgläser

auf Parafilm positioniert und 40 µl Primärantikörper (Verdünnung: 1:200 in PBS bei 1h Inkubationszeit bzw. 1:800 bei Inkubation über Nacht) aufpipettiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurden die Proben drei mal 10 Minuten in PBS/FCS gewaschen und anschließend mit Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:480 in PBS/FCS) eine Stunde lang inkubiert. Dann folgte viermaliges Waschen in PBS von je 10 Minuten. Die Deckgläser wurden daraufhin mit 3 µl Mounting-Medium mit DAPI auf Objektträgern mit der Zellseite nach unten positioniert. Die Mylarfolien, die bei den Experimenten auf Ringen zum Einsatz kamen, wurden zwei Minuten mit DAPI/PBS (1:5000) inkubiert und anschließend kurz in PBS gewaschen. Die Folien konnten dann mit der Zellseite nach oben mit Mounting-Medium und einem Deckglas auf dem Objektträger platziert werden. Als Kontrollen dienten unbestrahlte Zellen, die nach den gleichen Verfahren gefärbt wurden.

### 3.7.2. Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wurde als weiteres Verfahren gewählt, Unterschiede in der Induktion von DSBs zwischen 120 kV Röntgenstrahlung und Gammastrahlung zu messen. Mit der PFGE kann die Induktion nach Bestrahlung mit hohen Dosen gemessen werden. Für diese Untersuchung wurden konfluente HSF1 Zellen in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> Bodenfläche) mit 20, 40, 60 und 80 Gy bestrahlt und während der Bestrahlung sowie während der Verarbeitung bis zur Lyse auf einer Temperatur von etwa +4°C gehalten, so dass keine DSB-Reparatur stattfinden konnte. In der Röntgenanlage erfolgte die Kühlung durch herunterkühlen der Bestrahlungsbleche mittels Kühllakkus und Auffüllen der Zellkulturflaschen mit eiskaltem PBS. In der Gammaquelle erfolgte die Kühlung durch ein besonderes Bestrahlungsgefäß, welches mit Eiswasser gefüllt werden konnte und die Zellkulturflaschen aufnahm. Nach Bestrahlung wurden die Zellen vom Flaschenboden abtrypsiniert, gezählt und bei +4°C und 300 g zentrifugiert. Anschließend wurden mittels eines Plaqueformers (Biorad) 100µl große Agaroseblöckchen mit einer Zellkonzentration von 5\*10<sup>6</sup>Zellen/ml gegossen. Danach folgte die Lyse mit Lysispuffer über Nacht bei 50°C. Vor dem Gießen des Gels wurden die Blöckchen noch etwa 30 min in TE-Puffer gewaschen. Die Blöckchen wurden anschließend in ein Gel aus Pulsfeld-Agarose eingebettet und die PFGE mit den in Tabelle 7 angegebenen Laufbedingungen gestartet. In einem wechselnden elektrischen Feld wandern nun die DNA-Fragmente je nach DSB-Induktion (Grad der Fragmentierung) unterschiedlich weit ins Gel. Nach Beendigung der

Laufzeit wurde die DNA im Gel dann mit 1 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5x TBE markiert. Mit einer digitalen Kamera wurden ein Bild des Gels unter UV-Transillumination (Wellenlänge: 302 nm) aufgenommen. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit dem Programm „AIDA“. Als Längenstandard zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen diente die DNA von *Saccharomyces cerevisiae* (Biorad). Die Menge der aus der Tasche gelaufenen DNA im Verhältnis zur Gesamt-DNA-Menge (=FAR-Wert) ist ein Maß für die Fragmentierung der DNA und damit die DSB-Induktion. Die Laufbedingungen wurden so gewählt, dass DNA-Fragmente in einem Bereich von 2-3 Mbp besonders gut aufgetrennt werden konnten:

Laufzeit	Elektrische Feldstärke	Pulszeiten (lineare Rampe)	Laufpuffer-Temperatur	Feldwinkel
66 h	1,5 V / cm	50 – 5000 s	14°C	120°

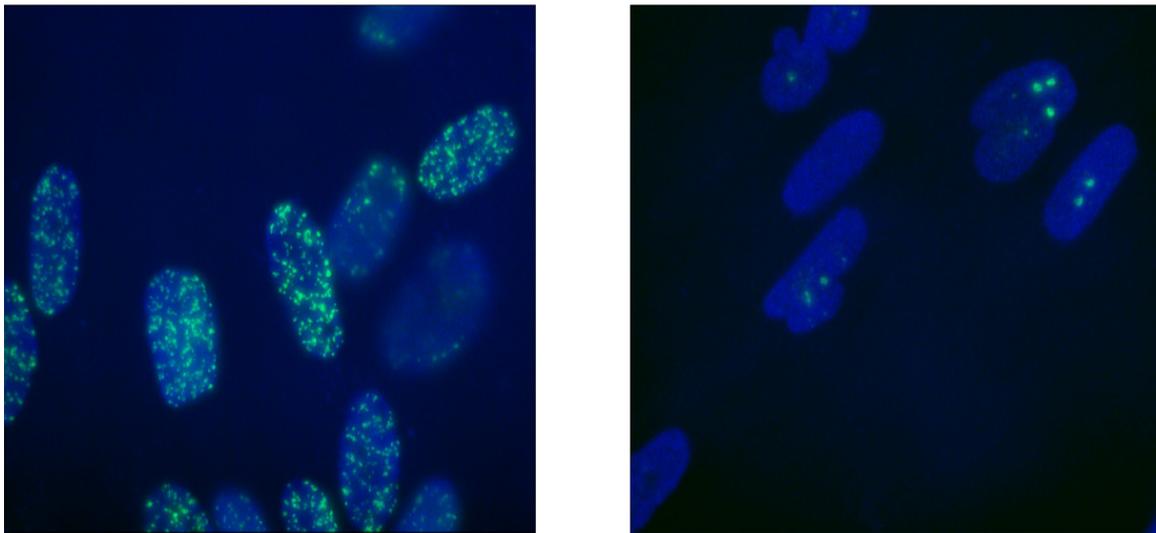
**Tabelle 7:** Laufbedingungen bei der PFGE



## 4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede in Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) nach Bestrahlung mit verschieden energetischer Photonenstrahlung untersucht. Hierzu wurden konfluente reparaturprofiziente Wildtypzellen und Artemis-defiziente Zellen mit unterschiedlichen Dosen Röntgen- und Gammastrahlung bestrahlt und die Anzahl der Brüche nach verschiedenen Reparaturzeitpunkten gemessen. Dies erfolgte zunächst mit Hilfe der  $\gamma$ -H2AX-Methode. Mit diesem Verfahren können DSBs fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Ionisierende Strahlung kann an der DNA zur Entstehung von Einzelstrangbrüchen, Basenschäden und DSBs führen. Im Zuge der DNA-Schadensantwort erfolgt nach wenigen Minuten die Phosphorylierung des Histon H2A am Serin 139 im Bereich von einigen Megabasenpaaren um die Bruchstelle. (Rogakou *et al.*, 1998). Durch Verwendung eines ersten Antikörpers gegen das nun als  $\gamma$ -H2AX bezeichnete Histon und einem zweiten, Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper können die DSBs sichtbar gemacht und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese so genannten „Foci“ tatsächlich DSBs repräsentieren. Ihr Auftreten korreliert mit dem Auftreten von DSBs in der PFGE und ihr Verschwinden entspricht der Reparatur der DSBs (Rothkamm & Lobrich, 2003; Sedelnikova *et al.*, 2002), so dass diese Methode inzwischen als etabliert angesehen werden kann. Die Bestimmung der  $\gamma$ -H2AX-Reparaturkinetik ist bis zu Reparaturzeitpunkten bis maximal 14 Tage nach Bestrahlung zuverlässig. Bei längeren Reparaturzeiten treten Probleme mit der Zellkultivierung auf. Abbildung 10 zeigt die durch die DAPI-Färbung blau erscheinenden Zellkerne von MRC5-Wildtypzellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy 120 kV-Röntgenstrahlung nach einer Reparaturzeit von 15 min. (links) und 24 h (rechts). Da mit der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode große Unterschiede in der Induktion zwischen den verschiedenen Photonenenergien gemessen wurden, wurde mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese ein weiteres etabliertes Verfahren zur Bestimmung der DSB-Induktion verwendet. Mit der PFGE kann die DSB-Induktion nach Bestrahlung mit hohen Dosen (hier: 20, 40, 60 und 80 Gy) gemessen werden. Hierzu wird die DNA der bestrahlten und anschließend vom Boden der Zellkulturflasche abgelösten Zellen durch Lyse freigesetzt. Die DNA wird in Gel-Blöckchen gegossen, die anschließend in die Taschen eines Agarose-Gels eingebettet werden. In einem wechselnden elektrischen Feld wandern nun die DNA-Fragmente je nach Anzahl der DSBs

(Grad der Fragmentierung) unterschiedlich weit ins Gel. Die DNA kann nun mit Ethidiumbromid markiert und damit unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Eine Kamera-Aufnahme des gefärbten Gels ermöglicht die Auswertung mit einem Computer-Programm. Die Menge der aus der Tasche gelaufenen DNA im Verhältnis zur Gesamt-DNA-Menge (=FAR-Wert) ist ein Maß für die Fragmentierung der DNA und damit die DSB-Induktion. Im Folgenden soll zunächst auf die DSB-Induktion eingegangen werden.

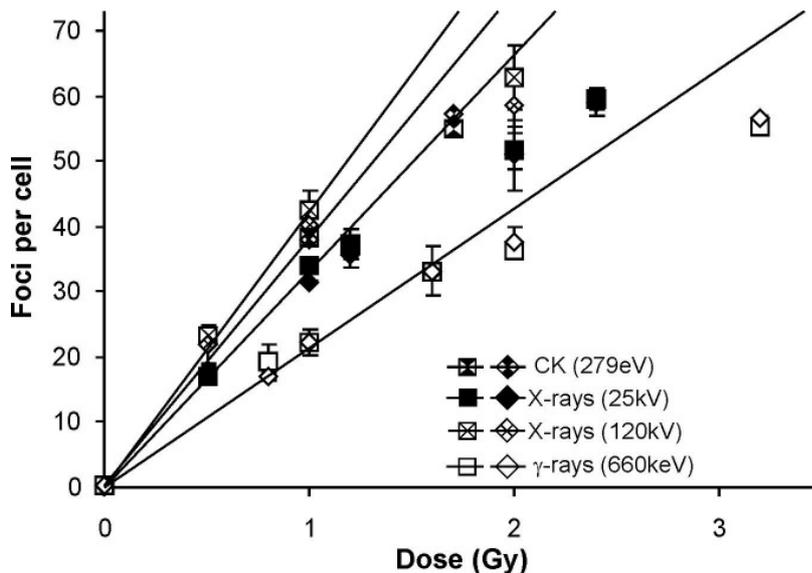


**Abbildung 10:** links:  $\gamma$ -H2AX-Foci in MRC5-Zellkernen nach 2 Gy und 15min. Reparaturzeit  
rechts:  $\gamma$ -H2AX-Foci in MRC5-Zellkernen nach 2 Gy und 24 h Reparaturzeit  
Die Zellkerne erscheinen durch die Färbung mit DAPI blau. (Vergrößerung: 630-fach)

#### 4.1. Bestimmung der DSB-Induktion mit der $\gamma$ -H2AX-Methode

Zur Bestimmung der Induktion wurden HSF1 (Wildtypzellen) und CJ179 (Artemis-defiziente Zellen) mit unterschiedlichen Dosen  $C_K$ -Röntgenstrahlung, 25 kV-Röntgenstrahlung, 120 kV-Röntgenstrahlung und  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung bestrahlt und die H2AX-Foci nach einer Reparaturzeit von 15 min. gemessen. HSF1- und CJ179-Zellen wurden verwendet, da sie sich am besten färben ließen. Die Bestrahlung erfolgte außer bei den Experimenten mit  $C_K$ -Röntgenstrahlung standardmäßig auf Glas-Deckgläsern. Die sehr niederenergetische und damit wenig durchdringende  $C_K$ -Röntgenstrahlung machte die Bestrahlung auf einer ca. 2  $\mu\text{m}$  dünnen Kunststofffolie (Mylarfolie) erforderlich. Die Wahl der Dosis erfolgte anhand einiger Vorexperimente und zur besseren Vergleichbarkeit mit bestehenden Daten. Bei der  $C_K$ -Röntgenstrahlung wurde mit 1 Gy und 1,7 Gy bestrahlt. Die 25 kV-Bestrahlung erfolgte mit Dosen von 0,5-1-1,2-2 und 2,4 Gy. Die 120 kV-Bestrahlung erfolgte mit 0,5-1 und 2 Gy, die Bestrahlung mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung erfolgte mit 0,8-1-1,6-2 und 3,2 Gy.

Die Ergebnisse der Induktionsversuche zeigt Abbildung 11. Es zeigt sich, dass zwischen den beiden Zelllinien HSF1 und CJ179 keine wesentlichen Unterschiede in der Induktion bestehen. Durch einen Defekt im Artemis-Gen haben CJ179-Zellen gegenüber Wildtyp-Zellen einen Reparaturdefekt, der aber erst nach längeren Reparaturzeiten (ab ca. 4 h) zum Tragen kommt und besonders die Reparatur der komplexen DSBs betrifft. Des Weiteren sieht man, dass zwischen den vier verwendeten Photonenenergien große Unterschiede in der Induktion bestehen und die Anzahl der induzierten DSBs nicht linear mit der Dosis ansteigt. Ab ca. 40 Foci pro Zelle kommt es durch zunehmende Überlagerung der Foci beim Auszählen unter Lichtmikroskop zu einer Unterschätzung des „wirklichen“ Induktionswerts. Bis zu diesem Wert steigt die Foci-Zahl annähernd linear mit der Dosis an. Dies deutet darauf hin, dass ab etwa 40 Foci pro Zelle das Auflösungsvermögen beim Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop schlechter wird, da es dann zunehmend zu Überlagerungen der Foci kommt. Zur Bestimmung des „wirklichen“ Induktionswertes bei höheren Dosen wurde nun eine Regressionsgerade durch die Induktionswerte gebildet, die unter dem Wert von 40 Foci pro Zelle und damit in einem gut zählbaren Bereich liegen.



**Abbildung 11:** Mittels  $\gamma$ -H2AX-Methode bestimmte DSB-Induktion (Reparaturzeit: 0,25 h) von HSF1 (■)- und CJ179-Zellen (◆) nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen  $C_K$ -Strahlung, 25 kV- und 120 kV-Röntgenstrahlung sowie  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 3 Versuchen an. Die Bestrahlung mit 25 kV- und 120 kV-Röntgenstrahlung sowie  $\gamma$ -Strahlung erfolgte auf Deckgläsern. Die Bestrahlung mit  $C_K$ -Strahlung erfolgte auf Mylarfolie.

Das Auszählen unter dem Lichtmikroskop ergab für die DSB-Induktion folgende Werte: 1 Gy  $C_K$ -Strahlung hat mit 38,39 DSBs die höchste Induktion. Die 120 kV-Strahlung induziert 31,29 DSBs pro Gy, die 25 kV-Strahlung induziert im Mittel 26,71 DSBs pro Gy und die Gammastrahlung lediglich 18,37 DSBs pro Gy. Der unter dem Mikroskop nach Bestrahlung mit 2Gy 120 kV-Strahlung gezählte Wert liegt damit ca. 25% niedriger als der mit der Regressionsgeraden bestimmte Wert von 41,49. Tabelle 8 zeigt die RBW für die „wahre“ (mit der Regressionsgeraden errechnete) Induktion bezogen auf 120 kV-Röntgenstrahlung. Die Induktionsrate der 120 kV-Strahlung liegt ca. 7% höher als die der  $C_K$ -Strahlung, ca. 20% höher als die der 25 kV-Röntgenstrahlung und fast doppelt so hoch wie die der  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung.

Strahlenart	DSB-Induktion (DSBs/Gy)	RBW (120 kV =1)
$C_K$	38,39	0,93 ( $\pm 0,12$ )
25 kV	32,71	0,79 ( $\pm 0,11$ )
120 kV	41,49	1
$^{137}\text{Cs}$	22,25	0,54 ( $\pm 0,12$ )

**Tabelle 8:** RBW für die Induktion (Reparaturzeit: 0,25 h) von HSF1- und CJ179-Zellen (Mittelwert aus 3 Experimenten pro Zelllinie) von Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung. Die Bestrahlung mit 25 kV- und 120 kV-Röntgenstrahlung sowie  $\gamma$ -Strahlung erfolgte auf Deckgläsern. Die Bestrahlung mit  $C_K$ -Strahlung erfolgte auf Mylarfolie. Referenzstrahlung zur Berechnung der RBW ist die 120 kV-Röntgenstrahlung.

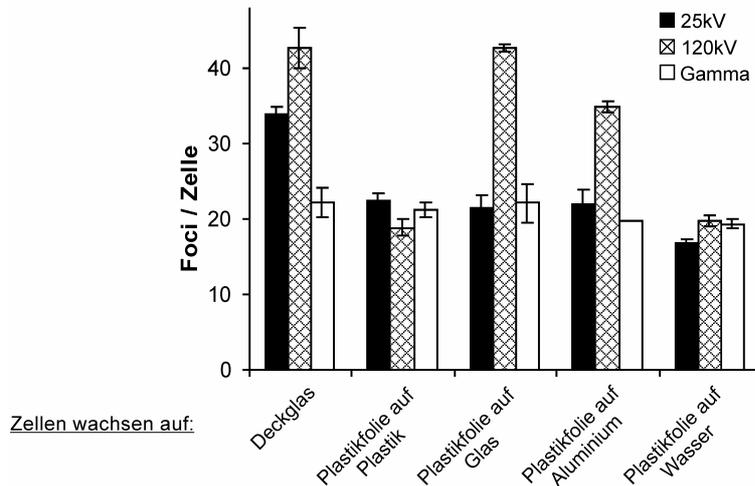
Diese Werte entsprachen nicht denen, die aufgrund physikalischer Überlegungen zum LET der Strahlungen zu erwarten gewesen wären. Der LET der 25 kV-Strahlung (ca.  $6\text{ kV}/\mu\text{m}$ ) und insbesondere der der  $C_K$ -Strahlung (ca.  $21\text{ kV}/\mu\text{m}$ ) ist höher als der LET der 120 kV-Strahlung (ca.  $2\text{ kV}/\mu\text{m}$ ). Demnach sollte zumindest die  $C_K$ -Strahlung eine, wenn auch nur geringfügig höhere biologische Wirksamkeit in Bezug auf DSB-Induktion aufweisen. Studien belegen, dass jedes durch die  $C_K$ -Strahlung emittierte Sekundärelektron mit hoher Wahrscheinlichkeit einen DSB verursacht (Bryant *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2002). Da die Bestrahlung an der  $C_K$ -Röntgenröhre aufgrund des geringen Durchdringungsvermögens dieser Strahlung auf einer dünnen Kunststoffolie erfolgen musste, wurde in einer eigenen Versuchsreihe untersucht, ob dieser Unterschied in den Bestrahlungsbedingungen einen Einfluss auf die DSB-Induktion haben könnte. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel dargestellt.

#### **4.2. Untersuchung zum Einfluss des Materials der Zellunterlage auf die DSB-Induktion**

Die energiereiche und damit gut durchdringende Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung erlaubte eine Bestrahlung der Zellen auf den dafür üblicherweise verwendeten Deckgläsern aus Glas (Dicke ca. 0,2 mm). Für die relativ energiearme und damit weniger gut durchdringende  $C_K$ -Strahlung musste eine Zellunterlage verwendet werden, die für diese Strahlung durchlässig ist. Dafür kam eine Plastikfolie mit einer Dicke von ca.  $2\ \mu\text{m}$  zum Einsatz. Außerdem musste wegen der an der  $C_K$ -Röntgenröhre niedrigeren Dosisleistung eine ca. 5-mal längere Bestrahlungszeit als an den anderen Bestrahlungseinrichtungen in Kauf genommen werden. Um bereits während der Bestrahlungszeit auftretende Reparaturvorgänge zu unterdrücken, wurden die Zellen während der Bestrahlung an der  $C_K$ -Röhre auf eine Temperatur von ca.  $+4^\circ\text{C}$  gekühlt. Um zu untersuchen, ob die verwendeten Zellunterlagen einen Einfluss auf die Induktion von DSBs haben, wurden in einer weiteren Versuchsreihe HSF1-Zellen auf diesen Plastikfolien mit einer Dosis von 1 Gy Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung bestrahlt und die Zahl an induzierten DSBs nach einer Reparaturzeit von 15 min bestimmt. Die Dosis von 1 Gy wurde gewählt, da hier noch eine gut zählbare Zahl an Foci zu erwarten war. Da wir vermuteten, dass das Material der Zellunterlage einen Einfluss auf die Induktion hat, wurden als Auflage für die mit der Plastikfolie bespannten Ringe (siehe Kapitel 3.6.2.) verschiedene Materialien getestet:

Kunststoff (Petrischale), Glas (Objekträger), Aluminium (Bestrahlungsblech der Röntgenröhren), sowie Wasser als Gewebeäquivalent.

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe.



**Abbildung 12:**

Einfluss des Materials der Zellunterlage auf die DSB-Induktion. Das Diagramm zeigt die Induktionswerte von HSF1-Zellen nach einer Dosis von 1 Gy und einer Reparaturzeit von 15 min. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 2 Versuchen an.

Es zeigte sich, dass die Anzahl induzierter DSBs stark vom Material der Zellunterlage abhängt. Die höchsten Induktionswerte (ca. 40 Foci pro Zelle) wurden nach Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung auf Deckgläsern bzw. auf Folie mit einem Deckglas als Unterlage gefunden. Wurden die Zellen derselben Strahlung auf der Plastikfolie mit Kunststoffunterlage bzw. Wasser ausgesetzt, so wurde mit 19 Foci pro Zelle nur etwa die Hälfte an DSBs induziert. Die Induktion nach Bestrahlung auf der Folie mit Aluminiumunterlage liegt ca. 20% unter der auf den Deckgläsern gemessenen Induktion. Der Induktionswert nach Bestrahlung mit 1 Gy 25 kV-Röntgenstrahlung auf Deckgläsern ist analog zu den Experimenten aus Kapitel 4.1 ca. 15% niedriger als nach Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung. Im Gegensatz zur Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung findet sich keine erhöhte Induktion, wenn unter der Mylarfolie ein Deckglas platziert wird. Bei einer Bestrahlung mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung spielt das Material der Zellunterlage offensichtlich keine Rolle. Die Induktion beträgt in allen Fällen ca. 20 Foci pro Zelle. Tabelle 9 zeigt die DSB-Induktion für die verwendeten Strahlenarten nach Bestrahlung auf Mylarfolie. Die RBW bezieht sich auf die 120 kV-Röntgenstrahlung als Referenzstrahlung.

Strahlenart	DSB-Induktion (DSBs/Gy)	RBW (120 kV =1)
C <sub>K</sub>	38,39	2,04 (± 0,32)
25 kV	22,41	1,19 (± 0,28)
120 kV	18,83	1
<sup>137</sup> Cs	21,12	1,12 (± 0,27)

**Tabelle 9:** : RBW für die Induktion (Reparaturzeit: 0,25 h) von HSF1- und CJ179-Zellen (Mittelwert aus 3 Experimenten pro Zelllinie) von Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung. Die Bestrahlung erfolgte bei allen Photonenenergien auf Mylarfolie. Als Referenz zur Berechnung der RBW diente der Induktionswert der 120 kV-Röntgenstrahlung.

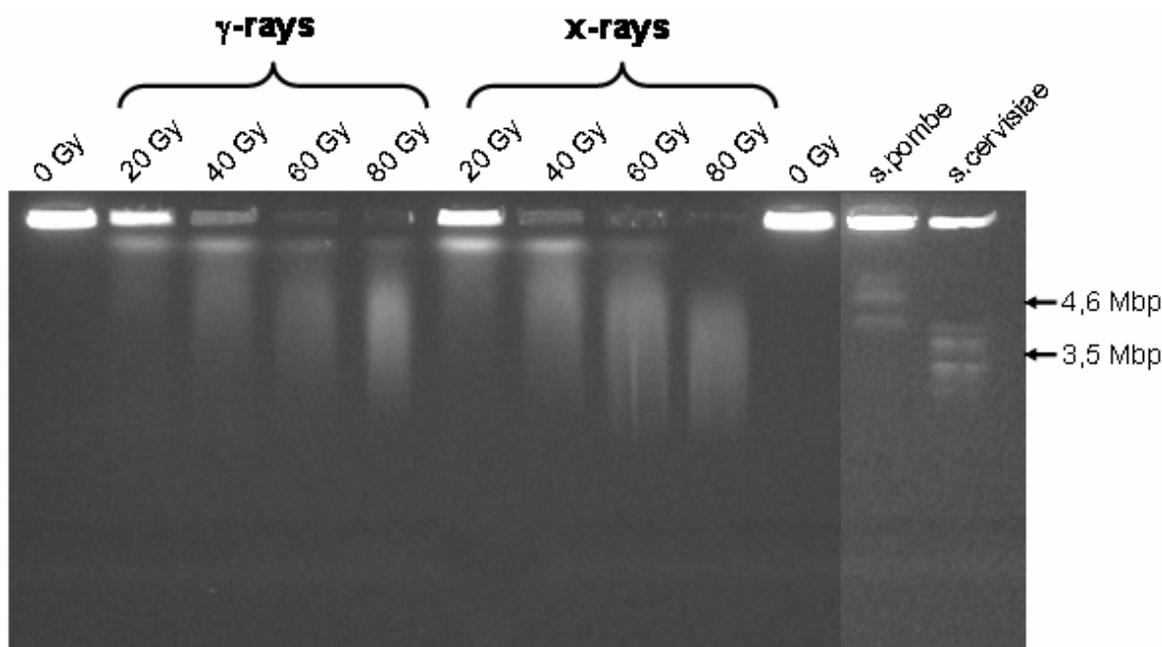
### 4.3. Ergebnisse der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die  $\gamma$ -H2AX Foci Analyse von Wildtypzellen, Artemis-defizienten Zellen und Ligase4-defizienten Zellen zeigt eine starke Abhängigkeit der DSB-Induktion von der verwendeten Photonenenergie. Eine Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung auf Glas-Deckgläsern ergab eine um ca. 60% höhere Induktion als die gleiche Dosis  $\gamma$ -Strahlung. Da diese Ergebnisse zunächst nicht vorhersehbar waren, wurde zur Überprüfung dieser Werte mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese eine weitere Methode zur Bestimmung der DSB-Induktion verwendet. Mit diesem Verfahren kann die DSB-Induktion nach Bestrahlung mit deutlich höheren Dosen als bei der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode gemessen werden. Für diese Arbeit wurden HSF1-Wildtypzellen in Zellkulturflaschen mit 20, 40, 60 und 80 Gy 120 kV-Röntgenstrahlung und <sup>137</sup>Cs- $\gamma$ -Strahlung bestrahlt. Während der Bestrahlung sowie allen folgenden Bearbeitungsschritten wurden die Zellen auf eine Temperatur von ca. +4°C gekühlt (siehe auch Kapitel 3.7.2.), um Reparaturvorgänge während der Bestrahlungszeit und den Bearbeitungsschritten zu verhindern. Außerdem wurde eine unbestrahlte Kontrolle (K) und als Längenstandard die DNA von *S. cerevisiae* und *S. pombe* (Biorad) in den Versuch aufgenommen. Die Auswertung der mit Ethidiumbromid gefärbten Gele [die Bestimmung des FAR-Wertes ( Fraction of Activity Released)] erfolgte mit dem Programm „AIDA“. Der FAR-Wert gibt den Anteil des aus der Tasche gelaufenen Gels in Verhältnis zur Gesamt-DNA an. Der FAR-Wert steigt also mit zunehmender Dosis und damit Fragmentierung der DNA an. Die Laufbedingungen wurden so gewählt, dass DNA-Fragmente in einem Bereich von 2-3 Mbp besonders gut aufgetrennt werden konnten (siehe Kapitel 3.7.2.). Abbildung 13 zeigt die Aufnahme eines der Ethidiumbromid-Gele. Die mit der PFGE erhaltene Induktionskurve zeigt

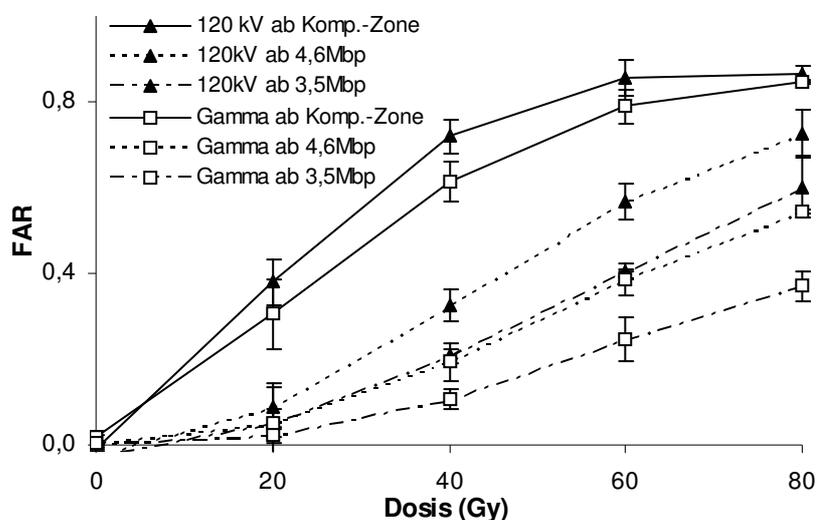
Abbildung 14. Bestimmt wurde der FAR-Wert ab Kompressionszone, sowie ab einer Fragmentgröße von 3,5 und 4,6 Mbp, die mit Hilfe des Längenstandards bestimmt wurden. Die Kompressionszone stellt eine Ansammlung von großen Molekülen dar, die nicht weiter ins Gel wandern können. Somit gibt der FAR-Wert ab Kompressionszone die DNA-Fraktion für alle auftrennbaren Fragmentgrößen wieder. Die ab Fragmentgrößen von 4,6 Mbp bzw. ab 3,5 Mbp gemessenen Induktionskurven geben den FAR-Wert für DNA-Fragmentgrößen an, die kleiner als 4,6 bzw. 3,5 Mbp sind. Aus Abbildung 14 ist zu sehen, dass die Induktionskurven einen (zumindest angedeuteten) sigmoiden Verlauf haben. Unterhalb einer Mindestdosis sind die DNA-Fragmente zu groß, um ausreichend weit ins Gel zu wandern und oberhalb einer gewissen Dosis ist die DNA so klein fragmentiert, dass (fast) die gesamte DNA von den Taschen ins Gel wandert. Unabhängig von der Fragmentgröße zeigt sich, dass die mit 120 kV Röntgenstrahlung bestrahlten Proben einen höheren FAR-Wert haben als die mit der gleichen Dosis  $\gamma$ -Strahlung bestrahlten Proben. Es zeigen sich folgende Ergebnisse für DNA-Fragmente ab Kompressionszone:

Um den gleichen FAR-Wert wie nach einer Bestrahlung mit 20 Gy der 120 kV-Strahlung zu erhalten, muss die  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Probe mit 25 Gy, d. h. einer ca. 25% höheren Dosis bestrahlt werden. Für Dosen bis 40 Gy steigt der FAR-Wert nach Bestrahlung mit 120kV-Röntgenstrahlung etwas steiler an, als nach Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlung. Um den gleichen FAR-Wert wie nach einer Dosis von 40 Gy 120 kV-Röntgenstrahlung zu erhalten, muss mit einer 30% höheren Dosis  $\gamma$ -Strahlung (= ca. 52 Gy) bestrahlt werden. Bis zu einer Dosis von 80 Gy flacht insbesondere die Induktionskurve für die 120 kV-Strahlung stark ab. Zu dieser Abflachung kommt es, wenn die DNA wie oben erwähnt so stark fragmentiert wurde, dass sie vollständig von der Tasche ins Gel wandert. Bei diesen Strahlendosen sind dann keine Unterschiede in der Induktion zwischen Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese mehr messbar. Für DNA-Fragmente kleiner als 3,5 bzw. 4,6 Mbp zeigt sich folgender Verlauf der FAR-Werte: die FAR-Werte nach Bestrahlung mit 20, 40 und 60 Gy 120 kV-Röntgenstrahlung sind etwa doppelt so hoch wie nach Bestrahlung mit der gleichen Dosis  $\gamma$ -Strahlung. Sowohl ab einer Ausschlussfragmentgröße von 3,5 als auch von 4,6 Mbp muss mit einer zwischen 35 und 40% höheren Dosis  $\gamma$ -Strahlung bestrahlt werden, um den gleichen FAR-Wert wie nach Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung zu erreichen. Auch hier liegt eine, wenn auch weniger ausgeprägte Abflachung der Induktionskurve zu hohen Dosen hin vor. Ein vollständig sigmoider Verlauf würde sich hier erst nach wesentlich höheren Dosen zeigen. Insgesamt findet sich also auch in der PFGE ein Unterschied in der Induktion von DSBs durch Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung. Dieser ist abhängig von der

untersuchten DNA-Fragmentgröße. Betrachtet man die Gesamtmenge der aus den Taschen gelaufenen DNA ab Kompressionszone, zeigt sich eine ca. 25-30% höhere RBW für den FAR-Wert durch Röntgen- als durch  $\gamma$ -Strahlung. Betrachtet man die Menge der aus den Taschen gelaufenen DNA-Fragmente, die kleiner als 3,5 bzw. 4,6 Mbp sind, beträgt der Unterschied in der RBW für den FAR-Wert zwischen Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung ca. 35-40%.



**Abbildung 13:** Ethidiumbromid-Gel von HSF-1-Zellen, die mit verschiedenen Dosen Röntgen- (x-rays) und  $\gamma$ -Strahlung ( $\gamma$ -rays) bestrahlt wurden. Mit steigender Dosis und damit Fraktionierung der DNA läuft mehr DNA von den Taschen ins Gel. Die Ermittlung des FAR-Wertes gibt dann eine quantitative Aussage über die DSB-Induktion der einzelnen Strahlenarten. Als Längensstandard diente die DNA von *s.cervisiae* und *s. pombe*.



**Abbildung 14:**

Induktionskurven von HSF1-Zellen nach Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung und  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung. Die durchgezogenen Linien zeigen die FAR-Werte berechnet für Ausschussfragmentgrößen ab der Kompressionszone, die gepunkteten Linien ab 4,6 Mbp und die gestrichelten Linien ab einer Ausschussfragmentgröße von 3,5 Mbp. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 2 Versuchen wieder.

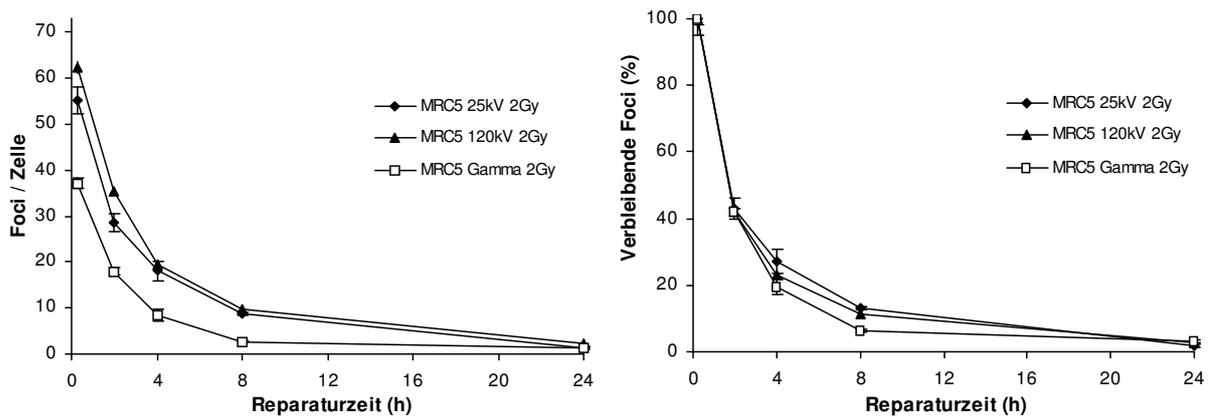
## 4.4. DSB-Reparatur

Nachdem in Kapitel 4.1. und 4.2. Unterschiede in der DSB-Induktion zwischen den verschiedenen Photonenenergien beschreiben wurden, soll im Folgenden auf Unterschiede in den Reparaturvorgängen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Photonenenergien eingegangen werden. Zunächst wurden Wildtypzellen mit 2 Gy 25 kV-, 120 kV- und  $^{137}\text{Cs}$ -Gammastrahlung bestrahlt und mit Hilfe der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode die DSBs zu unterschiedlichen Reparaturzeiten gemessen. Die Dosis von 2 Gy wurde gewählt, da bei der hierdurch induzierten Zahl an DSBs noch nach einer Reparaturzeit von 24 h messbare Unterschiede zu erwarten sein sollten und direkte Vergleiche mit Kinetiken älterer Arbeiten möglich waren. Basierend auf dem in Kapitel 4.1. bestimmten „wahren“ Induktionswert wird der Anteil unreparierter DSBs (in Prozent von der Induktion) graphisch dargestellt. Somit ist ein direkter Vergleich der Reparaturvorgänge zwischen den verschiedenen Photonenenergien möglich. Wie in Kapitel 4.1. dargestellt, induzieren die verschiedenen Photonenenergien eine unterschiedliche Anzahl an DSBs. 2 Gy 120 kV Strahlung induzieren 1,6-mal so viele DSBs wie 2 Gy  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung und 1,2-mal so viele wie 2 Gy 25 kV-Strahlung. Um auszuschließen, dass die unterschiedlichen Induktionen einen Einfluss auf den Reparaturverlauf haben, wurde die Dosis der einzelnen Strahlenarten angepasst, so dass sich gleiche Induktionswerte ergeben sollten. Dazu wurde die Dosis bei der 25 kV-Strahlung auf 2,4 Gy erhöht, die der  $\gamma$ -Strahlung auf 3,2 Gy und die Dosis der  $\text{C}_K$ -Röntgenstrahlung auf 1,7 Gy. Wir verwendeten HSF1-Zellen und CJ179-Zelle, da diese gut zu kultivieren und zuverlässig zu färben sind. Die maximale Reparaturzeit wurde auf 3 Tage (HSF1-Zellen) bzw. 7 Tage (CJ179-Zellen) erhöht, um zu prüfen, ob sich Unterschiede in der Reparatur durch die nun höheren Induktionswerte erst zu späteren Zeitpunkten bemerkbar machen.

### 4.4.1. H2AX-Foci Analyse von reparaturprofizienten Zellen

Um die DSB-Reparatur nach Bestrahlung mit Röntgen- und Gammastrahlung zu messen, wurden zunächst Versuche mit Wildtypzellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer Dosis von 2 Gy 25 kV-, 120 kV- und  $^{137}\text{Cs}$ -Gammastrahlung bestrahlt und die Foci-Zahl zu unterschiedlichen Reparaturzeitpunkten bestimmt. Für die Experimente wurden MRC5- und HSF1-Zellen verwendet. Für die Versuche an der  $\text{C}_K$ -Röhre wurden ausschließlich HSF1-

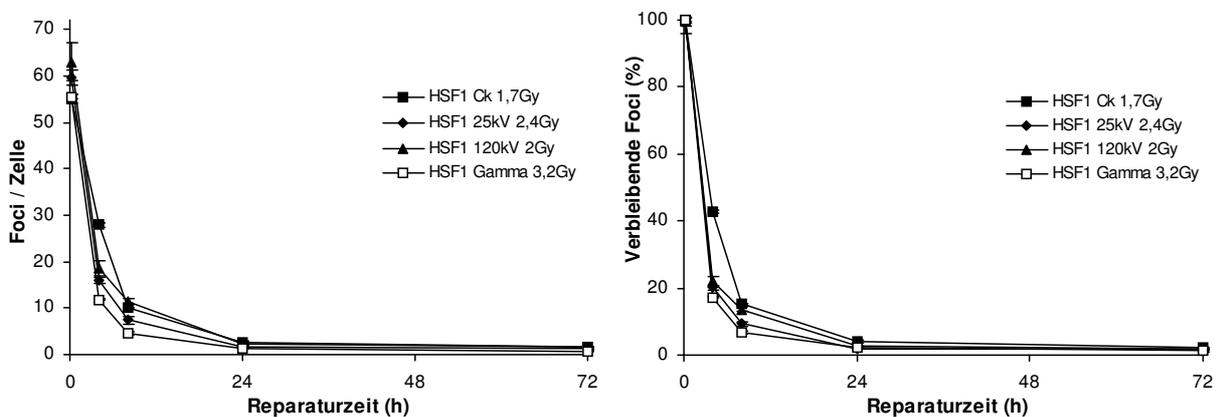
Zellen verwendet. Diese bieten den Vorteil, dass sie als Monolayer wachsen und somit alle Zellen von der wenig durchdringenden  $C_K$ -Strahlung erreicht werden konnten. In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass  $C_K$ -Strahlung mehr DSBs induziert als Röntgen- und Gammastrahlung (de Lara *et al.*, 2001; Kuhne *et al.*, 2005). Um eine DSB-Induktion in derselben Größenordnung wie bei den Röntgen- und  $\gamma$ - bestrahlten Zellen zu erhalten, wurde für die  $C_K$ -Bestrahlung zunächst eine Dosis von 1 Gy gewählt. Die Ergebnisse für MRC5- und HSF1-Zellen nach Röntgen- und Gammabestrahlung sind in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15:** Absolute und prozentuale  $\gamma$ -H2AX-Reparaturkinetik von MRC5-Wildtypzellen nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgen- und Gammastrahlung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 3 Experimenten an.

Es zeigte sich, dass die beiden Wildtypzelllinien nahezu identische Werte zu allen Reparaturzeitpunkten aufweisen. Im Folgenden soll deshalb nicht mehr zwischen MRC5- und HSF1-Zellen unterschieden werden. Insgesamt zeigt sich ein dreistufiger Verlauf der DSB-Reparatur. Zunächst findet eine rasche Reparatur der mit einer Dosis von 2 Gy Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung bestrahlten Zellen innerhalb von 4 h nach Bestrahlung statt. Die durch  $\gamma$ -Strahlung induzierten DSBs werden auf ca. 20% des Ausgangswertes repariert, die durch 25 kV- und 120 kV-Röntgenstrahlung induzierten Brüche auf etwa 25% repariert. In den folgenden 4 h verläuft die Reparatur der DSBs etwas langsamer, insbesondere in den mit 25 kV- und 120 kV bestrahlten Zellen. Die durch die Gammastrahlung induzierten Brüche sind bereits nach 8 h fast vollständig repariert, so dass in den folgenden 16 h kaum noch Reparatur stattfindet. Bis 24 h nach Bestrahlung findet dann noch eine langsame Abnahme der induzierten DSBs bis auf ca. 2,8 % des induzierten Wertes statt. Hingegen sind 8 h nach Bestrahlung mit 2 Gy 25 kV- bzw. 120 kV Röntgenstrahlung noch ca. 13% der DSBs unrepariert. 24 h nach Bestrahlung sind noch ca. 3% der Brüche unrepariert. Die durch 1 Gy  $C_K$ -Strahlung induzierten Brüche werden von den Zellen am schlechtesten repariert. Auch

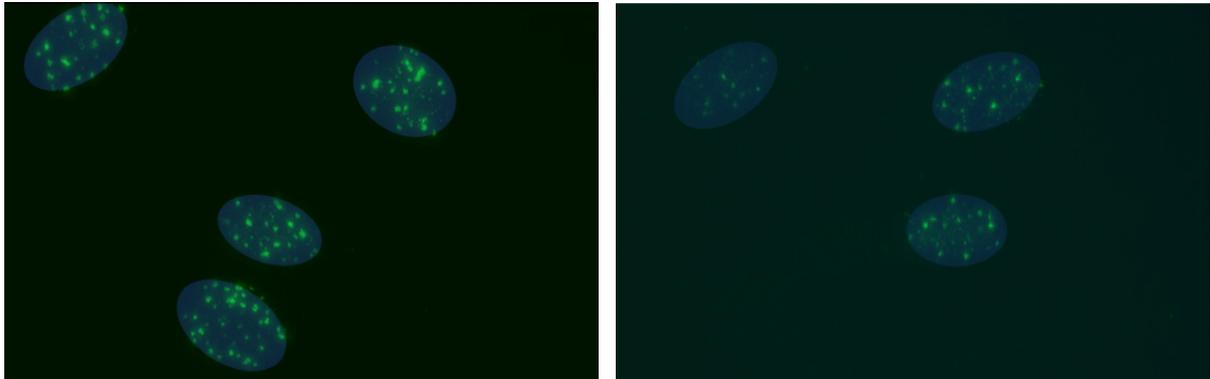
hier kann man einen dreistufigen Verlauf der DSB-Reparaturkinetik erkennen. Die Reparatur der Brüche verläuft bis 4 h nach Bestrahlung langsamer als nach 2 Gy Röntgen- oder  $\gamma$ -Strahlung. Nach diesem Zeitpunkt sind noch ca. 38% der induzierten Brüche unrepariert. In den folgenden 4 h findet ein rascher Abfall der DSBs bis auf 17% des induzierten Wertes statt. 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy der  $C_K$ -Strahlung haben die Zellen die induzierten Brüche aber ebenso wie nach Bestrahlung mit Röntgen- oder  $\gamma$ -Strahlung bis auf etwa 3% repariert. Um einen Einfluss der unterschiedlich hohen Induktionswerte auf den Reparaturverlauf zu untersuchen, wurden die Dosen der jeweiligen Photonenenergien so angepasst, dass die DSB-Induktionen ungefähr der Induktion der 120 kV-Röntgenstrahlung entsprechen. Es zeigte sich, dass die Reparaturkinetik (siehe Abbildung 16) grundsätzlich wie die nach einer initialen Dosis von jeweils 2 Gy bzw. 1 Gy bei der  $C_K$ -Strahlung verläuft.



**Abbildung 16:** Absolute und prozentuale  $\gamma$ -H2AX-Reparaturkinetik von HSF1-Wildtypzellen nach Bestrahlung mit 1,7 Gy  $C_K$ -Strahlung, 2,4 Gy 25 kV-, 2 Gy 120 kV- und 3,2 Gy  $\gamma$ -Strahlung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 2 Versuchen an.

Allerdings zeigte sich, dass die Induktionswerte nicht gänzlich angeglichen werden konnten. Die Induktion der  $\gamma$ - und der  $C_K$ -Strahlung lag ca. 7% unter der 120 kV-Strahlung. Wir konnten hierfür eine mit steigender Induktion zunehmende Überlagerung der Foci beim Auszählen unter dem Lichtmikroskop verantwortlich machen. Ab einem Wert von ca. 40 Foci pro Zelle kommt es zu einer Unterschätzung des „wahren“ Induktionswertes beim Auszählen unter dem Lichtmikroskop. Auf dieses Phänomen wird in Kapitel 4.1. näher eingegangen. Auffällig war des Weiteren, dass die Foci je nach Strahlenqualität unterschiedlich intensiv in der Färbung erschienen. Die Zellkerne wiesen nach der 120 kV-Röntgenstrahlung kräftige, gut sichtbare  $\gamma$ -H2AX-Foci auf, während die Foci nach der Gammabestrahlung kleiner

erschieden und unter dem Mikroskop schwächer fluoreszierten. Die 25 kV-Foci erschienen im Vergleich dazu in mittelstarker Intensität. Ein Vergleich gibt Abbildung 17.



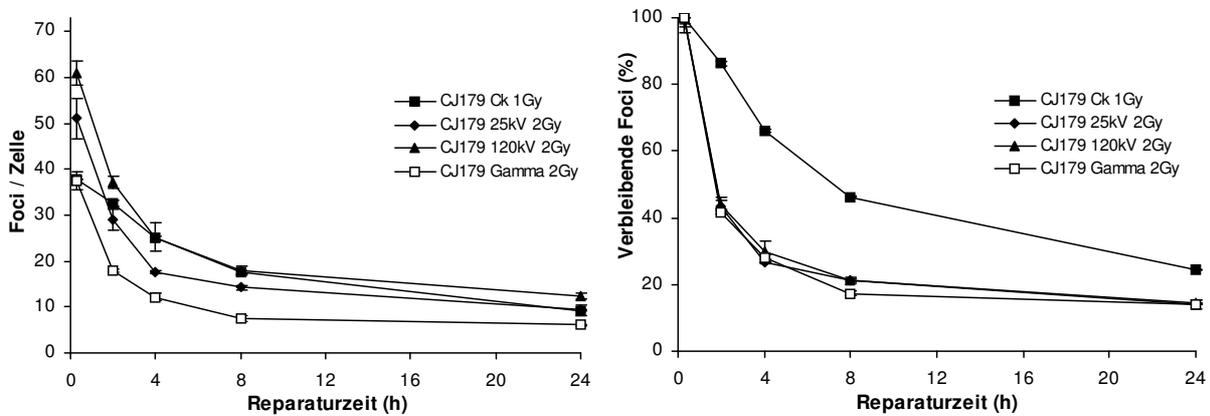
**Abbildung 17:** Unterschied in der Intensität der  $\gamma$ -H2AX-Foci nach Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung (links) und  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung (rechts). Die Bilder zeigen die Zellkerne von F01-240-Zellen 24 h nach Bestrahlung. Die Intensität der Foci der mit 120 kV-Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen ist bei gleichen Aufnahmebedingungen (z.B. Belichtungszeit) stärker als die Intensität der mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung bestrahlten Zellen.

Zusammenfassend zeigen die Reparaturexperimente mit reparaturprofizienten Zellen, dass die durch die  $C_K$ -Strahlung erzeugten Brüche langsamer repariert werden als die durch Röntgen- und insbesondere die durch Gammastrahlung erzeugten Brüche. Nach einem Tag sind jedoch fast alle DSBs beseitigt, und zwar sowohl nach Röntgen- als auch nach Gammabestrahlung.

#### 4.4.2. $\gamma$ -H2AX-Foci Analyse von Reparatur-defizienten Zellen

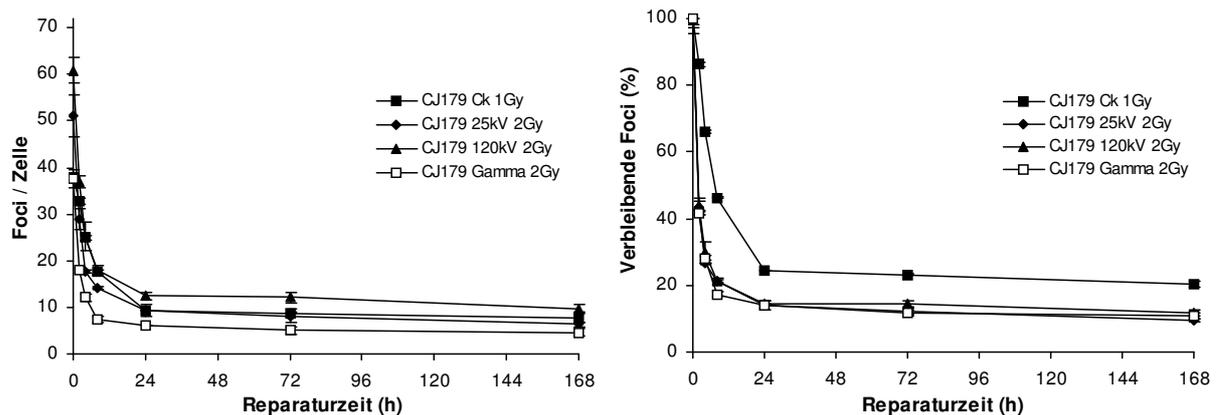
Die Versuche mit Wildtypzellen haben gezeigt, dass die durch  $C_K$ -Strahlung induzierten DSBs langsamer repariert werden als die durch Röntgen- und insbesondere durch Gammastrahlung induzierten Brüche. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die durch  $C_K$ -Strahlung induzierten DSBs komplexer sind. Um die Frage beantworten zu können, inwieweit die Energie und damit die Strahlenqualität der verwendeten Strahlen einen Einfluss auf die Komplexität der Brüche haben, wurden Zellen untersucht, die einen Defekt im Artemis-Gen haben, das eine wichtige Rolle bei der Prozessierung komplexer DSBs spielt. Verwendet wurden dabei die Zelllinien CJ-179 und F01-240. Es sollte in diesen Experimenten untersucht werden, ob mit abnehmender Photonenenergie die Komplexität der Brüche steigt und damit vermehrt Artemis-abhängige induziert werden. Zusätzlich wurde die DSB-Reparatur der

Ligase-4-defizienten Zelllinie 180BR bestimmt. Die Ergebnisse für CJ179-Zellen bis 24 h nach 1 Gy  $C_K$ - und 2 Gy, Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung gibt Abbildung 18 wieder.



**Abbildung 18:** Absolute und prozentuale  $\gamma$ -H2AX-Reparaturkinetik der Artemis-defizienten Zelllinie CJ179 bis 1 Tag nach Bestrahlung mit 1 Gy  $C_K$ -, sowie 2 Gy Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 3 Versuchen wieder (2 Versuche bei der  $C_K$ -Kinetik).

Die Induktionswerte der CJ179-Zellen sind für alle vier Strahlenarten ungefähr dieselben wie die der Wildtypzellen. Es zeigt sich, dass die durch 2 Gy Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung induzierten DSBs von den CJ179-Zellen annähernd gleich gut repariert werden können. 2 h nach Bestrahlung ist mehr als die Hälfte der induzierten Brüche repariert. Nach 8 h sind ca. weitere 20% der Brüche prozessiert. Ein Tag nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy 120 kV-Strahlung verbleiben etwa doppelt so viele Brüche unrepariert wie nach 2 Gy  $\gamma$ -Strahlung. Dies sind im Falle der 120kV-Strahlung etwa 18% der induzierten Brüche, im Falle der  $\gamma$ -Strahlung 16% der induzierten Brüche. Nach 2 Gy 25 kV-Strahlung verbleiben nach einem Tag ebenfalls 18% der Brüche unrepariert, während nach  $C_K$ -Bestrahlung 23% der induzierten DSBs unrepariert verbleiben. Es scheint, als ob die durch die  $\gamma$ -Strahlung induzierten Brüche etwas schneller repariert werden können, als die durch Röntgenstrahlung induzierten Brüche, da ein kleiner Reparaturvorteil nach 8 h Reparaturzeit zu sehen ist, der ebenso bei den Wildtypzellen beobachtet werden kann. Da 1 Tag nach Bestrahlung noch ca. 15-20% der induzierten Brüche unrepariert waren, wurden die Foci-Werte zusätzlich nach Reparaturzeiten von 3 und 7 Tagen bestimmt (siehe Abbildung 19).

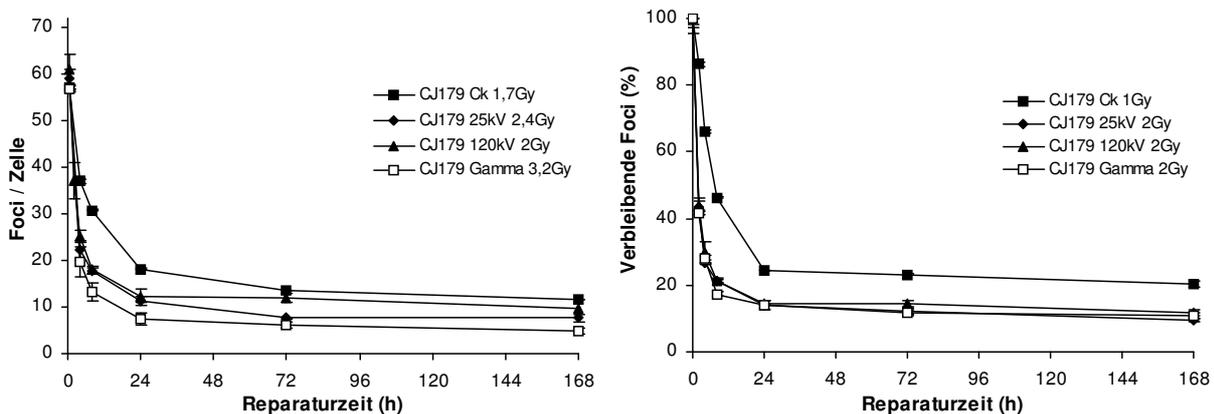


**Abbildung 19:** Absolute und prozentuale  $\gamma$ -H2AX-Reparaturkinetik der Artemis-defizienten Zelllinie CJ179 bis 7 Tage nach Bestrahlung mit 1 Gy  $C_K^-$ , sowie 2 Gy Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 3 Versuchen wieder (2 Versuche bei der  $C_K$ -Kinetik).

In den folgenden 6 Tagen werden in den mit Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung bestrahlten Zellen noch weitere 2,8% der induzierten Brüche repariert. Auffallend ist bei den Artemis-defizienten Zellen (ebenso wie bei den Wildtypzellen), dass die durch eine Dosis von 1 Gy der  $C_K$ -Strahlung induzierten DSBs am schlechtesten repariert werden. Die DSB-Reparatur in den ersten 4 h nach Bestrahlung erfolgt wesentlich langsamer als in den mit Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung bestrahlten Zellen. Es finden sich nach 2 und 4 h ca. 40% mehr unreparierte Brüche, nach 8 h mehr als 20 % und nach 24 h noch mehr als 10 % mehr unreparierte Brüche als nach Bestrahlung mit Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung. Dieser Wert von ca. 10 % mehr unreparierten Brüchen hält sich bis zu dem betrachteten Reparaturzeitpunkt von 7 Tagen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die durch eine Dosis von 2 Gy Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung induzierten DSBs annähernd gleich gut repariert werden können, wobei die durch  $\gamma$ -Strahlung induzierten Brüche insbesondere nach 8 h einen etwas niedrigeren Wert aufweisen als die durch Röntgenstrahlung induzierten Brüche. Die durch 1 Gy der  $C_K$ -Strahlung induzierten Brüche hingegen werden von den Zellen signifikant schlechter repariert. Auch zeigte sich in verstärktem Maße der bei den Wildtypen beobachtete Effekt, dass die Reparatur in den mit  $\gamma$ -Strahlung bestrahlten Zellen schneller abläuft, als in den mit  $C_K$ -Strahlung bestrahlten Zellen und die mit  $\gamma$ -Strahlung bestrahlten Zellen bereits nach 8 h die Reparatur weitgehend beendet haben.

Wie bei den Wildtypzellen wurde auch mit den Artemis-defizienten Zellen CJ179 eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, wobei die initiale Dosis der jeweiligen Photonenenergien so angepasst wurde, dass sich gleiche Induktionen ergeben. Hiermit sollte ein Einfluss der Induktion auf den Reparaturverlauf untersucht werden. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches mit CJ179-Zellen.

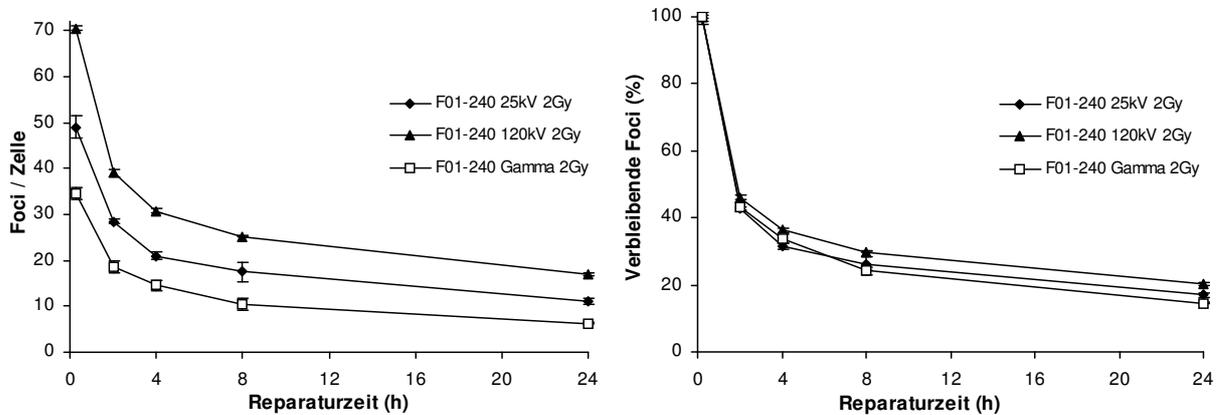


**Abbildung 20:** Absolute und prozentuale  $\gamma$ -H2AX-Reparaturkinetiken der Artemis-defizienten Zelllinie CJ179 bis 7 Tage nach Bestrahlung mit 1,7 Gy  $C_K$ -Strahlung, 2,4 Gy 25 kV-, 2 Gy 120 kV- und 3,2 Gy  $\gamma$ -Strahlung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 2 Versuchen an.

Die Induktionswerte sind fast angeglichen. Der Reparaturverlauf ist ähnlich dem nach einer Dosis von 2 Gy bzw. 1,7 Gy  $C_K$ -Strahlung. Allerdings zeigen sich folgende Abweichungen: 8 h nach Bestrahlung mit 3,2 Gy  $\gamma$ -Strahlung verbleiben ca. 23% der Induzierten DSBs unrepariert, während dies nach einer initialen Dosis von 2 Gy nur 19% sind. Außerdem kommt es nun im Zeitraum bis 24 h noch zu weiterer Reparatur bis auf 13% der induzierten Foci, wohingegen 24 h nach einer initialen Dosis von 2 Gy noch 16 % der induzierten DSBs verbleiben. Die durch 1,7 Gy  $C_K$ -Strahlung induzierten DSBs sind nach 3 Tagen auf ca. 23% repariert worden, während dieser Wert nach einer initialen Dosis von 1 Gy bereits nach 24 h erreicht ist. Abschließend lässt sich hierzu sagen, dass eine Erhöhung der initialen Dosis keine grundlegende Änderung im Reparaturverlauf nach sich zieht. Kleine Abweichungen sind im Rahmen der Messungenauigkeiten und der Standardfehler zu sehen.

Um die mit den CJ179-Zellen erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Experimente mit einer weiteren Artemis-defizienten Zelllinie (F01-240) wiederholt. Die Versuche mit diesen Zellen wurden mit 2 Gy 25 kV- und 120 kV-Röntgenstrahlung sowie mit 2 Gy  $\gamma$ -Strahlung durchgeführt. Diese Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll wie die CJ179-Zellen gefärbt, zeigten jedoch ein etwas anderes Bild unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Die

Foci stellten sich etwas diffuser dar, nicht so scharf abgrenzbar wie die der CJ179 Zellen. Die Werte bis 24 h nach Bestrahlung gibt Abbildung 21 wieder.



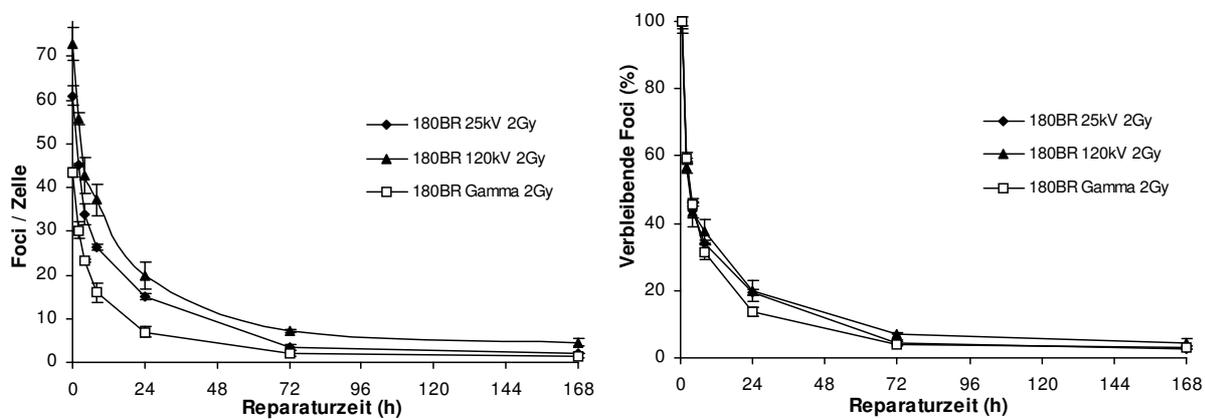
**Abbildung 21:** Absolute und relative  $\gamma$ -H2AX-Reparaturkinetik der Artemis-defizienten Zelllinie F01-240 bis zu einer Reparaturzeit von 24 h. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 3 Versuchen an.

Es zeigte sich eine um 15% höhere Induktionsrate bei den mit der 120 keV bestrahlten Zellen als bei den CJ179-Zellen. Die Induktionen bei den übrigen Strahlenqualitäten lagen in etwa so hoch wie bei den CJ179. Bis 2 h nach Bestrahlung ist die Zahl an DSBs ebenso wie in den CJ179-Zellen bis auf ca. 40% des induzierten Wertes abgefallen. 4 h nach Bestrahlung verbleiben in den F01-240-Zellen aber ca. 5% mehr und nach 8 h ca. 8% mehr Brüche unrepariert als in den CJ179-Zellen. Dies gilt sowohl für die mit Röntgenstrahlung als auch für die mit  $\gamma$ -Strahlung bestrahlten Zellen. Nach einer Reparaturzeit von 24 h ist der Anteil unreparierter Brüche nach Bestrahlung mit 25 kV-Röntgenstrahlung sowie  $\gamma$ -Strahlung ebenso wie in den CJ179-Zellen auf ca. 14% des induzierten Wertes abgefallen, während in den mit 120 kV-Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen ca. 20% der Brüche unrepariert sind. Das sind ca. 35% mehr unreparierte Brüche als bei den CJ179-Zellen. Insgesamt zeigten die F01-240 also das gleiche Reparaturverhalten wie die CJ179 mit etwas höheren Foci-Werten bei der 120 kV-Strahlung.

Die bisherigen Ergebnisse lassen einen Einfluss der Strahlenqualität auf die Komplexität der Brüche vermuten. In den Wildtypzellen und den Artemis-defizienten Zellen zeigte sich nach  $\gamma$ -Bestrahlung eine raschere Reparatur als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Mit den 180BR-Zellen wurde nun eine Zelllinie verwendet, die einen hypomorphen Defekt im Ligase-4-Gen hat. Die Ligase4 ist ein wichtiger Bestandteil des NHEJ (siehe Kapitel 2.2.2.4.). Defekte im Ligase4-Gen führen zu chromosomaler Instabilität (Ferguson *et al.*, 2000), und

manifestieren sich in Form von Immundefekten und Entwicklungsverzögerungen (Girard *et al.*, 2004). Diese Zellen können demnach sowohl die einfachen als auch die komplexeren Schäden schlechter prozessieren als Wildtypzellen. Die Versuche mit diesen Zellen sollen zeigen, ob ein Defekt im Ligase4-Gen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit gegenüber niederenergetischer Photonenstrahlung bedeutet. Die Versuche wurden lediglich mit 25 kV-, 120 kV- sowie  $^{137}\text{Cs}$ -Gammastrahlung durchgeführt, da eine Kultivierung dieser Zellen auf Kunststofffolie (für die Versuche mit  $\text{C}_K$ -Strahlung) Schwierigkeiten bereitete.

Abbildung 22 zeigt die auf Glasdeckgläsern gemessene Induktion der 180BR-Zellen. Diese liegt je nach Photonenenergie ca. 16-19% höher als die der Wildtypzellen.



**Abbildung 22:** Absolute und prozentuale  $\gamma$ -H2AX-Reparaturkinetiken der Ligase4-defizienten Zelllinie 180BR bis 7 Tage nach Bestrahlung mit 2 Gy 25 kV-, 120 kV- und  $\gamma$ -Strahlung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 2 Versuchen an.

Auch hier kann man einen dreistufigen Verlauf der DSB-Reparatur erkennen. Im Zeitraum bis 1 Tag nach Bestrahlung findet eine relativ rasche Prozessierung der DSBs statt. Im Zeitraum von 1 Tag bis 3 Tage nach Bestrahlung laufen die Reparaturvorgänge langsamer ab und zwischen 3 Tagen und 7 Tagen nach Bestrahlung finden kaum noch Reparaturvorgänge statt. Bis einschließlich 24 h nach Bestrahlung mit 25 kV-Röntgenstrahlung sind in den 180BR-Zellen ca. 22% der Brüche unrepariert, 24 h nach Bestrahlung mit 120 kV-Strahlung ca. 23% und 24 h nach Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlung ca. 16%. Dies sind prozentual etwas mehr unreparierte Brüche als in Artemis-defizienten Zellen. Die durch 25 kV- und 120 kV-Röntgenstrahlung induzierten Brüche werden annähernd gleich repariert. 24 h nach Bestrahlung mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung sind aber ca. 6% weniger unreparierte DSBs vorhanden als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. 7 Tage nach Bestrahlung haben die Zellen alle Brüche bis auf einen Wert von 3-5% repariert. Damit ähneln die Reparaturkinetiken der 180BR-Zellen sehr stark denen der Wildtypzellen mit einer zeitlichen Verzögerung.

## 5. Diskussion

In der medizinischen Diagnostik und Therapie kommt ein breites Spektrum ionisierender Photonenstrahlung zum Einsatz. Nach ersten medizinischen Erfolgen mit der neu entdeckten Strahlung wurde deutlich, dass es bei den strahlenexponierten Personen zu unerwünschten Nebenwirkungen kam. Ionisierende Strahlung kann die Struktur wichtiger biologischer Moleküle verändern und durch Veränderungen am Erbgut der Zellen letztlich zur Krebsentstehung führen. Bisher wurde vor allem aus praktischen Gründen die RBW für alle Photonenenergien mit 1 angegeben. Verschiedene Arbeiten zeigen jedoch, dass Photonenstrahlung mit niedriger Energie häufiger zu chromosomalen Translokationen (Thacker *et al.*, 1986), zur Induktion neoplastischer Transformationen (Borek *et al.*, 1983) oder zur Induktion dizentrischer Chromosomen (Fabry *et al.*, 1985; Sasaki *et al.*, 1989) führen kann als Vergleichsstrahlung mit höherer Photonenenergie. Die von Frankenberg *et al.* (2002) durchgeführten Untersuchungen ergaben für die in der Mammographie verwendete Röntgenstrahlung mit einer Maximalenergie von 29 keV sogar eine RBW von 8 im Vergleich zu  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung für neoplastische Transformationen in der menschlichen Hybrid-Zelllinie CGL1. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob mit abnehmender Photonenenergie die DSB-Induktion oder die Komplexität der DSBs steigt und dies eine Erklärung für die Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit sein kann. Hierfür wurden fünf primäre menschliche Fibroblasten-Zelllinien mit  $\text{C}_K$ -Röntgenstrahlung (278 eV), 25 kV-Röntgenstrahlung, 120 kV-Röntgenstrahlung sowie mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung (660 keV) bestrahlt. Das Photonenpektrum der hier verwendeten 25 kV-Röntgenstrahlung entspricht weitgehend den in den Mammographie-Untersuchungen verwendeten Spektren (siehe Abbildung 7). Das Photonenpektrum der hier verwendeten 120 kV-Röntgenröhre wurde durch einen 10 mm Aluminiumfilter dem in den CT-Geräten üblichen Spektrum angeglichen (siehe Abbildung 8). Die sehr „weiche“  $\text{C}_K$ -Strahlung ist eine monoenergetische Röntgenstrahlung mit einer Photonenenergie von 278 eV. Die im Vergleich dazu sehr „harte“  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung hat eine Photonenenergie von 662 keV. Gemessen wurden die durch die Strahlung induzierten DSBs mithilfe der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode sowie in einer kleineren Versuchsreihe zur Bestimmung der Induktion bei höheren Strahlendosen mit der PFGE. Die  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode eignet sich als Verfahren zum Nachweis bereits weniger DSBs nach Bestrahlung mit geringen Dosen (Rogakou *et al.*, 1998; Rothkamm & Lobrich, 2003). Vorausgesetzt wird allerdings, dass das

Vorhandensein von phosphoryliertem Histon H2AX auch tatsächlich mit dem Vorhandensein eines DSB korreliert. Vergleiche mit anderen Methoden zum Nachweis von DSBs zeigen große Übereinstimmung mit den Ergebnissen der  $\gamma$ -H2AX-Methode, so dass diese als etabliert angesehen werden kann (Rothkamm & Lobrich, 2003).

In einer ersten Versuchsreihe wurden reparaturprofiziente Wildtypzellen mit Photonenstrahlung verschiedener Energie bestrahlt und die DSBs zu verschiedenen Reparaturzeitpunkten gemessen. Es zeigte sich, dass die Anzahl der induzierten DSBs zum einen von der Photonenenergie der verwendeten Strahlung abhängt, zum anderen aber auch von dem die Zellen räumlich umgebenden Material. Des Weiteren ergaben sich Hinweise, dass die Photonenenergie einen Einfluss auf die Komplexität der DSBs hat, da die Zellen die durch die hochenergetische  $\gamma$ -Strahlung induzierten Schäden schneller reparieren als die durch die niederenergetische  $C_K$ -Strahlung induzierten. Anschließend wurden DSB-Reparaturkinetiken der Artemis-defizienten Zellen CJ179 und F01-240 bestimmt. Die Endonuklease Artemis spielt eine wichtige Rolle bei der Prozessierung komplexer DSBs (Jeggo & O'Neill, 2002; Riballo *et al.*, 2004). Somit ist es möglich, mit Hilfe dieser Zellen Unterschiede in der Komplexität der strahleninduzierten Brüche zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die niederenergetische  $C_K$ -Strahlung mehr Artemis-abhängige Brüche erzeugt als die höherenergetischen Röntgen- oder Gammastrahlen. Da die verwendeten Strahlenarten trotz gleicher initialer Dosis sowohl in Wildtypzellen als auch in Artemis-defizienten Zellen eine unterschiedliche Anzahl an DSBs induzieren, wurde in einer weiteren Versuchsreihe durch Anpassen der initialen Strahlendosis die DSB-Induktion bei allen Strahlenarten auf etwa denselben Wert angeglichen. Somit konnte ein Einfluss des Induktionswertes auf den Verlauf der DSB-Reparatur untersucht werden. Diese Versuche zeigten auch, dass man bei einer Erhöhung der initialen Dosis um einen bestimmten Faktor nicht unbedingt eine Erhöhung der unter dem Lichtmikroskop zählbaren Foci um denselben Faktor findet (siehe Kapitel 4.1.). Es kommt mit steigender Foci-Zahl zu zunehmenden Überlagerungen. Wie auch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Penny Jeggo (Sussex, UK) bekannt wurde, nimmt die Zählgenauigkeit unter dem Lichtmikroskop ab einer Zahl von ca. 40 Foci pro Zelle durch zunehmende Überlagerungen ab und es kommt zu einer Unterschätzung des wirklichen Induktionswertes. Aus diesem Grund wurde in einer eigenen Versuchsreihe für die verschiedenen Strahlenarten die nach einer Bestrahlung von 2 Gy tatsächlich zu erwartende Induktion bestimmt. Hierzu wurden die DSB-Induktionen einer WT-Zelllinie und einer Artemis-defizienten Zelllinie nach niedrigen Dosen bestimmt und die zu erwartende

Induktion bei einer Dosis von 2 Gy errechnet. Die vorhandenen Reparaturkinetiken konnten nun auf diese "wahre" Induktion normiert werden.

In einer weiteren Versuchsreihe zur Bestimmung der Induktion konnte gezeigt werden, dass auch das Material, auf dem die Zellen wachsen bzw. das sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den Zellen befindet, einen großen Einfluss auf die in den Zellen deponierte Strahlendosis und damit auf die DSB-Induktion hat.

Die Zellen befanden sich zum Bestrahlungszeitpunkt aufgrund der Kontaktinhibition in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus. Somit war sichergestellt, dass alle Zellen den gleichen DNA-Gehalt besaßen.

## 5.1. DSB-Induktion

In einer ersten Versuchsreihe wurden Unterschiede in der Wirksamkeit von Photonenstrahlung mit unterschiedlicher Energie bei reparaturprofizienten Wildtypzellen untersucht. Hierzu wurden konfluente HSF1-Wildtypzellen und Artemis-defiziente CJ179-Zellen mit verschiedenen Dosen Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung bzw. C<sub>K</sub>-Strahlung bestrahlt und mit der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode die Induktion gemessen. Die Bestrahlung der Zellen mit der 25 kV-, 120 kV- und  $\gamma$ -Strahlung erfolgte zunächst standardmäßig auf Glasdeckgläsern. Die weniger gut durchdringende C<sub>K</sub>-Strahlung machte eine Bestrahlung auf einer dünnen Kunststoffolie erforderlich. Wie zu erwarten zeigten sich zwischen den beiden Zelllinien CJ179 und HSF1 keine wesentlichen Unterschiede in der Induktion. Die Induktion wurde nach einer Reparaturzeit von 15 min. bestimmt. In diesem Zeitraum können zwar bereits Reparaturvorgänge stattfinden, allerdings kommt der Defekt im Artemis-Gen erst nach längeren Reparaturzeiten von ca. 4 h zum tragen, so dass sich die gleichen Induktionswerte wie bei WT-Zellen ergeben (Riballo *et al.*, 2004). Es zeigte sich, dass sich die Induktion stark in Abhängigkeit von der verwendeten Strahlenart unterscheidet. Unter den oben genannten Versuchsbedingungen hat die C<sub>K</sub>-Röntgenstrahlung mit ca. 38 DSBs/Gy die höchste Induktionsrate. <sup>137</sup>Cs  $\gamma$ -Strahlung induziert hingegen nur knapp halb so viele Brüche wie die C<sub>K</sub>-Röntgenstrahlung und nur 60% der durch die 120 kV-Strahlung induzierten Brüche. In der Literatur finden sich Werte für die DSB-Induktion (nach 15 min) bei WT-Zellen und Artemis-defizienten Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlung (90 kV) von ca. 50 Foci pro Zelle (Riballo *et al.*, 2004). Sie liegen damit etwa auf dem Niveau der hier gemessenen

Induktionswerte für die 25 kV-Röntgenstrahlung. In diesen Arbeiten finden sich aber keine näheren Angaben zur Dosimetrie, Filterung und dazu, auf welchem Material die Zellen bestrahlt werden. Es zeigte sich, dass das Material der Zellunterlage einen großen Einfluss auf die DSB-Induktion hat. Dies wird im folgenden Kapitel 5.1.1. diskutiert. Aus dem Diagramm aus Abbildung 11 ist ersichtlich, dass ein (annähernd) linearer Zusammenhang zwischen Dosis und Anzahl induzierter DSBs nur bis zu einer Zahl von ca. 40 Foci pro Zelle gegeben ist. Oberhalb eines Wertes von ca. 40 Foci pro Zelle kommt es durch zunehmende Überlagerung der Foci beim Auszählen unter dem Mikroskop zu einer Unterschätzung der Induktion. Mit steigender Dosis und damit zunehmender DSB-Induktion kommt es zu Überlagerungen der Foci. Wie auch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Penny Jeggo (Sussex, UK) bekannt wurde, nimmt die Zählgenauigkeit unter dem Lichtmikroskop ab diesem Wert ab und es kommt zu einer Unterschätzung des wirklichen Induktionswertes. Aus diesem Grund wurde die Induktion bei niedrigen Strahlendosen und damit gut zählbaren Werten (< 40 Foci pro Zelle) bestimmt und die Induktionsraten für die verschiedenen Photonenenergien daraus errechnet. Die so errechnete Induktionsrate bei Bestrahlung auf Deckgläsern (25 kV-, 120 kV- und  $\gamma$ -Strahlung) bzw. Mylarfolie ( $C_K$ -Strahlung) ist für die 120 kV-Strahlung am höchsten. In Tabelle 8 sind die RBW-Werte für die Induktion der verschiedenen Photonenenergien angegeben.

Dass die 120 kV-Strahlung mehr DSBs als die  $C_K$ -Strahlung und die 25 kV-Röntgenstrahlung induziert, war zunächst aufgrund der Überlegungen zum LET nicht erklärbar, da der LET der 120 kV-Strahlung mit ca. 2 keV/ $\mu$ m ca. dreimal niedriger als der LET der 25 kV-Strahlung und ca. zehnmal niedriger als der LET der  $C_K$ -Strahlung ist. Die Bestrahlung mit  $C_K$ -Strahlung musste aufgrund der geringen Reichweite dieser Strahlung auf Mylarfolie erfolgen, während bei der 25 kV-, 120 kV- und  $\gamma$ -Strahlung auf Glasdeckgläsern bestrahlt werden konnte. Es stellte sich also die Frage, ob die unterschiedlichen Bestrahlungsbedingungen einen Einfluss auf die DSB-Induktion haben könnten. In einer eigenen Versuchsreihe wurde deshalb der Einfluss des Materials der Zellunterlage auf die DSB-Induktion untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

### 5.1.1. Einfluss der Sekundärelektronen aus dem Material der Zellunterlage DSB-Induktion

Wie in Kapitel 5.1. beschrieben, zeigten sich große Unterschiede in der Induktion durch die verschiedenen Strahlenarten, sich aufgrund ihres LET zunächst nicht erklären ließen. Die energiearme und damit wenig durchdringende  $C_K$ -Strahlung erforderte eine sehr dünne Unterlage für die Zellen im Bestrahlungsaufbau, so dass hier eine ca. 2  $\mu\text{m}$  dünne Kunststoffolie zum Einsatz kam. Im Gegensatz dazu wurden die Zellen mit den höherenergetischen Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlen standardmäßig auf ca. 0,2 mm dünnen Glasdeckgläsern bestrahlt. Es stellte sich also die Frage, ob das Material der Zellunterlage einen Einfluss auf die DSB-Induktion hat.

In dieser Versuchsreihe wurde die DSB-Induktion der Wildtyp-Zelllinie HSF1 auf Deckgläsern im Vergleich zur Induktion auf der Plastikfolie nach Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy Röntgen- bzw.  $\gamma$ -Strahlung gemessen. Es zeigte sich, dass die beschriebenen Unterschiede in der Induktion zwischen Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung vom Material der Zellunterlage abhängen. Die hohe Induktion, die nach Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung auf Glasdeckgläsern gemessen wurde, ist zu etwa 50% durch Sekundärelektronen verursacht, die aus dem Deckglasmaterial herausgelöst werden. Befindet sich während der Bestrahlung unter den Zellen ein Material mit relativ hoher Ordnungszahl (Siliziumglas oder Aluminium), induziert 120 kV-Röntgenstrahlung annähernd doppelt so viele DSBs wie  $\gamma$ -Strahlung. Dieser Wert ist unabhängig davon, ob die Zellen unmittelbar auf dem Deckglas wachsen oder ob sie auf der 2  $\mu\text{m}$  dünnen Folie wachsen und das Deckglas lediglich während der Bestrahlung unter der Folie platziert wird. Diese Ergebnisse können durch die Unterschiede in den Absorptionsprozessen der unterschiedlichen Photonenenergien erklärt werden: Aus Abbildung 8 geht hervor, dass das Spektrum der 120 kV-Röntgenröhre ein Intensitätsmaximum bei einer Photonenenergie um 60 keV aufweist. Bei Photonenenergien bis ca. 60 keV spielt der Photoeffekt die entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung zwischen der Strahlung und Materie. Der Photoeffekt ist demnach hier für einen Grossteil der emittierten Sekundärelektronen verantwortlich. Die Sekundärelektronenbildung durch den Photoeffekt ist stark von der Ordnungszahl  $Z$  abhängig. So erklärt die räumliche Nähe des Elementes Silizium (Ordnungszahl 14) die nach Bestrahlung mit 25 kV- und 120 kV-Röntgenstrahlung auf siliziumhaltigen Glasdeckgläsern gefundene Erhöhung der DSBs im Vergleich Bestrahlung auf Kunststoffolie. Bei der 25 kV-Röntgenstrahlung ist der Effekt der Dosiserhöhung durch die Sekundärelektronen schwächer ausgeprägt als bei der 120 kV-

Röntgenstrahlung. Abbildung 7 zeigt, dass die 25 kV-Röntgenröhre ein Intensitätsmaximum bei ca. 15 keV aufweist. Somit spielt hier ebenso wie bei der 120 kV-Röntgenröhre der Photoeffekt eine entscheidende Rolle bei der Sekundärelektronenbildung. Die Energie der Elektronen beträgt aber nur ca. 15 keV und ihre Reichweite nur ca. 3  $\mu\text{m}$  in Wasser (Uehara & Nikjoo, 2006). Diese ist also geringer als die Reichweite der von der höherenergetischen 120 kV-Röntgenstrahlung emittierten Sekundärelektronen ( $E_{\text{max}}$  120 keV,  $E_{\text{mittel}}$  60 keV; Reichweite: ca. 40-50  $\mu\text{m}$  in Wasser), so dass nur ein Teil der Sekundärelektronen das Deckglas verlassen und bis zum Zellkern vordringen kann (zur Verteilung der Energien der Sekundärelektronen siehe Tabelle 1). Diese These konnte durch eine Versuchsanordnung bestätigt werden, bei der die Sekundärelektronen aus dem Deckglas zunächst noch eine dünne Kunststofffolie (2  $\mu\text{m}$ ) durchdringen müssen. In diesem Fall findet sich nach Bestrahlung mit 25 kV-Röntgenstrahlung keine Erhöhung der DSBs verglichen mit einer Bestrahlung auf Glasdeckgläsern. Die Energie der durch die 25 kV-Röntgenstrahlung emittierten Sekundärelektronen reicht nicht aus, um die Kunststofffolie zu durchdringen.

Die räumliche Nähe chemischer Elemente mit niedrigerer Ordnungszahl (hier  $\text{H}_2\text{O}$  als gewebeäquivalent) führte erwartungsgemäß nicht zu dem beschriebenen Effekt. Die Sekundärelektronenbildung durch die  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung erfolgt zu über 99% durch den Comptoneffekt. Dieser ist in wesentlich geringerem Maße von der Ordnungszahl  $Z$  abhängig als der Photoeffekt, weshalb durch  $\gamma$ -Bestrahlung auf Folie und Deckglas die nahezu gleiche Zahl an DSBs induziert wird.  $\gamma$ -H2AX-Foci-Analysen von Blutlymphozyten nach Computertomographie-Untersuchungen zeigen einen vergleichbaren Effekt, wenn vor der Bestrahlung mit CT-Röntgenstrahlung (120 keV) Kontrastmittel verabreicht wurde (ein Manuskript zur Veröffentlichung ist noch in Arbeit). Die Arbeitsgruppe um *Z. Cai* konnte 2006 zeigen, dass in einer dünnen Schicht Plasmid-DNA, die sich auf einer Tantal-Folie befindet, ca. 2,5 mal so viele DSBs induziert werden wie in einer dickeren Schicht Plasmid-DNA. Es wird gezeigt, dass ein Grossteil der in der dünnen Schicht induzierten DSBs durch Sekundärelektronen erzeugt wurden, die von der Tantal-Folie emittiert werden (Cai *et al.*, 2006). In der Strahlentherapie ist dieser Effekt ebenfalls bekannt. An der Grenzschicht zu Elementen mit hoher Ordnungszahl wie zum Beispiel zu Prothesen oder Implantaten wurde eine „Dosisüberhöhung“ beschrieben (Cheung & Tang, 2007). In dieser Studie wurde mit Hilfe einer Monte-Carlo-Simulation für die Grenzschicht Hirngewebe zu einem Platin-Implantat ( $Z=78$ ) eine Dosiserhöhung von 79% für 65 kV-Röntgenstrahlung und von 180% für 120 kV-Röntgenstrahlung im Vergleich zu übrigem Hirngewebe berechnet. Eine Dosisüberhöhung von knapp 80% bei einer Photonenenergie von 65 kV stimmt in etwa mit

der in dieser Arbeit gefundenen Verdopplung der Induktion bei Bestrahlung mit 120 kV überein. Die Dosisüberhöhung an der Grenzschicht zu einem Platinimplantat dürfte aufgrund der hohen Ordnungszahl von Platin höher sein, als die in dieser Arbeit nachgewiesene Dosisüberhöhung an der Grenzschicht zu einem siliziumhaltigen Glas. Möglicherweise könnte der beschriebene Effekt auch für Knochen aufgrund des darin vorhandenen Calciums ( $Z=20$ ) zutreffen und insbesondere in der Knochenhaut (Periost) zu einer „Dosisüberhöhung“ führen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Sekundärelektronen, die bei Bestrahlung mit Röntgenstrahlung insbesondere über den Photoeffekt aus dem die Zellen umgebenden Material freigesetzt werden, zu einer Verdopplung der in der Zelle deponierten Dosis führen können. Entscheidend über das Ausmaß der „Dosisüberhöhung“ ist letztendlich die Menge der freigesetzten Sekundärelektronen, die den Zellkern erreicht. Diese hängt mit der dritten Potenz von der Ordnungszahl des Materials ab, außerdem von der räumlichen Nähe des betreffenden Materials zum Zellkern und der Reichweite der Sekundärelektronen. Berücksichtigt man diesen Effekt, so ergibt sich für die DSB-Induktion der  $C_K$ -Strahlung eine RBW von 2 im Vergleich zu 120 kV-Röntgenstrahlung (siehe Tabelle 9). Die anderen Strahlenarten haben dann eine RBW von ca. 1. Obwohl von der für die  $C_K$ -Bestrahlung verwendeten Plastikfolie kaum Sekundärelektronen emittiert werden und diese aufgrund ihrer geringen Reichweite nicht den Zellkern erreichen können, findet sich hier der höchste Induktionswert. Da also ein Einfluss von außen in die Zelle eintreffenden Sekundärelektronen vernachlässigt werden kann, muss die relativ hohe DSB-induzierende Wirkung aufgrund des hohen LETs dieser Strahlung und durch innerhalb der Zelle ablaufende Prozesse bedingt sein. Die  $C_K$ -Strahlen deponieren ihre Energie ausschließlich über den Photoeffekt (Hill *et al.*, 2002). Sie haben bei einer Photonenenergie von 278 eV einen LET von 21,5 keV/ $\mu\text{m}$  und erzeugen in der Zelle Sekundärelektronen mit sehr niedriger Energie und damit kurzer Reichweite. Diese Sekundärelektronen geben ihre Energie in einem Cluster von Ionisationen auf relativ kleinem Raum ab. Somit erzeugt jedes Sekundärelektron mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit einen DSB. Nach Bryant *et al* deponieren sie ihre Energie in Form von 10-14 Ionisationen innerhalb eines Radius, der zwischen 5 und 7 nm beträgt (Hill *et al.*, 2002). Dies entspricht etwa dem doppelten DNA-Durchmesser, so dass relativ unwahrscheinlich ist, dass mehrere DSBs in unterschiedlichen DNA-Strängen interagieren (Bryant *et al.*, 2003). Studien haben gezeigt, dass ca. ein Drittel der durch Röntgen- oder  $\gamma$ -Strahlung deponierten Energie auf Sekundärelektronen mit relativ niedriger Energie (0,1-5,0 keV) zurückzuführen

ist (Nikjoo & Goodhead, 1991a). Diese sind vergleichbar mit den durch  $C_K$ -Röntgenstrahlung erzeugten Sekundärelektronen.

In der Arbeit von *Hamada et al.* wurde für HE49-WT-Zellen bei einer Reparaturzeit von 4-6 min. eine Induktionsrate von ca. 60 Foci/Gy nach Bestrahlung mit  $Al_K$ -Röntgenstrahlung (1,49 keV) gemessen (*Hamada et al.*, 2006). Diese ist damit ca. 30% höher als die in dieser Arbeit für  $C_K$ -Strahlung nach 15 min. Reparaturzeit gemessene. Allerdings konnte gezeigt werden, dass im Zeitraum zwischen 5 min. und 15 min. nach Bestrahlung bereits knapp ein Drittel der durch Röntgen- oder  $\gamma$ -Strahlung induzierten Brüche repariert werden kann (*Riballo et al.*, 2004; *Rothkamm & Lobrich*, 2003). Zudem ist die Photonenenergie der  $Al_K$ -Strahlung ca. dreimal so hoch wie die der  $C_K$ -Strahlung. Möglicherweise liegen die durch  $C_K$ -Strahlung induzierten DSBs räumlich so nahe beieinander, dass es zu einer geringfügigen Unterschätzung der wahren Induktion kommen könnte, da die einzelnen Brüche durch ihre räumliche Nähe optisch nicht mehr auflösen sind. Dieser Effekt wurde nach Bestrahlung mit  $\alpha$ -Teilchen beobachtet und ist bei diesen besonders stark ausgeprägt, da die DSBs direkt entlang der Teilchenspur induziert werden (*Kuhne et al.*, 2000). Des Weiteren wird in der Arbeit von *Hamada* beschrieben, dass die durch  $Al_K$ -Strahlung verursachten  $\gamma$ -H2AX-Foci signifikant größer sind, als die durch die höherenergetische Vergleichsstrahlung (240 kV, 0,25 mm Kupferfilter) verursachten Foci. Die Versuche in dieser Arbeit zeigen, dass die durch  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung verursachten Foci deutlich kleiner sind als die durch die anderen Strahlenarten induzierten Foci (siehe Abbildung 17). Da sowohl bei der 240 kV-Röntgenstrahlung als auch bei der  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung der Comptoneffekt dominiert, könnte dies ein Hinweis sein, dass die Auger-Elektronen, die insbesondere beim Photoeffekt entstehen einen Einfluss auf die Ausbildung der  $\gamma$ -H2AX-Foci haben. Diese haben eine Energie von 500 eV und eine Reichweite in Wasser von ca. 25 nm (*Meesungnoen et al.*, 2002). Die Reichweite ist damit ausreichend, um beispielsweise zwei parallel nebeneinander liegende DNA-Stränge zu treffen und dort Ionisationen hervorzurufen. Somit könnten zwei getrennte aber räumlich sehr nahe beieinander liegende DSBs entstehen. Das  $\gamma$ -H2AX-Signal würde sich dann an dieser Stelle intensiver darstellen.

Vergleiche der RBW für die DSB-Induktion nach  $C_K$ -Bestrahlung bestätigen die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Wert von 2 verglichen mit  $\gamma$ -Strahlung. Mittels PFGE durchgeführter DSB-Analysen ergeben für  $C_K$ -Röntgenstrahlung ebenfalls eine ca. zweifach höhere DSB-Induktionsrate wie für  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung (*Kuhne et al.*, 2005). *De Lara et al.* erhielten für die DSB-Induktion eine RBW von 2,7 ( $\pm$  0,3) für  $C_K$ -Röntgenstrahlen im Vergleich zu  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung (*de Lara et al.*, 2001). Zudem konnten *Fulford et al.* zeigen,

dass hierfür gute Übereinstimmungen zwischen experimentellen und berechneten Daten bestehen (Fulford *et al.*, 2001).

## 5.2. DSB-Reparatur

### 5.2.1. Reparatur in Wildtypzellen

Zur Bestimmung der DSB-Reparatur wurden zunächst Wildtypzellen auf Glasdeckgläsern mit 2 Gy 25 kV- 120 kV- und  $\gamma$ -Strahlung bestrahlt und die  $\gamma$ -H2AX-Foci über einen Reparaturzeitraum bis zu 3 Tagen gemessen. Die Bestrahlung mit 1 Gy der weniger gut durchdringenden  $C_K$ -Strahlung erfolgte auf einer dünnen Kunststofffolie. Die Reparaturkinetiken wurden anschließend auf die in Kapitel 4.1. bestimmte Induktion normiert, so dass ein Vergleich der DSB-Reparatur (in Prozent) ausgehend vom Induktionswert möglich ist. Ein Blick auf die normierte DSB-Reparaturkinetik der Wildtypzellen (Abbildung 16) zeigt, dass zwischen den durch 25kV- und 120 kV-Strahlung induzierten DSBs kaum Unterschiede in der Reparaturkinetik bestehen. Allerdings werden die durch die  $C_K$ -Strahlung erzeugten DSBs langsamer repariert als die durch Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung induzierten. Insbesondere in einem Zeitraum zwischen 4 h und 8 h nach Bestrahlung bleiben deutlich mehr DSBs unrepariert. 8 h nach  $C_K$ -Bestrahlung sind genauso viele Brüche unrepariert wie 4 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung. Nach einer Reparaturzeit von 24 h haben die Zellen jedoch alle Brüche unabhängig von der Photonenenergie der Strahlung auf denselben Wert repariert. Mittels PFGE durchgeführter DSB-Messungen ergaben in WT-Zellen nach 24 h einen Anteil von 10% unreparierten Brüchen nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 16 x 2,2, Gy und 8 x 4,4 Gy. Eine einmalige Dosis von 16 Gy ergab einen Anteil von 20 % unreparierten DSBs (Kuhne *et al.*, 2005). Dies zeigt, dass entweder die hohe Anzahl induzierter DSBs zu einer Art „Sättigungseffekt“ des Reparatursystems führt oder die Zellen zur Reparatur dieser hohen DSB-Anzahl einfach eine längere Zeit als 24 h benötigen. Um einen Einfluss der unterschiedlich hohen Induktionswerte (siehe Kapitel 4.1. und 5.1.) auf die Reparatur zu untersuchen, wurde in einer eigenen Versuchsreihe die Reparatur nach Angleichen der verschieden hohen Induktionen gemessen. Die Dosen wurden so gewählt, dass möglichst alle Strahlenarten die gleiche Induktion haben. Als Referenz diente der Induktionswert der 120 kV-Strahlung. Bei einer Erhöhung der Dosis auf 2,4 Gy bei der 25 kV-Strahlung, auf 3,2

Gy bei der  $\gamma$ -Strahlung und auf 1,7 Gy bei der  $C_K$ -Strahlung konnte keine Veränderung im Verlauf der Reparaturkinetik beobachtet werden. Wie in Kapitel 5.1.1. diskutiert, lassen sich die Unterschiede in der Induktion zwischen der 25 kV- 120 kV- und  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung im Wesentlichen durch Sekundärelektronen erklären, die aus den Glasdeckgläsern freigesetzt werden. Diese werden durch den bei Bestrahlung mit 120 kV- und 25 kV-Röntgenstrahlung dominierenden Photoeffekt freigesetzt und führen zu einer Erhöhung der Dosis in den Zellen und damit der Induktion. 50% der durch die 120 kV-Strahlung induzierten DSBs können auf diese Sekundärelektronen zurückgeführt werden. Dennoch ist die Reparaturkinetik der mit 25 kV-, 120 kV- und  $\gamma$ -Strahlung bestrahlten Zellen annähernd gleich. Dies zeigt, dass diese Sekundärelektronen keine zusätzlichen komplexen DSBs induzieren und dass die durch Elektronen in einem Energiebereich von 15 bis 660 keV erzeugten DSBs mit gleicher Kinetik repariert werden.

Die Versuche mit WT-Zellen lassen aber vermuten, dass die durch  $C_K$ -Strahlung verursachten DSBs komplexer sind als die durch Röntgen- oder  $\gamma$ -Strahlung verursachten. Die Zellen benötigen eine längere Zeit, um die Brüche zu prozessieren. Durch die hohe Ionisationsdichte, die insbesondere im Bereich des Durchmessers der DNA-Doppelhelix liegt, könnten vermehrt komplexe DSBs erzeugt werden, deren Bruchenden zusätzliche Schäden wie Basenschäden, Proteinvernetzungen oder Schäden am Zucker-Phosphat-Gerüst der DNA besitzen. Die Prozessierung dieser Schäden könnte mehr Zeit in Anspruch nehmen und somit die Reparaturkinetik der WT-Zellen etwas verzögern. Es ist denkbar, dass während dieser zusätzlich benötigten Zeit die Wahrscheinlichkeit für Fehlreparaturen steigt. Wenn die Bruchenden auseinander driften und zwei falsche Enden verknüpft werden, kommt es zu DNA-Aberrationen. (Kuhne *et al.*, 2004). Ein weiterer Faktor für die Begünstigung von Fehlreparatur-Ereignissen kann aber auch die räumliche Nähe von DSBs innerhalb der Bahnspur eines geladenen Teilchens sein. Für  $\alpha$ -Teilchen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass DSBs, die innerhalb der Bahnspur des  $\alpha$ -Teilchens auftreten häufig miteinander wechselwirken können und so zu dem hohen Anteil fehlreparierter DSBs führen. Dies kann die hohe RBW von  $\alpha$ -Teilchen für die Entstehung von DNA-Aberrationen erklären. Durch die räumliche Nähe vieler Bruchenden kann es häufiger zur Verknüpfung nicht zusammengehöriger DNA-Stränge kommen (Kuhne *et al.*, 2000).

Es zeigt sich zusammenfassend die Tendenz, dass keine wesentlichen Unterschiede in der DSB-Reparaturkinetik der mit 25 kV- und 120 kV-Strahlung bestrahlten Zellen bestehen. Die Reparatur der mit  $C_K$ -Strahlung bestrahlten Zellen läuft hingegen langsamer ab als die Reparatur der mit 25 kV-, 120 kV- und insbesondere der mit Gammastrahlung bestrahlten

Zellen. Die großen Unterschiede zwischen Mammographie-ähnlicher Röntgenstrahlung und höherenergetischer Röntgenstrahlung in der RBW für komplexe biologische Endpunkte wie chromosomale Translokationen oder neoplastische Transformationen lassen sich somit zumindest auf Ebene der DSB-Induktion und Reparatur nicht erklären. Die hohe RBW der  $C_K$ -Strahlung hingegen beruht auf den Clustern von Ionisationen, die ihre Sekundärelektronen im räumlichen Bereich der DNA-Doppelhelix erzeugen. Die von Frankenberg et al. berichtete RBW von ca. 4,3 für 29 kV-Röntgenstrahlung im Vergleich zu 200 kV-Röntgenstrahlung bzw. 8 im Vergleich zu  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung lässt sich mit der  $\gamma$ -H2AX-Methode und auf Ebene der DSB-Induktion nicht erklären. Es wird berichtet, dass die ca. 15 keV Sekundärelektronen der Mammographie-Röntgenstrahlung biologisch besonders effektiv sind, da ihre Reichweite ausreicht, den Zellkern zu durchqueren und Schäden an mehreren Chromosomen zu verursachen (D.Harder *et al.*, 1999; Frankenberg *et al.*, 2002). Einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit hat das tatsächliche Photonenspektrum der Strahlung. Die von Frankenberg verwendete 200 kV-Röntgenstrahlung weist ein Spektrum von 50-200 keV auf mit einem Intensitätsmaximum zwischen 60 keV und 100 keV. Bei 100 keV dominiert der Comptoneffekt, während bei der in dieser Arbeit verwendeten 120 kV-Strahlung bei einem Intensitätsmaximum von 60 keV der Photoeffekt dominiert. Die Auger-Elektronen, die zwar in hoher Anzahl beim Photoeffekt entstehen, nicht jedoch beim Comptoneffekt, könnten zudem die biologische Wirksamkeit der hier verwendeten 120 kV-Strahlung im Gegensatz zu der von Frankenberg verwendeten 200 kV-Strahlung verstärken (Kellerer, 2002; Schmid *et al.*, 2003). Auger-Elektronen entstehen beim Photoeffekt. Wird ein kernnahes Elektron durch Energiezufuhr herausgelöst, wird die bei der Neubesetzung freiwerdende Energie in Form von Elektronen mit diskreten Energien freigesetzt (so genannter „strahlungsloser Übergang“). Die Energie der emittierten Auger-Elektronen ist abhängig von den Energieniveaus der Schalen und somit von der Atomart. Nach Kellerer et al. (2002) dominieren intrazellulär Auger-Elektronen mit 500 eV durch den in der Zelle vorhandenen Sauerstoff. Arbeiten mit monoenergetischer Strahlung und Untersuchungen zur Induktion dizentrischer Chromosomen belegen, dass monoenergetische Röntgenstrahlung mit 17,4 keV (dies entspricht etwa dem Intensitätsmaximum der meisten Mammographie-Röntgenröhren) eine geringere RBW hat als das breite Spektrum einer 29 kV-Röntgenröhre. Demnach könnte ein großer Teil der relevanten Schäden durch Photonenenergien verursacht sein, die weit unterhalb der Energie des Intensitätsmaximums liegen (Schmid *et al.*, 2003). Diese These wird auch unterstützt durch Messungen an Artemis-defizienten Zellen (siehe Kapitel 5.2.2.): es zeigte sich, dass die DSB-Reparatur nach Bestrahlung mit 25 kV-, 120 kV- und  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung annähernd

gleich abläuft. Nach Bestrahlung mit der ultraweichen  $C_K$ -Röntgenstrahlung hingegen läuft die Reparatur langsamer ab und es bleibt ein größerer Anteil DSBs unrepariert.

Die Untersuchungen aus dieser Arbeit verdeutlichen nochmals den großen Einfluss, den auch „äußere“ physikalische Faktoren wie das tatsächlich vorherrschende Photonenspektrum der Strahlung oder die die Zellen unmittelbar räumlich umgebenden Materialien und die dadurch emittierten Sekundärelektronen auf die biologische Wirkung einer Strahlung haben können.

### **5.2.2. Reparatur in Artemis-defizienten Zellen und Ligase4-defizienten Zellen**

Die Versuche mit reparaturprofizienten Wildtypzellen ließen vermuten, dass der LET der eintreffenden Photonenstrahlung einen Einfluss auf die Komplexität der DSBs hat. Die durch  $\gamma$ -Strahlung induzierten Brüche konnten von den WT-Zellen schneller repariert werden als die durch Röntgenstrahlung, insbesondere durch  $C_K$ -Strahlung, erzeugten Brüche. Mit den beiden Artemis-defizienten Zelllinien CJ179 und F01-240 wurde nun nachgewiesen, dass die Komplexität der DSBs mit abnehmender Photonenergie tendenziell zunimmt. Diese Zellen haben einen Defekt im Artemis-Gen und sind besonders „anfällig“ für komplexe DSBs. Zunächst wurden Messungen an CJ179-Zellen durchgeführt. Diese wurden ebenso wie die WT-Zellen mit 2 Gy Röntgen- und  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung bzw. 1 Gy  $C_K$ -Strahlung bestrahlt und die Reparaturkinetik bis zu einem Zeitpunkt von 7 Tagen bestimmt. Um zu prüfen, ob die unterschiedlich hohen Induktionswerte einen Einfluss auf das Reparaturverhalten haben, wurde auch hier in einer weiteren Versuchsreihe die initiale Dosis so angepasst, dass alle Photonenenergien eine annähernd gleiche Zahl an DSBs induzierten. Es zeigte sich, dass die Zellen ähnliche Induktionswerte wie die WT-Zellen haben. Riballo et al. (2004) finden nach Bestrahlung mit 90 kV Röntgenstrahlung für CJ179-Zellen Induktionswerte um 28 Foci pro Gy. Diese Werte stimmen gut mit den Werten überein, die in dieser Arbeit nach 25 kV-Bestrahlung gefunden wurden. Sie liegen knapp 10% niedriger als die in dieser Arbeit für 120 kV- Röntgenstrahlung gemessenen Induktionswerte. Gründe für die Differenz zu den Literaturwerten sind wie bei den WT-Zellen möglicherweise in der Verwendung einer anderen Photonenenergie, einer anderen Filterung und anderen Bestrahlungsbedingungen zu sehen. Wie in Kapitel 5.1.1. gezeigt wird, können je nach Energie der eintreffenden Photonen Dosisüberhöhungen auftreten, die durch Sekundärelektronen aus dem die Zellen umgebenden Material verursacht werden. Im schnellen Teil der Reparaturkinetik bis ca. 4 h nach Bestrahlung zeigt sich für die mit Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung bestrahlten Zellen ein mit den

WT-Zellen vergleichbarer Reparaturverlauf. Erst ab ca. 4 h verläuft die Reparatur in den Artemis-defizienten Zellen langsamer als in den WT-Zellen. Möglicherweise wird in diesem Zeitfenster bis 4 h nach Bestrahlung ein großer Teil der „einfach“ ligierbaren Brüche, d. h. Brüche, die keine weiteren Schäden an ihren Bruchenden aufweisen, vom NHEJ repariert. Gleichzeitig beginnt die Prozessierung komplexerer Brüche, die allerdings mehr Zeit benötigt, bevor die Bruchenden ligiert werden können. Da aber Artemis bei der Prozessierung komplexer DSBs benötigt wird, kommt es nach Ablauf dieses Zeitfensters von ca. 4 h zu einer Verzögerung des Reparaturvorgangs. Nutzt man ein Agens, welches nur DSBs mit glatten Bruchenden ohne zusätzliche Schäden erzeugt, so haben Artemis-defiziente Zellen gegenüber WT-Zellen keinen Reparaturdefekt (Riballo *et al.*, 2004). Ein solches Agens ist beispielsweise der Topoisomerase II-Inhibitor Etoposide. Die Versuche aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ca. 15% der durch Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung induzierten Brüche auch nach mehreren Tagen unrepariert bleiben. Ca. 15% der durch Röntgen- oder  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -Strahlung induzierten Brüche sind demnach Artemis-abhängig und gehören der Untergruppe der komplexen DSBs an. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Arbeit von Riballo *et al.* überein. Hier wurden für F01-240-Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy 90 kV-Röntgenstrahlung bzw. 1,3 Gy  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung nach 24 h jeweils ein Anteil von 10% unreparierter und damit Artemis-abhängiger Brüche gefunden. Nach hohen Dosen (80 Gy 90 kV-Röntgenstrahlung) wurde in der PFGE 24 h nach Bestrahlung ein Anteil von ca. 12% unreparierter Brüche gefunden, der auch nach Reparaturzeiten bis zu 14 Tagen relativ konstant blieb. In der vorliegenden Arbeit wurden die DSB-Reparaturkinetiken der Artemis-defizienten Ziellinien bis zu Reparaturzeiten von 7 Tagen bestimmt. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Abfall der Artemis-abhängigen DSBs nach längeren Reparaturzeiten als 24 h. Die DSB-Reparaturkinetiken der Artemis-defizienten Zellen zeigen also, dass zwischen der 25 kV-, 120 kV- Röntgenstrahlung sowie der  $\gamma$ -Strahlung keine wesentlichen Unterschiede im Reparaturverhalten bestehen. Lediglich die durch  $\gamma$ -Strahlung induzierten DSBs werden etwas schneller repariert. Dies konnte auch, sogar in etwas ausgeprägterem Maß, bei den WT-Zellen beobachtet werden. Deutlich verlangsamt läuft hingegen die Reparatur der durch die  $C_K$ -Strahlung induzierten Brüche ab. Auch hier kann man einen schnellen Teil der Kinetik (bis ca. 8 h nach Bestrahlung) und einen langsamen Teil (bis Tage nach Bestrahlung) unterscheiden. Allerdings ist der Anteil unreparierter DSBs zu allen Reparaturzeitpunkten mehr als doppelt so hoch wie bei den anderen Photonenenergien. 24 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy  $C_K$ -Strahlung sind noch ca. 25% der Brüche und 24 h nach einer Dosis von 1,7 Gy ca. 30% der Brüche unrepariert. Somit induziert die  $C_K$ -

Strahlung ca. doppelt so viele Artemis-abhängige DSBs wie die höherenergetische Vergleichsstrahlung. Zwischen 24 h und 7 d nach Bestrahlung mit einer Dosis von 1,7 Gy C<sub>K</sub>-Strahlung ist noch eine geringe Reparatur um einige Prozent zu messen (siehe Abbildung 20). Diese Tendenz zeigt sich auch in Experimenten mit <sup>241</sup>Am α-Teilchen, wo im Zeitraum zwischen 24 h und 14 d nach Bestrahlung noch Reparaturprozesse stattfinden (Riballo *et al.*, 2004). Leider existieren keine veröffentlichten Daten von γ-H2AX-Reparaturkinetiken Artemis-defizienter Zellen nach Bestrahlung mit C<sub>K</sub>-Strahlung, so dass ein direkter Vergleich mit Literaturwerten nicht möglich ist. Für <sup>241</sup>Am α-Teilchen konnte in der Arbeit von Riballo allerdings gezeigt werden, dass 24 h nach einer Dosis von 2 Gy knapp 50% der induzierten DSBs unrepariert sind, während 24 h nach 1,7 Gy C<sub>K</sub>-Bestrahlung ca. 30% unrepariert bleiben. Nach einer Reparaturzeit von 14 d sind in den mit α-Teilchen bestrahlten Zellen aber ebenfalls nur noch ca. 25% der Brüche unrepariert. Längere Reparaturzeiten sind wegen Problemen mit der Zellkultivierung zurzeit kaum realisierbar. Das ließe den Schluss zu, dass sowohl C<sub>K</sub>-Strahlung als auch α-Teilchen einen ähnlich hohen Anteil Artemis-abhängiger DSBs erzeugen, die nicht Artemis-abhängigen DSBs nach α-Teilchen-Bestrahlung im Gegensatz zur C<sub>K</sub>-Bestrahlung allerdings nach 24 h noch nicht vollständig repariert sind. Auch Wildtyp-Zellen zeigen zwischen 24 h und 14 d nach α-Teilchen-Bestrahlung noch Reparaturprozesse. Da Berechnungen zeigen, dass α-Teilchen einen noch größeren Gesamtanteil komplexer DSBs als beispielsweise C<sub>K</sub>-Strahlung verursachen können ((Nikjoo *et al.*, 2001), kann die gegenüber nach C<sub>K</sub>-Bestrahlung verzögerte Reparatur über den zusätzlich erzeugten Anteil komplexer, aber nicht Artemis-abhängiger Brüche erklärt werden. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass es DSBs gibt, die zwar komplexe Schäden am Bruchende besitzen, aber deren Reparatur nicht von Artemis abhängig ist. Die Ergebnisse neuerer Studien belegen zudem, dass es Unterschiede in den Reparaturvorgängen in Euchromatin und Heterochromatin gibt. (Goodarzi *et al.*, 2008) konnten 2008 zeigen, dass die DSB-Reparatur in Heterochromatin langsamer abläuft als in Euchromatin und in besonderem Maße Artemis- und ATM-abhängig sind. Das Muster der räumlichen Verteilung der Ionisationen im Chromatin, das eine Photonenstrahlung hervorruft kann demnach einen Einfluss auf die DSB-Reparatur und die dafür benötigten Reparaturenzyme haben.

Da man scheinbar nicht ohne weiteres die Komplexität der DSBs nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenarten vergleichen kann, ist die Angabe einer RBW für die Komplexität der Brüche schwierig. Für die in dieser Arbeit verwendeten Photonenstrahlen und die verwendete Zelllinie CJ179, könnte man vereinfachend eine RBW für den Anteil Artemis-abhängiger DSBs von 2,2 für C<sub>K</sub>-Röntgenstrahlung im Vergleich zu <sup>137</sup>Cs-γ-Strahlung, 1,73

im Vergleich zu 120 kV-Röntgenstrahlung und 2,1 im Vergleich zu 25 kV-Röntgenstrahlung angeben. Dass ultraweiche Röntgenstrahlung eine höhere RBW hat als Vergleichsstrahlung höherer Photonenenergie, ist inzwischen oft nachgewiesen worden und auch biophysikalisch erklärbar. Die Angabe eines Wertes für die RBW hängt allerdings stark vom betrachteten biologischen Endpunkt ab. Frankenberg et al. haben beispielsweise für  $C_K$ -Röntgenstrahlung eine RBW von 4 verglichen mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung angegeben. Als biologischer Endpunkt wurde die onkogene Transformation von C3H10T1/2-Zellen gewählt (Frankenberg *et al.*, 1995). Besonders Fehlreparaturereignisse scheinen nach  $C_K$ -Bestrahlung häufig zu sein. Kühne et al. gibt eine RBW von 13,9 für  $C_K$ -Strahlung im Vergleich zu  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung in Bezug auf DNA-Aberrationen an, die Folge von Fehlreparaturereignissen sind (Kuhne *et al.*, 2005). Somit liegt die in dieser Arbeit gefundene RBW für die Induktion komplexer, Artemis-abhängiger DSBs deutlich niedriger als die in den zitierten Arbeiten gemessene RBW für komplexere biologische Endpunkte. Möglicherweise sind aber Artemis-abhängige DSBs nur eine Untergruppe komplexer DSBs.

Die  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung sowie die 25 kV- und 120 kV- Röntgenstrahlung induzieren im Rahmen der Messgenauigkeit einen etwa gleich hohen Anteil Artemis-abhängiger Brüche. Wie im Kapitel 5.1.1. beschrieben, werden bei Bestrahlung mit 25 kV- und insbesondere mit 120 kV- Röntgenstrahlung durch den Photoeffekt zusätzlich viele Sekundärelektronen aus dem Deckglasmaterial freigesetzt, die die in den Zellen deponierte Dosis erhöhen können und im Falle der 120 kV-Bestrahlung ca. 50% der gemessenen DSBs induzieren. Dennoch verläuft die Reparaturkinetik fast identisch mit der Kinetik nach  $\gamma$ -Bestrahlung. Dies lässt den Schluss zu, dass die durch diese zusätzlichen Photoelektronen induzierten DSBs für ihre Reparatur kein Artemis benötigen und somit am ehesten einfache DSBs sind (Kegel *et al.*, 2007). Da die Reparaturkinetiken nach Bestrahlungen mit Röhrensparnungen zwischen 25 kV und der Energie der  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung 660 keV annähernd gleich verlaufen, könnten Photonenenergien, die vermehrt komplexe Brüche induzieren folglich einem Energiebereich zugeordnet werden, der unterhalb 15 keV liegt. Dies würde die These von Schmid et al. unterstützen, wonach besonders der niederenergetische Anteil des Spektrums einer Mammographie-Röntgenröhre für einen großen Teil der biologisch relevanten Schäden verantwortlich ist (Schmid *et al.*, 2003). Frankenberg et al. hat in Überlebensexperimenten mit CGL1-Zellen für 29 kV- Röntgenstrahlung eine RBW von 4,38 (+/- 1,87) gegenüber 200 kV- Röntgenstrahlung im linearen Teil der Überlebenskurve gemessen (Frankenberg *et al.*, 2002). Für neoplastische Transformationen wurde für 29 kV-Röntgenstrahlung verglichen mit 200 kV-Röntgenstrahlung eine RBW zwischen 4,3 und 1,9 bestimmt. Frankenberg et al.

beschreiben eine Abhängigkeit von der Dosis: die RBW fällt von 4,3 bei einer Transformationsrate von  $0,5 \text{ pro } 10^4$  überlebenden Zellen auf 1,9 bei einer Transformationsrate von  $4 \text{ pro } 10^4$  überlebenden Zellen. Diese hohe RBW wird von Frankenberg ebenfalls auf den bei Mammographie-Röntgenröhren hohen Anteil an niederenergetischen Elektronen ( $< 15 \text{ keV}$ ) zurückgeführt. Die Elektronen haben wie von Harder et al. beschrieben eine Reichweite  $< 5\mu\text{m}$ , so dass sie ihre Energie innerhalb des Zellkerns deponieren und dort viele weitere „track-end“ Elektronen auslösen können. Pro  $10 \text{ keV}$  Energieverlust erzeugen diese Elektronen im Mittel ein zusätzliches Elektron mit  $0,5\text{-}2 \text{ keV}$  sowie 10 zusätzliche Elektronen mit Energien von  $0,1\text{-}0,5 \text{ keV}$  (Grosswendt, 1999). Frankenberg argumentiert unter anderem, dass Elektronen im Energiebereich von  $0,2\text{-}0,5 \text{ keV}$  vermehrt komplexe DSBs induzieren können. Dies stimmt durchaus mit den in dieser Arbeit für  $C_K$ -Strahlung gemachten  $\gamma$ -H2AX-Messungen überein. Die Energie der meisten durch  $C_K$ -Röntgenstrahlen erzeugten Sekundärelektronen liegt bei ca.  $0,27 \text{ keV}$  und diese induzieren einen ca. zweifach höheren Anteil Artemis-abhängiger DSBs als höherenergetische Vergleichsstrahlung.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch für die  $25 \text{ kV}$ - Mammographieröntgenstrahlung kein signifikant höherer Anteil Artemis-abhängiger DSBs gemessen werden. Somit kann eine RBW von 4 für onkogene Transformationen wie von Frankenberg bestimmt bzw. eine RBW von 3,3 für DNA-Fehlreparaturereignisse und daraus folgende DNA-Aberrationen (Kuhne et al., 2005) zumindest auf Ebene von DNA-Doppelstrangbrüchen und mit Hilfe der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode nicht erklärt werden. Komplexe Brüche können zwar die Fehlreparaturhäufigkeit erhöhen, jedoch steigt auch bei einfachen Brüchen das Fehlreparatur-Risiko an, wenn viele Bruchenden räumlich nahe zusammen liegen, so dass es wie weiter oben beschrieben vermehrt zur Verbindung falscher Bruchenden kommen kann. Da mit abnehmender Photonenenergie die Bahnspuren der Sekundärelektronen und damit die Abstände zwischen den einzelnen DSBs kürzer werden, könnte es auch ohne Zunahme der Komplexität der DSBs zur vermehrten Fehlreparatur, DNA-Aberrationen und folglich zu Chromosomeninstabilität kommen.

Die bisherigen Ergebnisse lassen einen Einfluss der Strahlenqualität auf die Komplexität der Brüche erkennen. Mit den 180BR-Zellen wurde nun eine Zelllinie bestrahlt, die einen hypomorphen Defekt im Ligase-4-Gen hat. Die Ligase4 ist ein wichtiger Bestandteil des NHEJ (siehe Kapitel 2.2.2.4). Defekte im Ligase4-Gen führen zu chromosomaler Instabilität (Ferguson et al., 2000) und manifestieren sich in Form von Immundefekten und Entwicklungsverzögerungen (Girard et al., 2004). Diese Zellen können sind sowohl bei der

Reparatur der einfachen als auch der komplexeren Schäden im Vergleich zu Wildtypzellen eingeschränkt. Die Versuche mit diesen Zellen sollen zeigen, ob ein Defekt im Ligase4-Gen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit gegenüber niederenergetischer Photonenstrahlung bedeutet. Die Versuche wurden lediglich mit 25 kV-, 120 kV- sowie  $^{137}\text{Cs}$ -Gammastrahlung durchgeführt, da eine Kultivierung dieser Zellen auf Kunststofffolie (für die Versuche mit  $\text{C}_K$ -Strahlung) Schwierigkeiten bereitete. Die nach einer Dosis von 2 Gy gemessene Induktion lag mit 73 Foci pro Zelle nach Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung ca. 19% höher bei den Wildtypzellen. Rothkamm et al. (2003) fanden Werte von ca. 75 Foci pro Zelle nach Bestrahlung mit 90 kV Röntgenstrahlung mit einer Filterung von 1 mm Kupfer und 1 mm Aluminium. Diese Werte liegen etwa 40% über den in der gleichen Studie bestimmten Werten für MRC5-Wildtypzellen. Auffällig ist, dass im Zeitraum zwischen 5 min. und 15 min. nach Bestrahlung bereits deutlich messbare Reparaturvorgänge in den MRC5-Zellen, aber keine in den 180BR-Zellen stattfinden. Durch die relativ hohe Zahl induzierter DSBs, muss auch in dieser Versuchsreihe mit einer Unterschätzung des „wahren“ Induktionswertes gerechnet werden. Dieser entsteht wie in Kapitel 5.1. diskutiert durch zunehmende Überlagerung der Foci ab einem Wert von ca. 40 Foci pro Zelle und einer damit einhergehenden Zählungenauigkeit. In der vorliegenden Arbeit sind 24 h nach Bestrahlung mit 120 kV-Strahlung noch ca. 23% der induzierten Brüche und 22% der durch 25 kV-Strahlung induzierten Brüche unrepariert. 24 h nach Bestrahlung mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung sind noch ca. 16% der induzierten DSBs unrepariert. In der Arbeit von Rothkamm et al. wurde 24 h nach Bestrahlung ein Wert von ca. 30% unreparierter Brüche gemessen. Mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese konnte in der gleichen Studie ein Wert von ca. 25% unreparierter Brüche 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy 90 kV-Röntgenstrahlung gemessen werden. Zu beachten ist allerdings, dass in der vorliegenden Arbeit eine Berechnung der unreparierten DSBs (in Prozent der Induktion) auf eine mittels einer Regressionsgeraden extrapolierten Induktion erfolgte. Somit liegen die in dieser Arbeit erhaltenen Werte für den Anteil unreparierter DSBs im Vergleich zu anderen Studien etwas niedriger. 7 Tage nach Bestrahlung sind noch 3-5% der induzierten Brüche unrepariert. Es liegt keine signifikante Abhängigkeit von der Photonenenergie vor. Bis 24 h nach Bestrahlung läuft in den mit Gammastrahlung bestrahlten Zellen die Reparatur schneller ab als in den mit Röntgenbestrahlung bestrahlten Zellen. Dieser Effekt konnte bereits bei den Wildtypzellen nach 8 h Reparaturzeit beobachtet werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass das Reparaturvermögen der 180BR-Zellen mit steigender Zahl induzierter DSBs schlechter wird (Riballo *et al.*, 2001). Da durch  $\gamma$ -Strahlung ca. 40% weniger DSBs als durch die gleiche

Dosis 120 kV-Röntgenstrahlung induziert werden, wäre ein Unterschied des Reparaturverlaufs aufgrund der Unterschiede in der Induktion denkbar.

### 5.2.3. Bestimmung der DSB-Induktion mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede in der Wirksamkeit verschieden energetischer Photonenstrahlung untersucht. Dazu wurden reparaturprofiziente Wildtyp- und Artemis-defiziente Zellen mit  $C_K$ -Röntgenstrahlung, 25 kV-Mammographie-Röntgenstrahlung, 120 kV-CT-Röntgenstrahlung sowie  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung bestrahlt und die Induktion und Reparatur der DSBs mit Hilfe der  $\gamma$ -H2AX- Foci- Methode gemessen. Es zeigte sich, dass die 120 kV-Röntgenstrahlung doppelt so viele DSBs induziert wie die  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung und ca. 20% mehr als die 25 kV-Röntgenstrahlung. Da anfänglich noch nicht bekannt war, dass bei Bestrahlung mit 25 kV- und 120 kV- Röntgenstrahlung durch den Photoeffekt eine starke Freisetzung von Sekundärelektronen aus dem siliziumhaltigen Deckglas erfolgt und diese die in den Zellen deponierte Dosis annähernd verdoppeln, wurde mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese eine weitere Methode verwendet, diese Werte zu überprüfen. Wir haben uns hierbei auf einen Vergleich der DSB-Induktion von HSF1-Wildtypzellen nach Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung und  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung beschränkt, da diese Zellen problemlos zu kultivieren sind und zwischen diesen Strahlenarten der größte Unterschied in der Induktion gemessen wurde. Eine Bestrahlung mit der  $C_K$ -Röntgenröhre hätte einen technischen Umbau und wegen der nötigen hohen Dosen von 20, 40, 60 und 80 Gy sehr lange Bestrahlungszeiten notwendig gemacht.

Abbildung 14 zeigt die FAR-Werte der einzelnen Dosispunkte nach Bestrahlung mit Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung für die verschiedenen Ausschluss-Fragmentgrößen (4,6 Mbp, 3,5 Mbp und Kompressionszone). Schließt man in die Bestimmung des FAR-Wertes alle DNA-Fragmente ein, die ab der Kompressionszone ins Gel wandern, muss mit der 1,25- bis 1,3-fachen Dosis  $\gamma$ -Strahlung bestrahlt werden, um den gleichen FAR-Wert wie nach Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung zu erhalten. Nach 80 Gy sind aber keine Unterschiede zwischen Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung mehr messbar, da die DNA so stark fraktioniert ist, dass sie komplett ins Gel wandert. Schließt man für die Bestimmung des FAR-Wertes nur DNA-Fragmente ein, die kleiner als 3,5 bzw. 4,6 Mbp sind, müssten die Proben mit der 1,35- bis 1,4-fachen Dosis  $\gamma$ -Strahlung bestrahlt werden, um den gleichen FAR-Wert wie nach Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung zu erhalten. Direkte Vergleiche innerhalb einer

Studie mittels der PFGE zwischen 120 kV-Röntgenstrahlung und  $\gamma$ -Strahlung existieren in der Literatur bisher nicht. Löbrich et al. haben für 80 kV-Röntgenstrahlung (keine näheren Angaben zur Filterung) eine Induktionsrate von  $9,5 \cdot 10^{-3}$  DSBs/Mbp/Gy gemessen, während für  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung beispielsweise ein Wert von  $6,1 \cdot 10^{-3}$  angegeben wird (Kuhne *et al.*, 2005; Lobrich *et al.*, 2000; Rothkamm & Lobrich, 2003). Die Induktion nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wäre demnach ca. 56% höher als nach  $\gamma$ -Strahlung. Kühne et al. haben in dieser Studie für 29 kV-Röntgenstrahlung eine Induktionsrate von  $7 (+/- 0,2) \times 10^{-9}$  gemessen. Diese liegt damit ca. 15% höher als die Induktionsrate von  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung. Stenerlöw et al. (1994) geben für  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung einen Wert von  $4,2 \cdot 10^9$  DSBs/bp/Gy an, während in der Studie von Ikpeme et al. (1995)  $5,4 \cdot 10^9$  DSBs/bp/Gy nach Bestrahlung mit 80 kV-Röntgenstrahlung gemessen wurde. Dies entspräche einer Differenz von 28%. Insgesamt finden sich relativ große Schwankungen zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen, so dass Vergleiche mit Literaturwerten zur Induktion von Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung mittels PFGE schwierig sind.

Da die Zellen in Kunststoffflaschen bestrahlt wurden, kann man davon ausgehen, dass eine Dosisüberhöhung durch Sekundärelektronen bei Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung wie in Kapitel 5.1.1. beschrieben, nicht auftritt. Die Messung der Induktion mit der PFGE sollte vielmehr ähnliche Werte ergeben wie die Messung der  $\gamma$ -H2AX-Foci bei Bestrahlung auf Kunststofffolie, wo die Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung die gleiche Induktionsrate aufweisen. (siehe Kapitel 4.2.). Ein Unterschied zwischen beiden Methoden besteht darin, dass die Zellen bei der  $\gamma$ -H2AX-Methode eine Reparaturzeit von 15 min. benötigen, um gut sichtbare Foci auszubilden, während die Zellen bei der PFGE auf  $+4^\circ\text{C}$  gekühlt werden müssen und somit keine Reparatur abläuft. Da aber anzunehmen ist, dass in den ersten 15 min. sowohl nach Röntgen- als auch nach  $\gamma$ -Bestrahlung jeweils ein gleicher Prozentsatz der induzierten DSBs repariert wird, müssten die Unterschiede andere Ursachen haben. Studien belegen, dass durch ionisierende Strahlung so genannte „heat labile sites“ erzeugt werden können (Stenerlow *et al.*, 2003). Dabei handelt es sich um geschädigte DNA-Bereiche, die durch Zufuhr von Wärme in SSBs oder in DSBs konvertieren können. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Schäden an der Desoxyribose durch Sauerstoffradikale. Da bei dem hier verwendeten Lyse-Prozess die DNA über Nacht bei  $50^\circ\text{C}$  inkubieren muss, können diese „heat labile sites“ in DSBs konvertiert werden. Die Ergebnisse der PFGE könnten also durch eine höhere Induktion Hitze-labiler Stellen durch 120 kV-Strahlung als durch  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung erklärt werden. Literaturwerte hierzu existieren bisher nicht. Stenerlöw et al. erhielten mit einem Verfahren, bei dem die Lyse bei  $0-4^\circ\text{C}$  abläuft, eine DSB-Induktion von 25 DSBs/Gy für diploide Zellen

nach Bestrahlung mit 40 Gy  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung. Dieser Wert ist ca. 30% niedriger als der nach einer Lyse bei 50°C gemessene Wert und stimmt relativ gut mit den in der vorliegenden Arbeit mit der  $\gamma$ -H2AX-Methode gemessenen 20 Foci pro Gy überein. Wie in Kapitel 5.1.1. beschrieben, haben die durch 120 kV-Röntgenstrahlung induzierten Foci ein intensiveres  $\gamma$ -H2AX-Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop als die durch Gammastrahlung induzierten Foci. Bei der Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung entstehen im Gegensatz zur Bestrahlung mit Gammastrahlung in der Zelle Auger-Elektronen. Diese haben im Wesentlichen eine Energie von 500 eV (Kellerer, 2002). Diese Elektronen deponieren ihre Energie ähnlich wie die durch die  $C_K$ -Strahlung ausgelösten Photoelektronen in einem sehr kleinen Volumen und erzeugen mit hoher Wahrscheinlichkeit DSBs. Es wäre denkbar, dass durch die Auger-Elektronen zwei parallel nebeneinander liegende DNA-Stränge getroffen werden und somit zwei nebeneinander liegende DSBs entstehen. Diese können mit der  $\gamma$ -H2AX-Methode nicht als zwei getrennte DSBs aufgelöst werden. Vielmehr ergibt sich dann einfach ein intensiveres  $\gamma$ -H2AX-Signal unter dem Mikroskop. Mit der PFGE hingegen könnten diese dicht nebeneinander liegenden DSBs als zwei getrennte DSBs nachgewiesen werden. Bisher existieren allerdings keine veröffentlichten PFGE-Daten über einen direkten Vergleich der DSB-Induktion von 120 kV- Röntgen- und  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung. Für  $Al_K$ -Strahlung (1,5 keV) konnte mittels der PFGE eine RBW von 2,5 gegenüber  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung für die DSB-Induktion gemessen werden. Dieser Wert liegt damit etwas höher als die in dieser Arbeit mit der  $\gamma$ -H2AX-Methode bestimmte RBW von 2 für  $C_K$ -Strahlung verglichen mit  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung. Künftige Studien könnten die Frage behandeln, ob die beim Photoeffekt auftretenden Auger-Elektronen aufgrund ihrer Energie und Reichweite DSBs in zwei (oder mehreren) parallel liegenden DNA-Strängen induzieren können, die zwar mit der PFGE, nicht aber mit der  $\gamma$ -H2AX-Methode nachgewiesen werden können. Des Weiteren könnten künftige Studien untersuchen, ob die Induktion Hitze-labiler Stellen an der DNA von der Strahlenqualität abhängt und dies als weiterer Faktor die Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit der verschiedenen Strahlenarten erklären kann.

## 6. Literaturverzeichnis

### References

- Acworth IN, Bogdanov MB, McCabe DR, Beal MF. 1999.** Estimation of hydroxyl free radical levels in vivo based on liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol.* **300**: 297-313.
- Bakkenist CJ, Kastan MB. 2003.** DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**: 499-506.
- Borek C, Hall EJ, Zaider M. 1983.** X rays may be twice as potent as gamma rays for malignant transformation at low doses. *Nature* **301**: 156-158.
- Brooks AL. 1975.** Chromosome damage in liver cells from low dose rate alpha, beta, and gamma irradiation: derivation of RBE. *Science* **190**: 1090-1092.
- Bryant PE, Jones C, Armstrong G, Frankenberg-Schwager M, Frankenberg D. 2003.** Induction of chromatid breaks by carbon K-shell ultrasoft X rays. *Radiat.Res.* **159**: 247-250.
- Cai Z, Cloutier P, Hunting D, Sanche L. 2006.** Enhanced DNA damage induced by secondary electron emission from a tantalum surface exposed to soft x rays. *Radiat.Res.* **165**: 365-371.
- Chang C, Biedermann KA, Mezzina M, Brown JM. 1993.** Characterization of the DNA double strand break repair defect in scid mice. *Cancer Res.* **53**: 1244-1248.
- Chapman JD, Reuvers AP, Borsa J, Greenstock CL. 1973.** Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro. *Radiat.Res.* **56**: 291-306.
- Cheung JY, Tang FH. 2007.** The calculation of dose enhancement close to platinum implants for skull radiography. *Health Phys.* **93**: 267-272.
- Chu G. 1997.** Double strand break repair. *J.Biol.Chem.* **272**: 24097-24100.
- Cole A, Humphrey RM, DEWEY WC. 1963.** LOW-VOLTAGE ELECTRON BEAM IRRADIATION OF NORMAL AND 5-BROMOURIDINE DEOXYRIBOSIDE-TREATED L-P59 MOUSE FIBROBLAST CELLS IN VITRO. *Nature* **199**: 780-782.
- Cromie GA, Connelly JC, Leach DR. 2001.** Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol.Cell* **8**: 1163-1174.
- D.Harder, R.Greinert, D.Frankenberg. 1999.** Characteristics of electron tracks in matter. In *Radiation Research*, Vol. 2 (M. Moriarty, C. Mothershill, C. Seymour, M. Edington, J. F. Ward and R. J. M. Fry, Eds.). 2, 111-114. Allen Press, Lawrence, KS.

- de Lara CM, Hill MA, Jenner TJ, Papworth D, O'Neill P. 2001.** Dependence of the yield of DNA double-strand breaks in Chinese hamster V79-4 cells on the photon energy of ultrasoft X rays. *Radiat.Res.* **155**: 440-448.
- DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G. 2002.** Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* **21**: 3192-3200.
- Drouet J, Delteil C, Lefrancois J, Concannon P, Salles B, Calsou P. 2005.** DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J.Biol.Chem.* **280**: 7060-7069.
- Ege M, Ma Y, Manfras B, Kalwak K, Lu H, Lieber MR, Schwarz K, Pannicke U. 2005.** Omenn syndrome due to ARTEMIS mutations. *Blood* **105**: 4179-4186.
- Fabry L, Leonard A, Wambersie A. 1985.** Induction of chromosome aberrations in G0 human lymphocytes by low doses of ionizing radiations of different quality. *Radiat.Res.* **103**: 122-134.
- Ferguson DO, Sekiguchi JM, Chang S, Frank KM, Gao Y, DePinho RA, Alt FW. 2000.** The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**: 6630-6633.
- Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, Malaise EP. 1997.** Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int.J.Radiat.Biol.* **72**: 271-283.
- Frankenberg D, Kelnhofer K, Bar K, Frankenberg-Schwager M. 2002.** Enhanced neoplastic transformation by mammography X rays relative to 200 kVp X rays: indication for a strong dependence on photon energy of the RBE(M) for various end points. *Radiat.Res.* **157**: 99-105.
- Frankenberg D, Kuhn H, Frankenberg-Schwager M, Lenhard W, Beckonert S. 1995.** 0.3 keV carbon K ultrasoft X-rays are four times more effective than gamma-rays when inducing oncogenic cell transformation at low doses. *Int.J.Radiat.Biol.* **68**: 593-601.
- Friedland W, Jacob P, Paretzke HG, Merzagora M, Ottolenghi A. 1999.** Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiat. Environ. Biophys.* **38**: 39-47.
- Fulford J, Nikjoo H, Goodhead DT, O'Neill P. 2001.** Yields of SSB and DSB induced in DNA by Al(K) ultrasoft X-rays and alpha-particles: comparison of experimental and simulated yields. *Int.J.Radiat.Biol.* **77**: 1053-1066.
- Girard PM, Kysela B, Harer CJ, Doherty AJ, Jeggo PA. 2004.** Analysis of DNA ligase IV mutations found in LIG4 syndrome patients: the impact of two linked polymorphisms. *Hum.Mol.Genet.* **13**: 2369-2376.
- Glocker R, Macherauch E. 1971.** *Röntgen- und Kernphysik für Mediziner und Biophysiker.* Stuttgart: Thieme.
- Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M, Jeggo PA. 2008.** ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol.Cell* **31**: 167-177.

- Goodarzi AA, Yu Y, Riballo E, Douglas P, Walker SA, Ye R, Harer C, Marchetti C, Morrice N, Jeggo PA, Lees-Miller SP. 2006.** DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* **25**: 3880-3889.
- Goodhead DT. 1992.** Track structure considerations in low dose and low dose rate effects of ionizing radiation. 16, 7-44. *Adv. Radiat. Biol.*
- Goodhead DT. 1994.** Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int.J.Radiat.Biol.* **65**: 7-17.
- Grosswendt B. 1999.** Basic aspects of photon transport through matter with respect to track structure formation. *Radiat. Environ. Biophys.* **38**: 147-161.
- Gutteridge JM. 1994.** Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem. Biol. Interact.* **91**: 133-140.
- Hall EJ. 2000.** Radiobiology for the Radiologist. 5. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Hamada N, Schettino G, Kashino G, Vaid M, Suzuki K, Kodama S, Vojnovic B, Folkard M, Watanabe M, Michael BD, Prise KM. 2006.** Histone H2AX phosphorylation in normal human cells irradiated with focused ultrasoft X rays: evidence for chromatin movement during repair. *Radiat. Res.* **166**: 31-38.
- Hill MA, Stevens DL, Bance DA, Goodhead DT. 2002.** Biological effectiveness of isolated short electron tracks: V79-4 cell inactivation following low dose-rate irradiation with Al(K) ultrasoft X-rays. *Int.J.Radiat.Biol.* **78**: 967-979.
- Jackson SP. 2002.** Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23**: 687-696.
- Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. 1970.** Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* **227**: 168-170.
- Jeggo P, O'Neill P. 2002.** The Greek Goddess, Artemis, reveals the secrets of her cleavage. *DNA Repair (Amst)* **1**: 771-777.
- Jeggo PA. 1998.** DNA repair: P. *Curr. Biol.* **8**: R49-R51.
- Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC. 1998.** Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol.* **8**: 483-489.
- Kegel P, Riballo E, Kuhne M, Jeggo PA, Lobrich M. 2007.** X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst)* **6**: 1692-1697.
- Kellerer AM. 2002.** Electron spectra and the RBE of X rays. *Radiat. Res.* **158**: 13-22.
- Khanna KK, Jackson SP. 2001.** DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* **27**: 247-254.
- Krogh BO, Symington LS. 2004.** Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 233-271.

**Kuhne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Lobrich M. 2004.** A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res.* **64**: 500-508.

**Kuhne M, Rothkamm K, Lobrich M. 2000.** No dose-dependence of DNA double-strand break misrejoining following alpha-particle irradiation. *Int.J.Radiat.Biol.* **76**: 891-900.

**Kuhne M, Urban G, Frankenberg D, Lobrich M. 2005.** DNA double-strand break misrejoining after exposure of primary human fibroblasts to CK characteristic X rays, 29 kVp X rays and <sup>60</sup>Co gamma rays. *Radiat.Res.* **164**: 669-676.

**Kurz EU, Lees-Miller SP. 2004.** DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* **3**: 889-900.

**Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R. 2004.** Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**: 699-713.

**Lloyd. 1968.** *A Hundred Years of Medicine.* Gerald Ducworth & Co. LTD.

**Lobrich M, Kuhne M, Wetzel J, Rothkamm K. 2000.** Joining of correct and incorrect DNA double-strand break ends in normal human and ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes Chromosomes.Cancer* **27**: 59-68.

**Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. 2002.** Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**: 781-794.

**Meesungnoen J, Jay-Gerin JP, Filali-Mouhim A, Mankhetkorn S. 2002.** Low-energy electron penetration range in liquid water. *Radiat.Res.* **158**: 657-660.

**Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, de Villartay JP. 2001.** Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* **105**: 177-186.

**Munro TR. 1970.** The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat.Res.* **42**: 451-470.

**Myung K, Kolodner RD. 2003.** Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **2**: 243-258.

**Nicolas N, Moshous D, Cavazzana-Calvo M, Papadopoulo D, de Chasseval R, le Deist F, Fischer A, de Villartay JP. 1998.** A human severe combined immunodeficiency (SCID) condition with increased sensitivity to ionizing radiations and impaired V(D)J rearrangements defines a new DNA recombination/repair deficiency. *J.Exp.Med.* **188**: 627-634.

**Nikjoo H, Goodhead DT. 1991a.** Track structure analysis illustrating the prominent role of low-energy electrons in radiobiological effects of low-LET radiations. *Phys.Med.Biol.* **36**: 229-238.

- Nikjoo H, Goodhead DT. 1991b.** Track Structure-Analysis Illustrating the Prominent Role of Low-Energy Electrons in Radiobiological Effects of Low-Let Radiations. *Physics in Medicine and Biology* **36**: 229-238.
- Nikjoo H, Munson RJ, Bridges BA. 1999.** RBE-LET relationships in mutagenesis by ionizing radiation. *J.Radiat.Res.(Tokyo)* **40 Suppl**: 85-105.
- Nikjoo H, O'Neill P, Wilson WE, Goodhead DT. 2001.** Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation. *Radiat.Res.* **156**: 577-583.
- Pastwa E, Neumann RD, Mezhevaya K, Winters TA. 2003.** Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks is dependent upon radiation quality and the structural complexity of double-strand breaks. *Radiat.Res.* **159**: 251-261.
- Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S, Obe G. 2004.** Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet.Genome Res.* **104**: 7-13.
- Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B, Kysela B, Beamish H, Plowman N, Arlett CF, Lehmann AR, Jackson SP, Jeggo PA. 1999.** Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr.Biol.* **9**: 699-702.
- Riballo E, Doherty AJ, Dai Y, Stiff T, Oettinger MA, Jeggo PA, Kysela B. 2001.** Cellular and biochemical impact of a mutation in DNA ligase IV conferring clinical radiosensitivity. *J.Biol.Chem.* **276**: 31124-31132.
- Riballo E, Kuhne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Lobrich M. 2004.** A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol.Cell* **16**: 715-724.
- Richter C, Park JW, Ames BN. 1988.** Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**: 6465-6467.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998.** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J.Biol.Chem.* **273**: 5858-5868.
- Roots R, Okada S. 1972.** Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds. *Int.J.Radiat.Biol.Relat Stud.Phys.Chem.Med.* **21**: 329-342.
- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M. 2003.** Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol.Cell Biol.* **23**: 5706-5715.
- Rothkamm K, Lobrich M. 2003.** Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**: 5057-5062.
- Sasaki MS, Kobayashi K, Hieda K, Yamada T, Ejima Y, Maezawa H, Furusawa Y, Ito T, Okada S. 1989.** Induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by monochromatic X-rays of quantum energy between 4.8 and 14.6 keV. *Int.J.Radiat.Biol.* **56**: 975-988.

**Schmid E, Krumrey M, Ulm G, Roos H, Regulla D. 2003.** The maximum low-dose RBE of 17.4 and 40 keV monochromatic X rays for the induction of dicentric chromosomes in human peripheral lymphocytes. *Radiat.Res.* **160:** 499-504.

**Schmid E, Regulla D, Kramer HM, Harder D. 2002.** The effect of 29 kV X rays on the dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiat.Res.* **158:** 771-777.

**Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM. 2003.** Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol.Theor.* **2:** 233-235.

**Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. 2002.** Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat.Res.* **158:** 486-492.

**Shiloh Y. 2003.** ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat.Rev.Cancer* **3:** 155-168.

**Smith GC, Jackson SP. 1999.** The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* **13:** 916-934.

**Stenerlow B, Karlsson KH, Cooper B, Rydberg B. 2003.** Measurement of prompt DNA double-strand breaks in mammalian cells without including heat-labile sites: results for cells deficient in nonhomologous end joining. *Radiat.Res.* **159:** 502-510.

**Symington LS. 2005.** Focus on recombinational DNA repair. *EMBO Rep.* **6:** 512-517.

**Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S. 1998.** Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* **17:** 5497-5508.

**Thomas PA, Tracy BL, Ping T, Wickstrom M, Sidhu N, Hiebert L. 2003.** Relative biological effectiveness (RBE) of 210Po alpha-particles versus X-rays on lethality in bovine endothelial cells. *Int.J.Radiat.Biol.* **79:** 107-118.

**Thompson LH, Schild D. 2002.** Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat.Res.* **509:** 49-78.

**Uehara S, Nikjoo H. 2006.** Monte Carlo simulation of water radiolysis for low-energy charged particles. *J.Radiat.Res.(Tokyo)* **47:** 69-81.

**Wachsberger PR, Li WH, Guo M, Chen D, Cheong N, Ling CC, Li G, Iliakis G. 1999.** Rejoining of DNA double-strand breaks in Ku80-deficient mouse fibroblasts. *Radiat.Res.* **151:** 398-407.

**Wang H, Zeng ZC, Bui TA, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Iliakis G. 2001.** Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* **20:** 2212-2224.

**Wang J, Pluth JM, Cooper PK, Cowan MJ, Chen DJ, Yannone SM. 2005.** Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression. *DNA Repair (Amst)* **4:** 556-570.

---

**Ward JF. 1990.** The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int.J.Radiat.Biol.* **57**: 1141-1150.

**Ward JF. 1995.** Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat.Res.* **142**: 362-368.

**Zhang Y, Zhou J, Cao X, Zhang Q, Lim CU, Bailey SM, Ullrich RL, Liber HL. 2006.** Partial deficiency of DNA-PKcs increases ionizing radiation-induced mutagenesis and telomere instability in human cells. *Cancer Lett.*



## 7. Publikation / Danksagung

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde zur Publikation angenommen bei der Zeitschrift *DNA Repair*.

Die Durchführung der Experimente für diese Arbeit und die Auswertung der Ergebnisse fand zwischen 2004 und 2007 im Labor der Fachrichtung Biophysik an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes statt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Markus Löbrich für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, die Arbeit bei Ihm durchführen zu können.

Ich danke meinem Betreuer Herrn Dr. Martin Kühne für die stete Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Motivation.

Ich danke Dr. Nicole Denzer für die Hilfe bei der Auswertung einiger Experimente an der C<sub>K</sub>-Röntgenröhre.

Frau Roswitha Schepp möchte ich für die unentbehrliche Hilfe bei der Durchführung der Experimente und Vorbereitungen danken.

Allen Mitarbeitern der Fachrichtung Biophysik danke ich für die Hilfestellungen, den Gedankenaustausch und das gute Arbeitsklima in der AG.

Ein weiterer Dank gilt Dipl. Ing. Elmar Arend, der für die Funktionstüchtigkeit der technischen Geräte und die Umsetzung vieler Ideen gesorgt hat.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin Anna, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.



## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Hans-Peter Kegel

Adresse: Am Eichwald 60  
66424 Homburg

Geburtstag: 20.04.1981, Homburg

### Schulbildung:

1991-2000 Gymnasium Johanneum, Homburg  
2000 Ablegen der Abiturprüfung

### Universitäre Ausbildung:

Wintersemester 2000/2001: 1 Semester Studium der Elektrotechnik an der Universität des Saarlandes.

Seit Wintersemester 2001: Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes.

August/September 2003: ärztliche Vorprüfung.

Seit Wintersemester 2004/2005: Doktorand und Mitarbeiter in der Biophysik Homburg, Arbeitsgruppe von Professor Dr. M. Löbrich. Doktorarbeit zum Thema „Wirkung verschieden energetischer Photonenstrahlung“.

Februar 2007bis Januar 2008: Praktisches Jahres im Institut für Arbeits- und Umweltmedizin der Uniklinik Homburg, Innere Medizin Bezirksspital Affoltern a. A., Chirurgie an der Uniklinik Homburg.

2007: Veröffentlichung im Journal „DNA-Repair“ („X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact“).

27. Mai 2008: Staatsexamen.