

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Christian Rube

**Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen im Normalgewebe
nach fraktionierter Bestrahlung**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von: Juliane Wendorf
geboren am: 10.10.1984 in Berlin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1. Zusammenfassung/Summary	4
2. Einleitung	6
2.1. Strahlenbiologische und strahlentherapeutische Grundlagen	7
2.1.1. Ionisierende Strahlung und deren Effekte im Gewebe	7
2.1.2. Strahlennebenwirkungen im Normalgewebe	9
2.1.3. Fraktionierte Bestrahlung	11
2.2. Zelluläre Schadensantwort	13
2.2.1. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)	14
2.2.2. DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK)	17
2.2.3. H2AX und seine Modifikation	18
2.2.4. p53 bindendes Protein (53BP1)	19
2.3. DNA-Doppelstrangbrüche und deren Reparatursysteme	20
2.3.1. DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs)	20
2.3.2. Homologe Rekombination (HR)	21
2.3.3. Nicht-Homologes Endjoining (NHEJ)	22
2.4. Syndrome mit eingeschränkter DSB-Reparaturkapazität	23
2.4.1. Ataxia telangiectasia (AT)	23
2.4.2. AT-Heterozygotie	24
2.4.3. Schwere kombinierte Immundefekte (SCID)	25
2.5. Fragestellungen	27
3. Material und Methoden	28
3.1. Tiere	28
3.1.2. AT-Zucht	28
3.1.3. Genotypisierung	28
3.1.4. SCID-Zucht	30
3.1.5. Zuchtbedingungen	30
3.2. Bestrahlung	31
3.2.2. Bestrahlungsplanung	31
3.2.3. Einzeitbestrahlung	32
3.2.4. Fraktionierte Bestrahlung	33
3.3. Organgewinnung und Gewebeaufarbeitung	34

3.4.	Immunfluoreszenz-Färbung.....	35
3.4.2.	γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung.....	35
3.4.3.	53BP1/ γ H2AX-Doppelfärbung.....	36
3.5.	Analyse der Gewebeschnitte	37
3.5.2.	Auszuwertende Zellen.....	37
3.5.3.	Quantifizierung der H2AX-Foci	37
4.	Ergebnisse.....	40
4.1.	Messung von DSBs in unbestrahlten Kontrollen	40
4.2.	DSB-Reparaturkinetik nach Einzeitbestrahlung.....	41
4.3.	DSB-Reparaturkinetik nach fraktionierter Bestrahlung	45
5.	Diskussion.....	51
5.2.	Betrachtungen zur Methodik	52
5.2.2.	Quantifizierung von DSBs mittels γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung	52
5.2.3.	Wahl des Induktionszeitpunktes.....	55
5.3.	Betrachtung der Versuchsergebnisse.....	56
5.3.2.	Unterschiede in der DSB-Reparaturkinetik zwischen ATM ^{+/+} - und ATM ^{+/-} - Zellen nach Einzeitbestrahlung	56
5.3.3.	Einschränkungen in der DSB-Reparatur als mögliche Ursache von strahlenbedingten Nebenwirkungen.....	59
5.4.	Organunabhängige Reparatur von strahleninduzierten DSBs	61
6.	Zusammenfassung.....	64
7.	Literatur.....	65
8.	Tabellenverzeichnis	76
9.	Bildverzeichnis	77
10.	Abkürzungsverzeichnis	80
11.	Publikationen/Dank.....	82
12.	Lebenslauf	83

1. Zusammenfassung/Summary

Ziel: Es gibt zunehmende Hinweise dafür, dass genetische Faktoren die Erkennung und die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSBs) regulieren und für die stark variablen Strahlensensibilitäten bei Patienten verantwortlich sind. Genetisch determinierte DSB-Reparaturkapazitäten sind möglicherweise für die individuelle Empfänglichkeit der Patienten für Nebenwirkungen im Normalgewebe nach Strahlentherapie verantwortlich. Vor diesem Hintergrund wurde in einem präklinischen Modell die Auswirkung unterschiedlicher DSB-Reparaturkapazitäten im Normalgewebe nach Einzeitbestrahlung und fraktionierter Bestrahlung analysiert.

Material und Methoden: Verschiedene Mausstämme mit genetisch definiertem Hintergrund ($ATM^{+/+}$ -Wildtypmäuse, $ATM^{+/-}$ - Mäuse und $SCID^{-/-}$ -Tiere) wurden mit Einzelfraktionen von 2Gy oder fraktioniert (5 x 2Gy) bestrahlt. Durch Zählung von γ H2AX-Foci wurden sowohl die Induktion als auch die Reparatur von DSBs im Lungen- und Nierengewebe, welche Vertreter für spät reagierende Gewebe sind, analysiert.

Ergebnisse: In Reparatur-defizienten $SCID^{-/-}$ -Mäusen blieb nach jeder Einzelbestrahlung ein großer Anteil an strahleninduzierten DSBs zurück und führte so organunabhängig zu einer ausgesprochen starken Akkumulation von residuellen DSBs nach fraktionierter Bestrahlung. Der geringe DSB-Reparaturdefekt in $ATM^{+/-}$ -Mäusen konnte mittels Einzeitbestrahlung nicht detektiert werden. Nach fraktionierter Bestrahlung zeigte sich jedoch unabhängig vom Organ ein signifikant erhöhter Anteil an unreparierten DSBs.

Schlussfolgerung: Die Akkumulation von unreparierten DSBs nach fraktionierter Bestrahlung erfolgt organunabhängig, so dass das gesamte Ausmaß des DNA-Schadens nach fraktionierter Bestrahlung durch die genetisch determinierten DSB-Reparaturkapazitäten bestimmt sein muss. Die Daten der Arbeit zeigen, dass selbst geringe Reparaturschwächen ($ATM^{+/-}$) zu einem überproportionalen Anstieg der DNA-Schäden nach fraktionierter Bestrahlung führen und somit in der Strahlentherapie einen möglichen Einfluss auf die Nebenwirkungen im Normalgewebe haben.

Summary

Purpose: There is increasing evidence that genetic factors regulating the recognition and repair of DNA doublestrand breaks (DSBs) are responsible for differences in radiosensitivity among patients. Genetically defined DSB repair capacities are supposed to determine patients' individual susceptibility to develop adverse normal tissue reactions after radiotherapy. In a preclinical murine model, we analyzed the impact of different DSB repair capacities in normal tissues during the single and fractionated irradiation.

Material and Methods: Different strains of mice with defined genetic backgrounds (SCID^{-/-}, ATM^{+/-} heterozygous and ATM^{+/+} wild-type mice) were subjected to single (2Gy) or fractionated irradiation (5 x 2Gy). By enumerating γ H2AX foci, the formation and rejoining of DSBs were analyzed in organs representative of late-responding tissues (lung and kidney).

Results: In repair-deficient SCID^{-/-} mice, large proportions of radiation-induced DSBs remained unrepaired after each fraction, leading to the pronounced accumulation of residual DNA damage after fractionated irradiation, similarly visible in early- and late-responding tissues. The slight DSB repair impairment of ATM^{+/-} heterozygous mice was not detectable after single-dose irradiation but resulted in a significant increase in unrepaired DSBs during the fractionated irradiation scheme.

Conclusion: Radiation-induced DSBs accumulate similarly in the tissue of lung and kidney, also there are no differences between early and late responding tissue during fractionated irradiation, whereas the whole extent of residual DNA damage depends decisively on the underlying genetically defined DSB repair capacity. Moreover, our data indicate that even minor impairments in DSB repair lead to exceeding DNA damage accumulation during fractionated irradiation and thus may have a significant impact on normal tissue responses in clinical radiotherapy.

2. Einleitung

Die Strahlentherapie ist ein klinisches und experimentelles Gebiet, welches aus der heutigen Medizin nicht mehr wegzudenken ist. Zusammen mit der Chirurgie, der Chemotherapie und der Antihormonbehandlung stellt die Strahlentherapie eine bedeutsame Therapieoption in der Behandlung von malignen Tumoren dar.

Allein in Deutschland erkranken ca. 430.000 Menschen pro Jahr an Krebs, von denen fast 60% im Laufe ihres Lebens eine strahlentherapeutische Behandlung erfahren. Therapeutisches Ziel einer solchen Behandlung ist die Vernichtung der krankhaft veränderten Körperzellen unter best möglicher Schonung des Normalgewebes. Dabei verursacht die Applikation von ionisierender Strahlung im Gewebe eine Reihe von Zellschäden, von denen der DNA-Doppelstrangbruch (DNA-DSB) zu den schwerwiegendsten DNA-Schäden gehört.

Dank innovativer und sorgfältiger Planungsprozesse im Vorfeld einer Strahlentherapie und dem Wissen über das Ansprechen der jeweiligen Tumoridentitäten auf unterschiedliche Bestrahlungsmethoden ist die Strahlentherapie heute zu Tage eine gut verträgliche Behandlungsmethode. Dennoch gibt es immer wieder Patienten, die unter gleicher Behandlung schwere Nebenwirkungen entwickeln, während andere Patienten die Therapie gut vertragen. Als Ursache der individuellen Strahlensensibilitäten werden genetische Faktoren diskutiert. Es ist bekannt, dass genetische Erkrankungen, die Defekte in der DSB-Reparatur aufweisen, mit erhöhter Strahlensensibilität sowie erhöhter Tumorneigung einhergehen.

Genetische Syndrome wie Ataxia telangiectasia (AT) oder schwere kombinierte Immundefekte (SCID), die eine deutliche Einschränkung in der DSB-Reparaturkapazität aufweisen und deren Patienten bereits im Kindesalter klinisch auffällig werden, sind in der Normalbevölkerung sehr selten. Es gibt jedoch zunehmende Hinweise, dass geringe Einschränkungen in der DSB-Reparatur, die auf heterozygoten Alterationen in Genen der DNA-Schadensantwort basieren, in der Normalbevölkerung immer häufiger vertreten sind. So besitzen heterozygote AT-Merkmalsträger ($ATM^{+/-}$ -Merkmalsträger) eine Inzidenz von ca. ein bis zwei Prozent in der Normalbevölkerung. Heterozygote $ATM^{+/-}$ -Merkmalsträger sind klinisch unauffällig. Sie besitzen jedoch ein im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich erhöhtes Tumorrisiko und zeigen zum anderen schwere Nebenwirkungen nach einer strahlentherapeutischen Behandlung. Im Gegensatz zu homozygoten AT-Patienten ($ATM^{-/-}$ -

Merkmalsträgern) ist die Strahlentherapie bei heterozygoten $ATM^{+/-}$ -Merkmalsträgern eine kurative Therapieoption in der Behandlung maligner Tumore. Aufgrund des DSB-Reparaturdefektes ist jedoch bei heterozygoten $ATM^{+/-}$ -Merkmalsträgern mit schweren Nebenwirkungen und therapiebedingten Zweitmalignomen zu rechnen.

Die genetisch determinierten Faktoren sowie die molekularen Mechanismen, die das Auftreten von strahlenbedingten Nebenwirkungen beeinflussen, sind bis heute nur wenig verstanden. Aus klinischen Beobachtungen ist jedoch bekannt, dass strahlenbedingte Nebenwirkungen von milden Hautläsionen über lebensbedrohliche Zustände innerhalb eines Patientenkollektives, welches die selbe Behandlungsmethode erfährt, variieren können. Vor diesem Hintergrund untersucht die Arbeit in einem präklinischen Modell die Auswirkungen genetisch definierter DSB-Reparaturkapazitäten im Normalgewebe während klinisch relevanter Fraktionierungsschemata.

2.1. Strahlenbiologische und strahlentherapeutische Grundlagen

2.1.1. Ionisierende Strahlung und deren Effekte im Gewebe

Die physikalische Grundlage der Strahlenwirkung in der Strahlentherapie ist die Energieübertragung an biologisches Material. Die in der Strahlentherapie hauptsächlich verwendete Strahlung besteht aus Röntgen- und Gamma-Strahlen. Gamma-Strahlen entstehen bei Kernprozessen und werden von radioaktiven Isotopen ausgesendet. Röntgenstrahlen entstehen in einer Röntgenröhre, in der Elektronen in einem elektrischen Feld auf hohe Energie beschleunigt und in fester Materie abrupt abgebremst werden.

Die durch Röntgen- und Gamma-Strahlen verursachten Schäden im Gewebe selbst sind gering. Sie besitzen jedoch die Eigenschaft, ihre Energie an biologisches Gewebe abzugeben und so Teilchen mit höherer Energie, so genannte Sekundärelektronen, zu erzeugen. Dieser Prozess wird als Ionisation bezeichnet und ist unter anderem von der Energie der auftreffenden Photonen sowie der chemischen Zusammensetzung des absorbierenden Materials abhängig. Um beispielsweise ein Wassermolekül zu ionisieren, wird eine Energie von mehr als 10 eV benötigt.

Die Effekte der ionisierenden Strahlung im Gewebe resultieren hauptsächlich aus Schädigung der DNA. Absorbiert biologisches Gewebe Röntgen- bzw. Gamma-Strahlung, kann es zu direkten und indirekten Wechselwirkungen mit der DNA kommen (Goodhead, 1994; Nikjoo

et al., 1997). Beim direkten Effekt interagiert ein Elektron, welches durch die Absorption eines Röntgen- bzw. Gamma-Photons entstanden ist direkt mit der DNA. Auf diesem Weg kommt es zur Ionisierung von Basen oder Zuckerphosphaten, was zur Spaltung kovalenter Bindungen führen kann und somit Einzel- und Doppelstrangbrüche induziert (Jeggo P. und Löbrich M., 2006). Bei der indirekten Strahlenwirkung entstehen durch ionisierende Strahlung zunächst freie Radikale, die durch Diffusion zu den Zielstrukturen gelangen und diese so schädigen können. Da eine Zelle zu ca. 80% aus Wasser besteht, entsteht der Hauptanteil der indirekten Schädigung durch die Radiolyse von Wasser. Durch Auftreffen von Photonen auf ein Wassermolekül wird dies in ein Elektron und ein ionisches Radikal (H_2O^+) gespalten. Das Wasserradikalkation ist hoch reaktiv, jedoch kurzlebig. Reagiert ein solches Radikal mit einem weiteren Wassermolekül, so entstehen Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$), die wenn sie in einem Umkreis von max. 4nm von der DNA entstehen, diese schädigen können. Der Effekt der indirekten Wirkung ionisierender Strahlung verursacht ca. 60-70% der durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Schäden (Hall und Giacci, 2000).

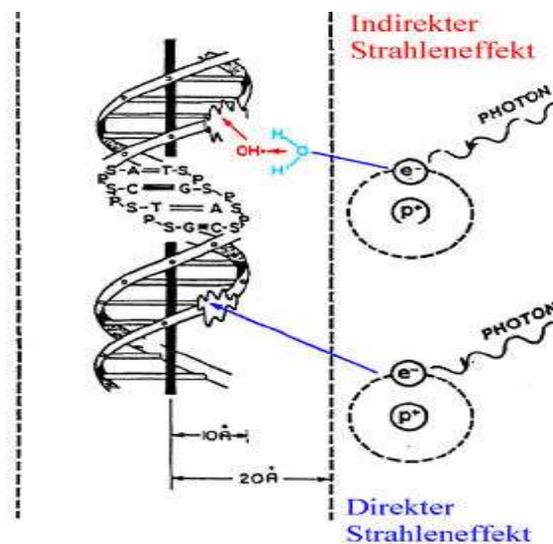


Abbildung 1: Direkte und indirekte Wirkung ionisierender Strahlung. Beim direkten Effekt interagiert ein so genanntes Sekundärelektron, welches durch Absorption ionisierender Strahlung entsteht direkt mit der DNA. Beim Vorgang der indirekten Wirkung entstehen zunächst freie Radikale, die dann Schäden an der DNA hervorrufen können. Die DNA selbst hat einen Durchmesser von 2nm. Es wird angenommen, dass freie Radikale, die in einem Zylinder des doppelten DNA-Durchmessers entstehen, mit der DNA interagieren können (Hall und Giacci, 2000).

Durch ionisierende Strahlung können eine Reihe von DNA-Schäden verursacht werden, zu denen DNA-Doppelstrangbrüche, Einzelstrangbrüche, Basenschäden, Schäden am Zucker-Rückgrat, DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen den sog. „Crosslinks“ sowie alkalilabile Stellen gehören (Powell und McMillan, 1990). Obwohl der DNA-Einzelstrangbruch im Vergleich zum Doppelstrangbruch die weitaus häufiger auftretende strahleninduzierte Läsion darstellt (Powell und McMillan, 1990), ist die schädigende Auswirkung der Doppelstrangbrüche schwerwiegender (Hoeijmakers, 2001; Kannah, et al., 2001; Van Gent et al., 2001).

In der klinischen Strahlentherapie werden diese Zell schädigenden Effekte im Rahmen von Tumorbehandlungen genutzt, um unkontrolliert wachsende Tumorzellen in ihrer Teilungsfähigkeit zu hindern und zum Absterben zu bringen.

2.1.2. Strahlennebenwirkungen im Normalgewebe

Die Effekte ionisierender Strahlung, die sich in der Tumorbehandlung zu Nutze gemacht werden, können erhebliche Nebenwirkungen im Normalgewebe verursachen. Je nach Bestrahlungsvolumen erfasst eine strahlentherapeutische Behandlung in der Regel nicht nur Tumor-, sondern auch gesundes Normalgewebe. Trifft ionisierende Strahlung auf Zellen des Normalgewebes, so kann es zu Zellschäden kommen, die sich in Früh- bzw. Spättoxizitäten äußern. Treten diese Nebenwirkungen in den ersten 90 Tagen nach Bestrahlung auf, so sind diese als Frühtoxizitäten definiert. Strahlentherapeutische Nebenwirkungen, die nach einem Zeitraum von 90 Tagen nach Bestrahlung in Erscheinung treten, werden als Spättoxizitäten definiert. Sowohl Früh- als auch Spättoxizitäten im Normalgewebe sind sehr variabel und individuell unterschiedlich stark ausgeprägt. Neben dem Bestrahlungsvolumen, der Gesamtdosis und der Bestrahlungsmethode sind diese unter anderem von der bestrahlten Gewebeart abhängig.

Grundsätzlich wird in der Klinik zwischen früh- und spät reagierendem Gewebe unterschieden. Früh reagierendes Gewebe ist durch eine strenge Ordnung von einer Stammzelle, über sich vermehrende Zellen, bis hin zur ausdifferenzierten Funktionszelle gekennzeichnet (Hermann und Baumann, 1997). Die Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und teilen sich in eine Tochterstammzelle und in eine in den Reifungszyklus abwandernde Tochterzelle. Diese ist wiederum in der Lage, mehrere Zellteilungen zu durchlaufen, ehe sie ausreift und spezifische Aufgaben im Gewebe übernimmt. Stirbt eine solche Tochterzelle ab, so wird der Zellnachschub aus

Stammzellkompartimenten gewährleistet. In früh reagierendem Gewebe besteht somit ein ständiger Zellumsatz. Unter Bestrahlung wird dieser durch Schädigung der Stammzellen verringert und es kommt somit zu Zellschäden. Der Dünndarm ist ein Vertreter dieser Gewebeart und sehr strahlensensibel.

Spät reagierendes Gewebe hingegen ist durch langsames Zellwachstum und hoch differenzierte Zellpopulationen gekennzeichnet. In diesen Gewebearten ist keine eindeutige Differenzierung zwischen Stammzellen und reifen Zellen zu beobachten. Nach Bestrahlung sind sowohl vaskuläre als auch parenchymale Veränderungen für die Zellschädigungen verantwortlich (Hermann und Baumann, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden die Gewebe Lunge und Niere untersucht, deren strahlenbedingten Toxizitäten im Folgenden kurz beschrieben werden.

Radiogene Pneumonitis

Die Lunge, als ein Vertreter des spät reagierenden Gewebes, ist ein sehr strahlensensibles Organ und reagiert abhängig von Strahlendosis, bestrahltem Volumen sowie der Bestrahlungsart mit einer Entzündungsreaktion unterschiedlichen Ausmaßes. Die radiogene Pneumonitis stellt eine Frühtoxizität dar und manifestiert sich mit einer Latenzzeit von 4 bis 6 Wochen nach Bestrahlung. Die Patienten weisen einen typisch trockenen Husten mit Ruhe- und Belastungsdyspnoe, Leistungsabfall und subfebrile Temperaturen auf. Bei einer radiogenen Pneumonitis besteht die Gefahr, dass diese in eine pulmonale Fibrose mit irreversibler Vernarbung des Lungenparenchyms übergeht. Klinische Zeichen einer pulmonalen Fibrose sind Ruhe- und Belastungsdyspnoe sowie Zyanose. In schweren Fällen kann sich sowohl im Rahmen einer akuten Pneumonitis sowie auf dem Boden einer Fibrose ein lebensbedrohliches akutes respiratorisches Syndrom und ein akutes Cor pulmonale entwickeln.

Der Mechanismus der strahlenbedingten Pneumopathie ist komplex und zum Teil noch unbekannt. Die Pneumozyten I und II kleiden den Alveolarraum aus. Die Pneumozyten II sind Stammzellen der postmitotischen Pneumozyten I und bilden den Surfactant Factor. Die Bestrahlung führt zu einem Zellverlust der Pneumozyten I und einer Proliferationshemmung der Pneumozyten II. Als Folge der Zelldepletion ist die Schutzfunktion der alveolaren Membran gegen exogene Einflüsse und gegenüber dem Interstitium gestört. Ein interstitielles Ödem tritt auf und die Migration entzündlicher Zellen, v. a. Makrophagen, setzt ein. In der akuten Phase reagieren die Endothelzellen der Lungengefäße mit Ödem, Endothellücken

bilden sich und die Membranpermeabilität ist erhöht. Dies führt zur intraalveolären Exsudation, Verdickung der Alveolarsepten und Bildung hyaliner Membranen. Im weiteren Verlauf kommt es durch Thrombozytenaggregate und Fibrin- und Kollagenablagerungen zur Obstruktion der Kapillaren und einem weiteren Verlust von Typ I Pneumozyten (Höller U. und Feyer P., 2007).

Radiogene Nephropathie

Die Niere ist ebenfalls ein Vertreter des spät reagierenden Gewebes. Der Mechanismus der radiogenen Nephropathie basiert auf einer Schädigung der Endothelzellen, des arteriellen und kapillären Systems sowie der Glomerula. Der durch eine Bestrahlung frei werdende von-Willebrand-Faktor sowie Sauerstoff- und Stickstoffradikale führen zu einer Verlegung der Gefäßlumina bis hin zur totalen Obliteration der Gefäße. Dies führt zu einem allmählichen Funktionsverlust des Glomerulums. Die Folge ist eine Minderperfusion der Niere sowie ein sich entwickelnder Hypertonus, welches in einer Atrophie des abführenden Tubulussystems resultiert. Langfristig kommt es zu fibrotischen Umbauprozessen des Interstitiums (Dörr W. und Herrmann Th., 2007).

Das klinische Erscheinungsbild der radiogenen Nephropathie ist sehr vielfältig und kann sich als „akute“ Nephritis, chronische Nephritis, benigner Hypertonus, ausschließlicher Proteinurie sowie als chronischer maligner Hypertonus äußern. Die „akute“ Nephritis tritt mit einer Latenzzeit von 6 bis 12 Monaten nach Bestrahlung auf und weist in eine Trias aus Proteinurie, Anämie und Hypertonus auf. Die chronische Nephritis entwickelt sich mit einer Latenzzeit von 18 Monaten nach Bestrahlung und geht mit Proteinurie, erhöhter Miktionsfrequenz und Azotämie einher. Nach 2 bis 5 Jahren einer Bestrahlung kann sich ein benigner Hypertonus entwickeln, der lediglich mit variabler Proteinurie verbunden ist. Die ausschließliche Proteinurie kann sich nach ca. 20 Jahren nach Bestrahlung des Nierengewebes manifestieren.

2.1.3. Fraktionierte Bestrahlung

Die auftretenden strahlenbedingten Nebenwirkungen im Normalgewebe können sowohl dosislimitierende als auch lebensbedrohliche Folgen haben. Aus diesem Grund wird in der Strahlentherapie neben einer optimalen Tumorkontrolle die Minimierung von Früh- bzw. Spättoxizitäten im Normalgewebe angestrebt. Wie bereits dargelegt, sind die auftretenden Nebenwirkungen unter anderem vom Bestrahlungsvolumen, dem bestrahltem Gewebe sowie der Bestrahlungsmethode abhängig. Die fraktionierte Bestrahlung stellt eine standardmäßige

Bestrahlungsmethode dar, welche eine bestmögliche Schonung des Normalgewebes gewährleistet. Unter Fraktionierung wird die Aufteilung einer Gesamtdosis in Einzeldosen über einen bestimmten Zeitraum verstanden.

Bereits Elkind und Sutton haben mit ihrem Schlüsselexperiment von 1960 den Effekt der Fraktionierung beschrieben (Abbildung 2). Sie haben zunächst das Überleben von Zellen nach einmaliger Applikation einer festgelegten Strahlendosis (Einzeitbestrahlung) gemessen. In einem zweiten Ansatz haben sie dieselbe Strahlendosis in zwei Einzelfraktionen, zwischen denen eine Strahlenpause von mehreren Stunden lag, aufgeteilt. Für die Zellen, die fraktioniert bestrahlt worden sind, ergab sich ein deutlicher Überlebensvorteil. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass Zellen in den Bestrahlungspausen die entstandenen Strahlenschäden reparieren können, so dass die Überlebensrate nach zwei Bestrahlungen deutlich höher liegt als nach einmaliger Bestrahlung mit insgesamt der gleichen Strahlendosis (Wannenmacher M. et al., 2006). Die fraktionierte Bestrahlung beruht dabei auf dem strahlenbiologischen Konzept, dass unter Fraktionierung die Reparaturkapazität der subletalen DNA-Schäden im Normalgewebe im Gegensatz zum Tumorgewebe deutlich effizienter vonstatten geht (Gregoire, 2005).

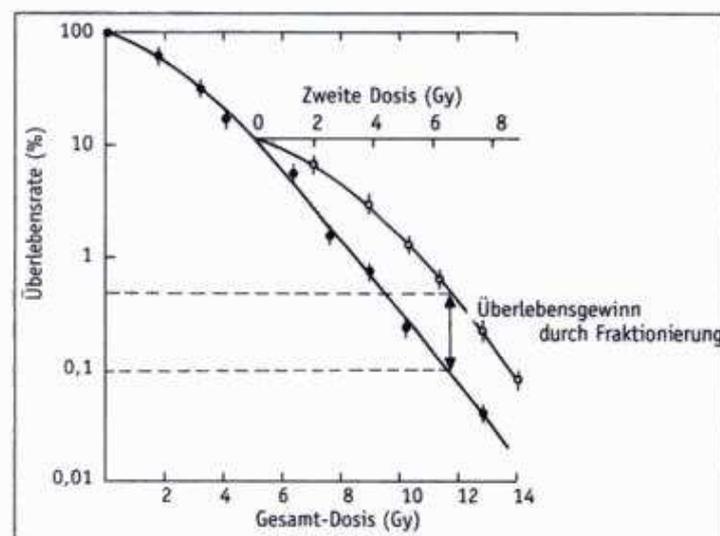


Abbildung 2: Effekt der Fraktionierung einer Dosis auf das Zellüberleben nach Elkind und Sutton 1960. Es wurden Zellen einmalig mit einer festgelegten Dosis bestrahlt und eine Überlebenskurve für diese Zellen erstellt. In einem zweiten Experiment wurden Zellen mit der gleichen Dosis, jedoch aufgeteilt in zwei Einzelfraktionen, bestrahlt. Es wurden den Zellen zwischen beiden Bestrahlungen Pausen von mehreren Stunden gegeben. Ergebnis des Experiments war, dass nach Aufteilung der Strahlendosis mehr Zellen überlebten als nach einmaliger Bestrahlung mit insgesamt derselben Dosis (Wannenmacher M. et al., 2006).

Die Applikation von Einzelfractionen von 1,8Gy bzw. 2Gy an fünf aneinander folgenden Tagen mit einer Strahlenpause am Wochenende ist in der klinischen Strahlentherapie das standardmäßige Vorgehen und wird als konventionelle Fraktionierung bezeichnet.

Zur Verbesserung der Effektivität einer fraktionierten Strahlentherapie wurden weitere experimentelle und retrospektive klinische Daten erhoben. Diese zeigen zum einen, dass mit Verkürzung der Gesamtbehandlungszeit (Akzelerierung) bei gleicher Gesamtdosis eine bessere Tumorwirksamkeit erzielt werden kann (Trott und Kummermehr, 1991). Andere Arbeiten erzielten eine bessere Tumorwirksamkeit, indem bei gleich bleibender Gesamtbehandlungszeit eine Steigerung der Gesamtdosis bei gleichzeitiger Reduktion der Dosis pro Fraktion (Hyperfraktionierung) vorgenommen wurde (Belani et al., 2005; Bourhis et al., 2006). Es ist jedoch bekannt, dass die fraktionierte Bestrahlung mittels Akzeleration oder Hyperfraktionierung mit schwereren Frühtoxizitäten einhergeht. Die Optimierung von Fraktionierungsschemata wird somit auch in Zukunft eine wichtige Rolle in der klinischen und experimentellen Strahlentherapie spielen, um ein best mögliches Gleichgewicht zwischen optimaler Tumorkontrolle und Schonung des Normalgewebes zu erreichen.

2.2. Zelluläre Schadensantwort

Die exakte Weitergabe der genetischen Information in Form von DNA an Folgegenerationen ist für das Überleben der Zelle essentiell. Bei diesem Prozess ist nicht nur die genaue DNA-Replikation und die Chromosomenverteilung, sondern auch die Fähigkeit spontane und programmierte DNA-Schäden zu überleben und diese minimieren zu können, eine wichtige Voraussetzung. In eukaryontischen Zellen existieren dafür sehr komplexe Mechanismen, die die Chromosomen überwachen und die Reparatur, den Zellzyklus sowie die Apoptose von geschädigten Zellen koordinieren bzw. einleiten können (Jackson, 2002). Diese hochkomplexen Mechanismen werden in ihrer Gesamtheit als zelluläre Schadensantwort bezeichnet. Die zelluläre Schadensantwort setzt sich aus Zellzyklus-Kontrollpunkten den sog. „Checkpoints“ sowie verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen zusammen, die im Fall von DNA-Schäden als Signaltransduktionskaskaden fungieren. Im Rahmen dieser Schadensantwort werden Signal-, Transduktor- und Effektorproteine unterschieden (Khanna und Jackson, 2001) (Abbildung 3), die durch die Aktivierung der Zellzyklus-Checkpoints koordiniert werden (Bartek und Lukas, 2001; Pearce und Humphrey, 2001).

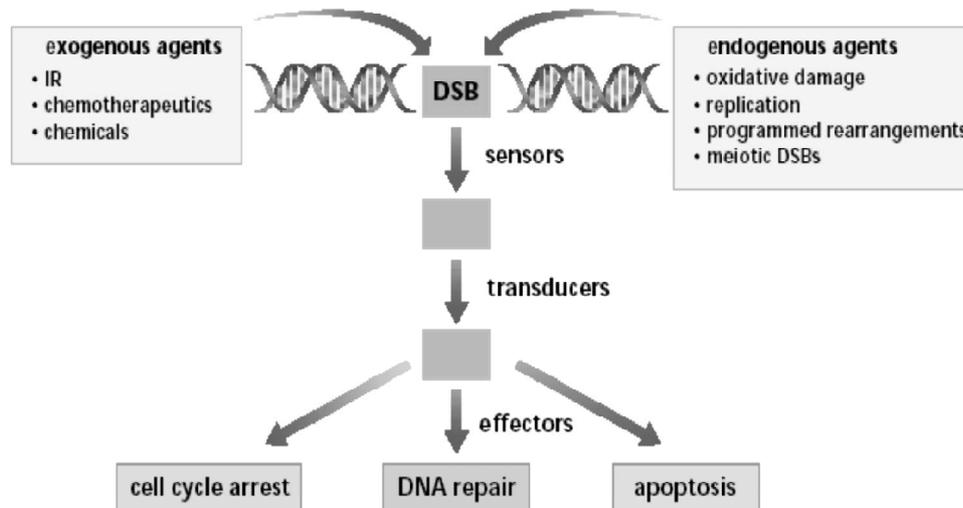


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Schadensantwort einer Zelle. Sensor-Proteine erkennen den DNA-Schaden. Transduktor-Proteine verstärken das DNA-Schadenssignal und leiten es an Effektor-Proteine weiter (Khanna und Jackson, 2001).

Die zelluläre Schadensantwort einer Zelle sorgt dafür, dass DSBs durch bestimmte Sensor-Proteine, welche den Bruch selbst oder Veränderungen an der DNA wahrnehmen, erkannt werden. Ist ein DSB durch Sensorproteine detektiert, wird eine Signalkaskade eingeleitet, in der das Schadenssignal durch Phosphorylierungsreaktionen über Transduktorproteine an Effektor-Proteine weitergeleitet wird. Die Effektoren, zu denen Zellzykluskontrollproteine und Reparaturproteine gehören, führen dazu, dass eine geschädigte Zelle in den Zellzyklusarrest geht, um die Vervielfältigung genetisch fehlerhafter Informationen zu vermeiden. Somit können spezielle Reparaturmechanismen den Schaden beheben, bevor die DNA durch DNA-Polymerasen repliziert wird. Kommt es zu irreparablen Schäden an der DNA, so wird die Eliminierung der Zelle durch die Apoptose eingeleitet (Bakkenist und Kastan, 2004; Shiloh, 2003).

In Säugerzellen spielen die Proteinkinasen ATM und die DNA-PK bedeutende Funktionen in der frühen Signaltransduktion.

2.2.1. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)

Eines der wichtigsten Sensor- und Transduktor-Proteine in der zellulären Schadensantwort ist die Proteinkinase ATM - Ataxia telangiectasia mutated.

Die genetische Information für ATM ist auf Chromosom 11q22-23 lokalisiert. Das ATM-Gen besitzt eine Größe von 160 Kilobasen und umfasst ein codierendes Transkript von 13

Kilobasen (Savitsky et al., 1995). Das ATM-Gen codiert für eine 350kDa große Proteinkinase, die im Carboxyl (C)-Terminus eine Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase-Domäne besitzt. Aufgrund dieser Eigenschaft gehört die Proteinkinase ATM zur Familie der Phosphatidylinositol-Kinase-ähnlichen-Kinasen (PIKK). Die Proteinkinase ATM besitzt eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität und ist in der Lage, andere Proteine zu phosphorylieren, wodurch ATM das DNA-Schadenssignal der Sensorproteine in biochemische Modifikationen übersetzt (Canman und Lim, 1998).

In unbestrahlten Zellen liegt ATM als inaktiver Dimer- oder Multimerkomplex vor (Prokopcova et al., 2007). Durch Induktion von strahleninduzierten DSBs kommt es zu einem schnellen Anstieg der ATM-Kinase-Aktivität. Die ATM-Aktivierung erfolgt unter anderem durch eine intermolekulare Autophosphorylierung, in dessen Folge die ATM-Dimere auseinander dissoziieren und die Kinase-Domäne für andere Substrate zugänglich ist (Bakkenist und Kastan, 2003). Während der intermolekularen Autophosphorylierung ist die Kinase-Untereinheit eines ATM-Moleküls in der Lage, ein mit ihm interagierendes ATM-Molekül an den Serinresten Ser1981, Ser1893 und Ser367 zu phosphorylieren (Kozlov et al., 2006). Dabei führt die Autophosphorylierung an Ser 1981 zur Spaltung der inaktiven ATM-Moleküle (Kozlov et al., 2006).

Für die Aktivierung von ATM scheint neben der Autophosphorylierung der Mre11-Rad50-NBS1/XRS2-Komplex (MRN-Komplex) eine entscheidende Rolle zu spielen. Der MRN-Komplex besteht aus Nukleasen, die nach Induktion von strahleninduzierten DSBs diese als erste erreichen und prozessieren können. Er fungiert als ein Sensorkomplex für ATM, in dessen Rolle er ATM zum DSBs rekrutiert und aktiviert (Lee und Paull et al., 2005; Uziel T, 2003).

hierbei spielt ATM eine entscheidende Rolle. Die Substrate von ATM besitzen somit eine zentrale Funktion in der DSB-Reparatur, der Zellzykluskontrolle sowie Einleitung der Apoptose (Lavin, 2008).

2.2.2. DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK)

Die DNA-PK ist eine 470 kDa große Serin/Threonin-Kinase und gehört wie ATM zur Familie der PIKK (Shiloh, 2006; Yang J, 2003). Die DNA-PK setzt sich aus zwei regulatorischen Untereinheiten, bestehend aus Ku70/Ku80 sowie einer katalytischen Domäne zusammen (Smith et al., 1999).

Die DNA-PK übernimmt unter anderem eine zentrale Funktion im Nicht-homologen Endjoining (NHEJ), welches in Säugerzellen der vorherrschende Mechanismus zur Reparatur von DSB ist. Werden DSBs durch z.B. ionisierende Strahlung induziert, so lagert sich zunächst der Heterodimerkomplex Ku70/Ku80 an die gebrochenen DNA-Enden an. Daraufhin assoziiert die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) mit Ku-gebundener DNA und bildet das aktive DNA-PK-Holoenzym (Chan et al., 2002). Aber auch in Abwesenheit von Ku kann die DNA-PK an freie DNA-Enden binden und damit aktiviert werden (Hammarsten und Chu, 1998). Die Bindung der DNA-PKcs verhindert den Angriff der DSB-Enden durch Enzyme und Ligasen und übt somit eine gewisse Schutzfunktion aus. Befinden sich die DSBs in ausreichender Nähe zueinander, wird die Serin/Threonin-Kinase-Aktivität aktiviert und die Autophosphorylierung der DNA-PKcs induziert. Dies führt zu einer Konformationsänderung, wodurch die DSB-Enden für prozessierende Enzyme und Ligasen zugänglich werden (Chan et al., 2002; Douglas et al., 2002; Ding et al., 2003). Defekte einzelner Komponenten der DNA-PK führen zu einer unzureichenden DSB-Reparatur und somit zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit des Organismus (Smith et al., 1999; Lou et al., 2004).

Des Weiteren übernimmt die DNA-PK eine wichtige Funktion in der VDJ- Rekombination (Mahaney et al., 2009). Die Kinase phosphoryliert Artemis, ein Protein, welches während der VDJ- Rekombination die entstandenen Haarnadelstrukturen öffnet. Es wird vermutet, dass die Autophosphorylierung der DNA-PKcs eine Konformationsänderung bewirkt, die das Auflösen der entstandenen Holyday-Junctions durch Artemis triggert (Goodarzi et al., 2006).

2.2.3. H2AX und seine Modifikation

H2AX ist ein Mitglied der Histonfamilie H2A und konnte im Jahr 1980 mittels Gelelektrophorese erstmalig nachgewiesen werden (West und Bonner, 1980).

Ein Nucleosom, welches die kleinste Verpackungsebene eukaryontischer DNA darstellt, besteht aus jeweils zwei Proteinen der Histonfamilien H2A, H2B, H3 und H4. Die Mitglieder der Histonfamilien H2B, H3 und H4 unterscheiden sich nur gering in ihrer Aminosäuresequenz. Die Histonfamilie H2A kann hingegen in drei Subfamilien H2A1-H2A2, H2AZ und H2AX unterteilt werden (Redon et al., 2002). H2AX setzt sich aus einer hoch konservierten Aminosäuresequenz am C-terminalen Histonende, bestehend aus Serin, Glutamin und Glutaminsäure (Ser-Gln-Glu) zusammen (Mannironi et al., 1989). In Säugetierzellen nimmt das Serin in diesem Motif die Position 139 ein.

Fast 20 Jahre später gelang der Nachweis, dass H2AX durch Induktion von DSBs posttranslational modifiziert wird. Durch Massenspektrometrie konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der Phosphorylierung von H2AX, um so genanntes γ H2AX handelt (Rogakou et al., 1997). Die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX am Serinrest 139 ist ein früher Schritt in der zellulären Antwort nach Induktion von DSBs in der Zelle (Modesti und Kanaar, 2001; Stiff et al., 2004). Diese Phosphorylierung wird von den Enzymen ATM (Burma et al., 2001; Fernandez-Capetillo et al., 2002), ATR (Ward und Chen, 2001; Furuta et al., 2003) und der DNA-PK (Park et al., 2003; Stiff et al., 2004) katalysiert. Dabei ist die DNA-PK in der Lage, H2AX in Abwesenheit von ATM zu phosphorylieren (Shirvastav et al., 2008). Nach Induktion eines DSB werden hundert bis tausend γ H2AX-Moleküle, die sich über einen Bereich von mehreren Megabasenpaaren auf der DNA erstrecken, gebildet (Rogakou et al., 1999). Bereits eine Minute nach Induktion von strahleninduzierten DSBs lassen sich γ H2AX-Moleküle nachweisen (Rogakou et al., 1997).

Aus der zeitlich frühen Phosphorylierung nach Induktion von DSBs wurde zunächst geschlossen, dass γ H2AX eine bedeutende Funktion in der Rekrutierung von Signal- und Schlüsselproteinen, die in der DNA-Schadensantwort beteiligt sind, zukommt (Paull et al., 2001). Neuere Studien belegen jedoch, dass die Rekrutierung von Schlüsselenzymen unabhängig von γ H2AX erfolgt (Celeste et al. 2003). Experimente an H2AX defizienten Mäusen (H2AX^{-/-}) zeigen, dass γ H2AX für die DSB-Reparatur an sich entbehrlich, jedoch für eine effiziente Reparatur nötig ist. H2AX defiziente Tiere weisen große chromosomale Rearrangements auf, welche mit einer deutlich erhöhten Tumorneigung einhergehen (Downey

und Durocher, 2006). Celeste et al. 2003 gehen davon aus, das γ H2AX nicht das primäre Schadenssignal ist, sondern als eine Art „Plattform“ für die Akkumulation und die Retention von Signal- und Schlüsselproteinen am DSB fungiert.

Die Akkumulation von γ H2AX-Molekülen an DSBs kann unter Verwendung bestimmter Antikörper mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden, wodurch die γ H2AX-Moleküle im Zellkern als hell leuchtende Foci erscheinen. Erste Studien zur γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung waren in der Lage, strahleninduzierte DSBs nach Bestrahlungsdosen von 0,6Gy zu messen (Rogakoua et al., 1999). Dabei wird angenommen, dass jeder Focus einen individuellen Bruch und dass sich jeder DSB als Focus darstellt (Rothkamm und Löbrich, 2003; Sedelnikova et al., 2002). Ist ein DSB durch spezielle DNA-Reparaturmechanismen behoben, so „verschwindet“ der γ H2AX-Focus im Zellkern. Die γ H2AX-Focireduktion ist bis zum heutigen Stand der Wissenschaft nicht eindeutig geklärt. Einige Autoren vertreten die Ansicht, dass γ H2AX durch die Phosphatase 2A dephosphoryliert wird und somit der Bruch nicht mehr als Focus erkennbar ist (Chowdhury et al., 2005).

2.2.4. p53 bindendes Protein (53BP1)

53BP1 wurde als ein Protein identifiziert, welches an das Tumorsuppressorgen p53 bindet (Iwabuchi et al., 1994) und als ein Schlüsselprotein innerhalb der zellulären Schadensantwort nach ionisierender Strahlung fungiert. 53BP1 besteht aus einer Tudor-Domäne und zwei Brca1 C-terminalen (BRCT) Domänen. Nach Induktion von strahleninduzierten DNA-Schäden ermöglicht die Tudor-Domäne von 53BP1 die Interaktion zwischen p53 und 53BP1, wodurch der p53-53BP1 Komplex an die gebrochenen DNA-Enden binden kann und somit die Transkription von p53 aktiviert (Huang et al., 2007). Die Akkumulation von p53 durch aktivierende Signale beruht hauptsächlich auf posttranslationalen Mechanismen, die die Halbwertszeit des Proteins deutlich erhöhen und die die latente Form des p53 in eine aktive Form überführen (Bayle et al., 1995; Wolkowicz et al., 1995). Die Aktivierung von p53 nimmt einen wichtigen Einfluß auf die DNA-Reparatur durch Interaktion mit Komponenten der Homologen Rekombination (HR) (Stürzbecher et al., 1996) und des Nicht-homologen Endjoinings (NHEJ) (Tang et al., 1998; Wang et al., 2000). p53 ist ebenfalls ein Signalprotein in der Apoptoseinduktion (Symonds et al., 1994; Polyak et al., 1997).

Mittels spezifischer Antikörper ist es möglich 53BP1-Moleküle, die sich an DSBs befinden, sichtbar zu machen. Dabei konnte eine Kolo-kalisation zwischen γ H2AX- und 53BP1-Foci nach Induktion von strahleninduzierten DSBs gefunden werden (Schultz et al., 2000; DiTullio

et al., 2002; Adams und Carpenter, 2006), so dass 53BP1 neben γ H2AX einen weiteren signifikanten Biomarker für DSBs darstellt.

2.3. DNA-Doppelstrangbrüche und deren Reparatursysteme

2.3.1. DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs)

DNA-DSBs entstehen, indem es zu einem Bruch des Zucker-Phosphat-Gerüsts an beiden Strängen der DNA-Doppelhelix in enger Nachbarschaft kommt, wodurch die kovalente Basenpaarung unterbrochen wird. Die Entstehung eines DNA-DSB ist für die Zelle besonders gefährlich, weil dies zum Zelltod oder zur Entstehung von malignen Tumoren beitragen kann, wenn der DSB nicht oder nur fehlerhaft repariert werden kann (Khanna und Jackson, 2001). Schon ein einziger DSB kann den Tod einer Zelle zur Folge haben (Olive, 1998), wenn er essentielle Gene der Zelle inaktiviert und den programmierten Zelltod einleitet (Rich et al., 2000).

DNA-DSBs werden zu einem großen Anteil durch physikalische Einflüsse wie Röntgenstrahlung (Olive et al., 1990; Olive und Banath, 1993) und Gamma-Strahlung (Ostling und Johanson, 1987; Vijayalaxmi et al., 1993), sowie durch UV-Strahlung (Gedik et al., 1992; Arlett et al., 1993; Green et al., 1994) oder durch chemische Substanzen (Povirk et al., 1977) verursacht. Aber auch in physiologischen Zellprozessen wie z.B. während der Meiose werden DSBs induziert (Haber, 2000), um eine genetische Vielfalt gewährleisten zu können. Im Rahmen des oxidativen Stoffwechsels entstehen durch die Bildung von freien Radikalen ebenfalls DSBs.

Findet die Reparatur von DSBs nicht oder nur fehlerhaft statt, so kann es zu chromosomalen Änderungen wie Translokationen, Inversionen oder Deletionen kommen, was die Entstehung von malignen Tumoren begünstigen kann (Hoeijmakers, 2001; Van Gent et al., 2001). Solche chromosomalen Aberrationen stellen eine der wichtigsten biologischen Folgen von ionisierender Strahlung dar (Obe et al., 2002).

Die Reparatur von DSBs wird in eukaryontischen Zellen durch zwei Reparaturmechanismen gewährleistet. Zu diesen DSB-Reparaturmechanismen gehören die Homologe Rekombination und das Nicht-homologe Endjoining (Haber, 2000; Khanna und Jackson, 2001; Jackson, 2002).

2.3.2. Homologe Rekombination (HR)

Die Homologe Rekombination ist ein Reparaturmechanismus, der während der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus stattfindet und ein relativ fehlerfreier Reparaturmechanismus ist. Während der Homologen Rekombination dienen homologe Sequenzen (Schwesterchromatid, homologe Chromosomen) als Vorlage für die Reparatur der DSBs. Voraussetzung für die Reparatur von DSBs im Rahmen der Homologen Rekombination ist die Prozessierung der DNA-Enden in 5`-3`-Richtung. Für die Prozessierung der gebrochenen DNA-Enden existiert beim Menschen ein Komplex aus Rad50, MRE11 und NSB1/XRS2 (MRN-Komplex) (Jackson, 2002). Die daraus resultierenden 3`DNA-Enden werden von dem Replikationsprotein A gebunden. In einer nachfolgenden Reaktion wird das Replikationsprotein A durch Rad51 ersetzt. Katalysiert wird dieser Schritt durch Rad52, zwei Rad51 Paraloge, Rad55 und Rad57. Das entstandene Rad51 Nucleoproteinfilament interagiert mit dem unbeschädigten DNA-Molekül. Es lokalisiert homologe Sequenzen auf der Duplex-DNA und dringt in diese ein. Dieser Schritt wird durch Rad54 katalysiert. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase werden die Informationen der Duplex-DNA kopiert und an das 3`Ende des beschädigten DNA Stranges angehängt. Anschließend werden die Enden durch die Ligase I ligiert, so dass am Ende der Homologen Rekombination zwei intakte DNA-Moleküle resultieren (Shirvastav et al., 2008).

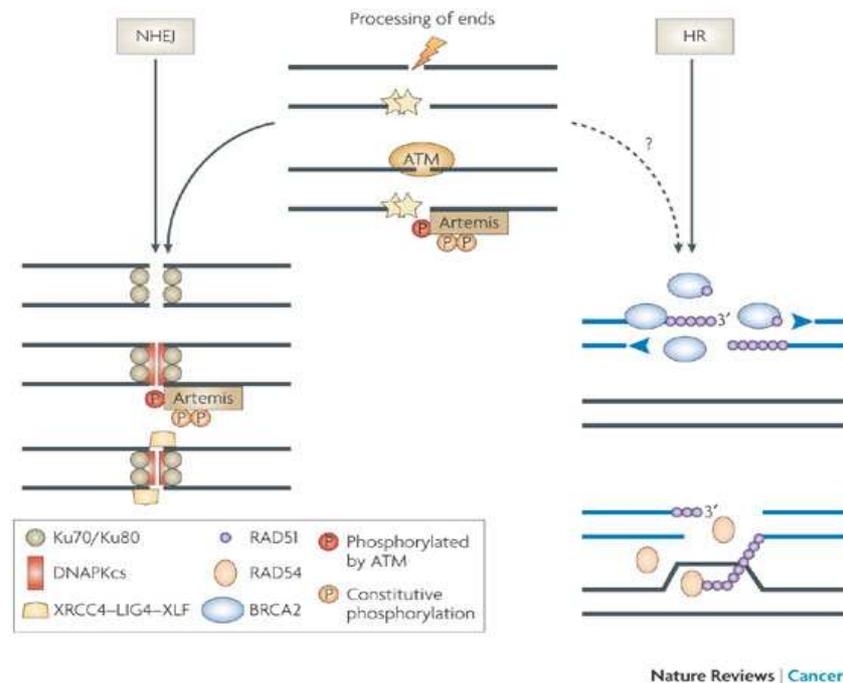


Abbildung 5: Nicht-homologes Endjoining und Homologe Rekombination: Beim NHEJ bindet initial der Heterodimer-Komplex Ku70/Ku80 an die gebrochenen DNA-Enden. Anschließend wird die DNA-PKcs zum DSB rekrutiert. Die DNA-PKcs ihrerseits rekrutiert und phosphoryliert die Reparaturproteine XRCC4, DNA Ligase IV und XLF. Diese Proteine sind für die Ligation der Bruchenden nötig. ATM besitzt ebenfalls eine Schlüsselfunktion im NHEJ. Es aktiviert die Nuklease Artemis und repariert auf diesem Weg ca. 10% der entstandenen DSBs. Die Homologe Rekombination wird durch Rad51 assoziierte Proteine vermittelt, zu denen Rad51 Paraloge sowie Rad52, die Rad54-Helikase und BRCA gehören. Nach Prozessierung der DNA-Bruchenden interagiert das entstandene Rad51 Nucleoproteinfilament mit einer unbeschädigten Duplex-DNA und lokalisiert dort homologe Sequenzen, die als Kopie für den DSB dienen (Löbrich und Jeggo, 2007).

2.3.3. Nicht-Homologes Endjoining (NHEJ)

Das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ) ist der Reparaturmechanismus in Säugerzellen, der den größten Anteil an DSBs repariert. Das NHEJ findet hauptsächlich in der G₀- und G₁-Phase des Zellzyklus statt. Dabei werden die gebrochenen DSB-Enden in kompatibler Form End-zu-End verknüpft. Da die durch ionisierende Strahlung entstandenen DSBs meist keine sauberen Bruchenden aufweisen, sind Prozessierungen der Bruchenden durch Nukleasen und Polymerasen notwendig. Für die Bearbeitung der Bruchenden müssen sich diese in räumlicher Nähe zueinander befinden. Dies wird durch die DNA-PKcs gewährleistet. Die DNA-PKcs assoziiert mit dem Protein-Heterodimer-Komplex Ku70/Ku80, welcher initial an die DSB-Enden bindet und bringt so die DSB-Enden in räumliche Nähe zueinander (Weterings und Chen, 2008). Nachdem die DNA-PKcs an die DNA gebunden hat, aktiviert sie sich selbst

durch Autophosphorylierung. In diesem Zustand ist die DNA-PKcs in der Lage, weitere DSB-Reparaturfaktoren wie Artemis, den XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex und XLF an den DSB zu rekrutieren (Iijima et al., 2008). Auf diesem Weg werden ca. 80-90% der strahleninduzierten DSBs repariert. Es wird auch vom schnellen ATM-unabhängigen Reparaturweg gesprochen (Löbrich und Jeggo, 2005).

Ein weiteres entscheidendes Schlüsselenzym des NHEJ ist ATM. In der aktivierten Form besitzt das Protein eine Reihe von Substraten, die es phosphoryliert und damit aktiviert. Unter den ATM-Substraten befinden sich Schlüsselenzyme der DSB-Reparatur wie H2AX, MDC1, NFBP1, 53BP1, BRCA1, SMC1 und Artemis (Löbrich und Jeggo, 2005). Durch die Aktivierung bzw. Phosphorylierung der Nuklease Artemis werden ca. 10% der strahleninduzierten DSBs repariert. Dabei wird auch vom langsamen und ATM-abhängigen Reparaturmechanismus im Rahmen des NHEJ gesprochen (Riballo et al., 2004). Sind die DSB-Enden prozessiert, werden die kompatiblen Enden durch den XRCC4-Ligase-IV-Komplex aneinander gefügt (Weterings und Chen, 2008).

Das Vorliegen gestörter Reparaturmechanismen führt letztendlich entweder zum Zelltod oder zu Chromosomeninstabilitäten wie Deletionen, Translokationen oder zur Fusion von Chromosomen, welche die Basis für Mutationen und damit für nicht kontrolliertes Zellwachstum bzw. maligne Tumoren darstellen (Pollard und Gatti, 2009).

2.4. Syndrome mit eingeschränkter DSB-Reparaturkapazität

2.4.1. Ataxia telangiectasia (AT)

Ataxia telangiectasia (AT) ist eine sehr seltene autosomal rezessiv vererbte neurodegenerative Erkrankung mit einer Inzidenz von ca. 1:40 000 (Wallesch, 2005). Der zu Grunde liegende Defekt betrifft das ATM Protein, welches, wie bereits beschrieben, wichtige Funktionen im NHEJ und in der Zellzykluskontrolle übernimmt.

Der Genort des ATM Proteins befindet sich auf Chromosom 11q22-23. Bis zum heutigen Stand der Wissenschaft sind über 400 Mutationen im ATM Gen bekannt. Davon entfallen ca. 80% auf Nullmutationen, die zu einem trunkierenden ATM Protein führen. Ca. 15% der ATM Mutationen basieren auf „missense“ Mutationen, „frameshift“ Deletionen oder Insertionen (Mavrou et al., 2008).

Patienten, die einen homozygoten Defekt im ATM-Gen aufweisen, werden bereits im Kindesalter klinisch auffällig. Die Erkrankung äußert sich meist im Alter von zwei bis drei Jahren mit beginnenden Koordinationsstörungen. Zerebelläre Ataxien führen dazu, dass die betroffenen Kinder im Alter von ca. 10 Jahren rollstuhlpflichtig werden. Häufig wird erst in diesem Stadium der Erkrankung die Diagnose der Ataxia telangiectasia gestellt. In Magnet-Resonanz-Tomographie-Aufnahmen zeigen sich dann deutliche Atrophien des Zerebellums (Mavrou et al., 2008). Ein weiteres klinisches Symptom, welches der Krankheit ihren Namen verleiht, sind okulokutane Teleangiectasien im Bereich der Skleren, des Gesichtes und der Ohren. Neben diesem sehr charakteristischen Symptom der Erkrankung werden die Kinder durch progrediente Augenbewegungsstörungen, hypotone Facies, Wachstumsstörungen, greisenhafte Veränderungen von Haut und Haar sowie Fehlen oder Dysplasie des Thymus auffällig. Der das Immunsystem betreffende Defekt ist bei AT-Patienten sehr variabel. Er manifestiert sich hauptsächlich in niedrigen oder gänzlich fehlenden IgA-, IgE- und IgG2-Spiegeln. AT-Patienten besitzen des Weiteren ein deutlich erhöhtes Risiko an malignen Tumoren zu erkranken. Das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines Tumors liegt bei AT-Patienten zwischen 30-40%. In den ersten 15 Lebensjahren treten gehäuft Tumore auf, die das Immunsystem betreffen (Meyn, 1999). Im höheren Lebensalter verlagert sich das Gewicht auf chronische T-Zell Leukämien und solide Tumore (Meyn, 1999). AT-Patienten zeigen weiterhin eine deutlich erhöhte Strahlenempfindlichkeit, weshalb eine strahlentherapeutische Behandlung keine Therapiealternative darstellt. Aufgrund von rezidivierenden bronchopulmonalen Erkrankungen, Störungen im Schlucken und Kauen und dem Auftreten von malignen Tumoren beträgt das mediane Überleben dieser Patienten ca. 20 Jahre (Wallesch, 2005).

2.4.2. AT-Heterozygotie

Heterozygote Mutationsträger des ATM Gens entwickeln keine AT typischen Krankheitssymptome aus und sind somit klinisch unauffällig. Sie scheinen aber ein erhöhtes Risiko zu besitzen, Tumore im Laufe ihres Lebens zu entwickeln. Der Brustkrebs gehört dabei zu den am besten untersuchten soliden Tumoren. Es wird angenommen, dass das relative Risiko für die Entstehung von Brustkrebs bei heterozygoten AT-Merkmalsträgerinnen (ATM^{+/-}-Trägerinnen) um das dreifache erhöht ist. Für bestimmte AT-Mutationen ist sogar davon auszugehen, dass das Risiko um 9- bis 16fach erhöht ist (Broeks, 2000; Chenevix-Trench, 2002). Dabei kann zwischen trunkierenden Mutationen, die zu einem völligem

Funktionsverlust des betroffenen ATM Proteins führen und Missense-Mutationen unterschieden werden. Bei Missense-Mutationen kann das mutierte ATM Gen einen dominant-negativen Effekt ausüben, was zu einer fehlerhaften ATM Funktion führt (Chenevix-Trench, 2002; Gatti, 1999; Scott, 2002).

Nach Bestrahlung von Lymphozyten heterozygoter ATM-Mutationsträger zeigen diese erhöhte Strahlenempfindlichkeit in Form von chromosomalen Abberationen und komplexen Rearrangements, welche Ausdruck einer eventuell gesteigerten Strahlensensibilität sind (Neubauer, 2002; West, 1995). Diese Beobachtungen sind von erheblicher Relevanz, da die Prävalenz bei heterozygoten ATM^{+/-}-Merkmalsträgern in Deutschland mit ca. 1% deutlich erhöht ist (Dörk, 2002). In der Literatur wird die klinische Strahlensensibilität von ATM^{+/-}-Merkmalsträgern jedoch kontrovers diskutiert. In Studien zu heterozygoten ATM-Genträgern konnte ein vermehrtes Auftreten von kutanen und subkutanen Spättoxizitäten nach Bestrahlung gefunden werden (Iannuzzi et al., 2002). Iannuzzi et al. analysierte 46 Brustkrebspatientinnen, welche nach brusterhaltender Therapie eine postoperative adjuvante Bestrahlung erhalten haben. Unter diesen Patientinnen waren sechs Trägerinnen einer heterozygoten ATM Mutation, von denen drei Patientinnen ausgesprochene subkutane Spättoxizitäten entwickelten. Bei einer dieser Patientinnen hatte dies die Ablatio der Brust zur Folge. Aufgrund ihrer Beobachtungen sahen die Autoren eine relative Kontraindikation in der Durchführung einer Strahlentherapie bei heterozygoten ATM^{+/-}-Merkmalsträgern. Ebenso berichtet Varghese et al. 1999 über ausgeprägte subkutane Spätnebenwirkungen bei ATM^{+/-}-Merkmalsträgern in Form von Induration, Ödembildung und narbiger Retraktion. Eine weitere klinischen Studie postuliert den Zusammenhang zwischen heterozygoten ATM-Mutationen und rektalen Blutungen bei Prostatakarzinom-Patienten, die mit einer Brachytherapie mit Iod-125-behandelt worden sind (Cesaretti, 2005).

2.4.3. Schwere kombinierte Immundefekte (SCID)

Die Abkürzung SCID steht stellvertretend für schwere kombinierte Immundefekte, die je nachdem welches Protein betroffen ist, ganz unterschiedliche phänotypische Erscheinungen annehmen können. In der Normalbevölkerung liegt die Inzidenz von SCID bei ca. 1:75 000.

2.4.3.1. Radiosensitive SCID-Form beim Menschen (RS-SCID)

Die radiosensitive SCID-Form beim Menschen, genannt RS-SCID, ist durch einen Defekt in der VDJ-Rekombination und in der DNA-Reparatur gekennzeichnet. Ursprünglich wurde die radiosensitive SCID-Form bei den amerikanischen Ureinwohnern der Navajo-Indianer und der Apachen identifiziert. Die Inzidenz unter den amerikanischen Ureinwohnern für RS-SCID liegt bei ca. 1:2 000 (Correlagen-Diagnostics, 2006). Das betroffene Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 lokalisiert und codiert für das Protein Artemis (O'Driscoll et al., 2004). Durch einen Defekt in der B- und T-Zellreifung ist das Immunsystem der betroffenen Patienten nicht in der Lage virale, bakterielle sowie parasitäre Infektionskrankheiten abzuwehren, so dass der Tod meist in den ersten Lebensjahren eintritt (Moshous et al., 2001).

2.4.3.2. Radiosensitive SCID-Form bei Mäusen (RS-SCID)

Der in der Arbeit verwandte Mausstamm mit RS-SCID wurde ursprünglich von Dr. M. J. Bosma im Fox Chase Center in Philadelphia, Pennsylvania 1980 nachgewiesen. Das für diese Mutation verantwortliche Gen befindet sich auf Chromosom 16 in der Nähe des Centromers und codiert für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs). Die für die Untersuchung verwandten Tiere waren für diese Mutation homozygot. Die DNA-PKcs übernimmt, wie bereits beschrieben, grundlegende Aufgaben im NHEJ und in der VDJ-Rekombination. Der Immundefekt betrifft bei dieser radiosensitiven SCID-Form sowohl die B- als auch die T-Zellen. Andere Blutzellen, wie Natürliche Killerzellen, Makrophagen und Granulozyten, sind nicht involviert. Das Immunsystem der Tiere ist kaum in der Lage funktionstüchtige Immunglobuline und T-Zellrezeptoren herzustellen. Aufgrund dessen manifestiert sich diese SCID-Mutation in der Ausbildung von Lymphomen, Agammaglobulinämien und in einer sehr hohen Infektanfälligkeit (Charles River, 2004).

2.5. Fragestellungen

Der Erkennung und der Reparatur von DSBs scheinen genetisch determinierte Faktoren zu Grunde zu liegen. So weisen Patienten mit ein und derselben strahlentherapeutischen Behandlung individuell sehr unterschiedliche Nebenwirkungen im Normalgewebe auf. Die genetisch festgelegten DSB-Reparaturkapazitäten scheinen die verschieden stark ausgeprägten Radiosensitivitäten der Patienten zu bestimmen. In einem präklinischen Modell wurden Mausstämme mit unterschiedlichen DSB-Reparaturkapazitäten auf die Induktion und die Reparatur von strahleninduzierten DSBs nach Einzeitbestrahlung und fraktionierter Bestrahlung analysiert. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Welche Auswirkung hat die genetisch determinierte DSB-Reparatureinschränkung hinsichtlich der Induktion und der Reparatur von DSBs bei heterozygoten $ATM^{+/-}$ -Mäusen nach Einzeitbestrahlung?
2. Welche Auswirkungen haben die DSB-Reparaturkapazitäten Reparatur profizienter und defizienter Mäuse hinsichtlich der Induktion und der Reparatur strahleninduzierter DSBs nach fraktionierter Bestrahlung?
3. Existieren gewebespezifische Unterschiede in der Reparatur von strahleninduzierten DSBs?

3. Material und Methoden

3.1. Tiere

3.1.2. AT-Zucht

Der untersuchte $ATM^{+/-}$ -Mausstamm (129S6/SvEvTac- $Atm^{tm1Awb/J}$) wurde von Jackson Laboratory bezogen. Dieser Mausstamm besitzt eine trunkierende Mutation im ATM-Gen, die durch Insertion einer Phosphoglycerinkinase-Neomycin Cassette an Position 5979 des ATM-Gens generiert wurde.

3.1.3. Genotypisierung

Die Genotypisierung der AT-Mäuse ($ATM^{+/+}$ versus $ATM^{+/-}$ -Maus) erfolgte mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR) in einem LightCycler[®] System. Zur Vorbereitung der Realtime-PCR wurde das jeweilige Gewebe (Leber, Schwanzspitze) nach dem Protokoll DNeasy 96 (Qiagen 2007) lysiert und die DNA extrahiert.

Die im Anschluss daran durchgeführte Realtime-PCR bezeichnet ein Verfahren, bei dem die entstandene DNA in Echtzeit gemessen wird. Die Auswertung der in Echtzeit gemessenen DNA wird anhand von Amplifikationskurven durchgeführt, wodurch die genaue Zuordnung zum $ATM^{+/+}$ oder $ATM^{+/-}$ -Genotyp gewährleistet ist. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen exemplarisch Amplifikationskurven eines $ATM^{+/-}$ - (rote Kurve) und eines $ATM^{+/-}$ -Genotyps (grüne Kurve). Zunächst wurde die Realtime-PCR mit den ATM-Mutations-Primern (Neo Generic Primern) durchgeführt (Abbildung 6). Im dargestellten Beispiel weist die DNA, die als grüne Kurve dargestellt ist, verstärkt Fluoreszenz auf, was darauf hindeutet, dass die DNA dieser Maus ATM-Mutationen enthält. In einem zweiten Ansatz wurde die Realtime-PCR mit den ATM-Wildtyp-Primern durchgeführt (Abbildung 7). Im Beispiel zeigen sowohl die DNA, die als grüne Kurve als auch die DNA, die als rote Kurve dargestellt ist, verstärkt Fluoreszenz auf. Dies deutet darauf hin, dass die DNA dieser beiden Mäuse ATM-Mutationen enthält. Dem entsprechend repräsentiert die grüne Kurve einen $ATM^{+/-}$ - und die rote Kurve einen $ATM^{+/+}$ -Genotyp.

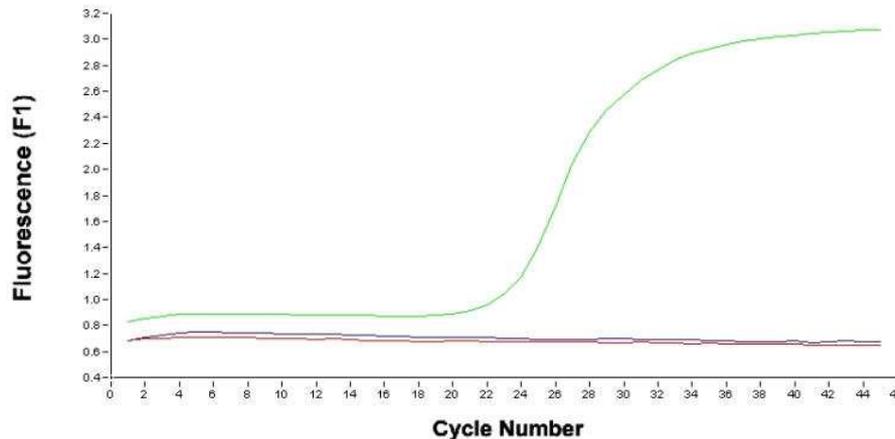


Abbildung 6: Beispiel für eine Amplifikationskurve unter Verwendung der Neo Generic Primer. Die grüne Kurve weist verstärkt Fluoreszenz auf, was darauf hindeutet, dass die DNA dieser Leber ATM-Mutationen enthält. Die rote Kurve zeigt während der gesamten Real-Time-PCR keine verstärkte Fluoreszenz und enthält demnach keine ATM-Mutationen. Die violette Kurve stellt die Kontrolle mit Wasser dar.

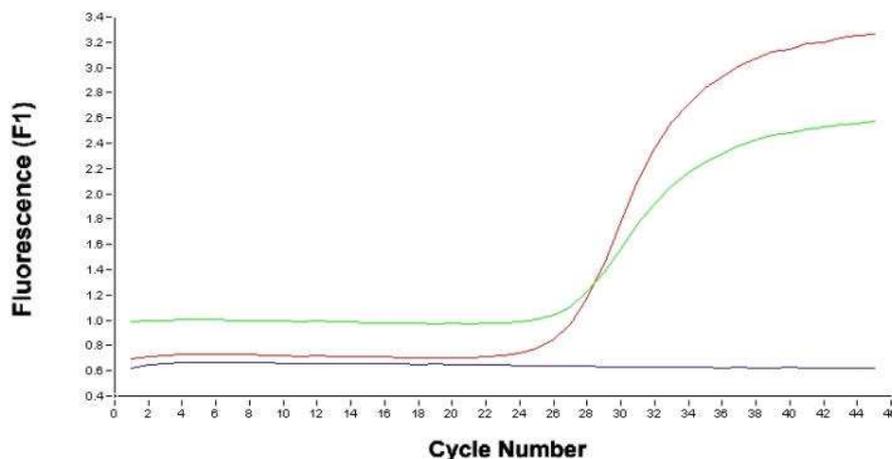


Abbildung 7: Beispiel für eine Amplifikationskurve unter Verwendung der Wildtyp-Primer. Die rote Kurve und die grüne Kurve weisen verstärkt Fluoreszenz auf, was darauf hindeutet, dass die DNA dieser beiden Mäuse Wildtyp-Gene trägt. Die violette Kurve stellt die Kontrolle mit Wasser dar.

Im Anschluss an jede Realtime-PCR wurde von jeder amplifizierten DNA-Menge eine Schmelzkurve erstellt, indem während eines langsamen Temperaturanstieges die Abnahme der Fluoreszenz gemessen wurde (Abbildung 8). Hintergrund dessen ist die Tatsache, dass während jeder PCR Primerdimere entstehen können, die nicht von den gewünschten Amplikons unterschieden werden können. Primerdimere besitzen jedoch im Vergleich zu den Amplikons eine geringere Schmelztemperatur.

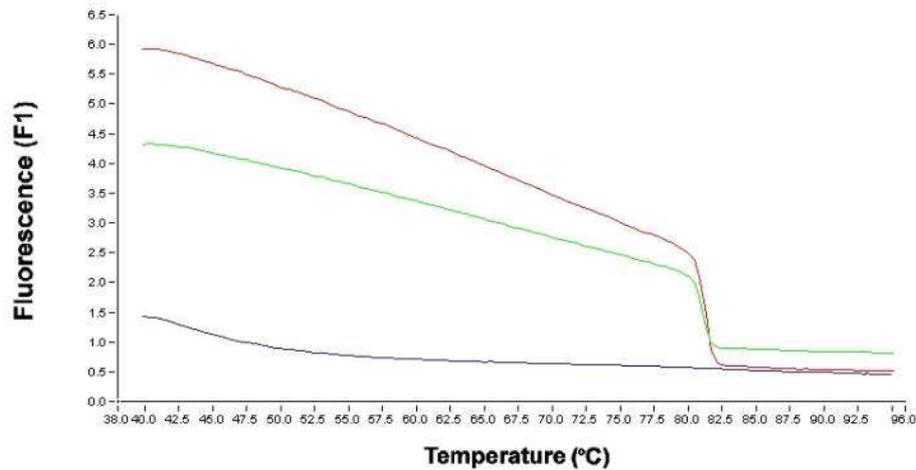


Abbildung 8: Beispiel für eine Schmelzkurve nach Durchführung der Wildtyp-PCR. Die Schmelzkurven zeigen eine einheitliche Fluoreszenzabnahme in Abhängigkeit von der Temperatur auf, so dass anzunehmen ist, dass sich keine Primerdimere während der RT-PCR gebildet haben.

3.1.4. SCID-Zucht

Der untersuchte SCID-Mausstamm (CB17/Icr-Prkdc scid/Crl) besitzt eine Mutation in der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) und wurde von Charles River Laboratories bezogen. Für diesen autosomal-rezessiven Gendefekt sind die SCID-Mäuse homozygot.

3.1.5. Zuchtbedingungen

Die Tiere wurden entsprechend den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes und der Veterinärbehörde des Saarlandes gehalten. Jeweils vier bis fünf Mäuse wurden in einem Laminar Air Flow System untergebracht. Die Tiere lebten in einem Tages-Nacht-Rhythmus von jeweils 12h. Versorgt wurden die Mäuse mit spezieller Laborkost und Wasser. Die Raumtemperatur wurde auf $22 \pm 2^\circ\text{C}$ eingestellt und die Luftfeuchtigkeit betrug $55 \pm 10\%$.

3.2. Bestrahlung

3.2.2. Bestrahlungsplanung

Die Planung der Bestrahlung wurde mit dem ADAC Pinnacle 3-dimensionalen Planungssystem mittels Computertomographie durchgeführt. Dazu wurde die Verteilung der Isodosen bei einer Ganzkörperbestrahlung der Mäuse berechnet (Abbildung 9). Die Dosisverteilung wurde so gewählt, dass die 95% Isodose den gesamten Körper eines jeden Tieres umfasste (Abbildung 10). Für die Bestrahlung wurde ein spezieller Plastikzylinder mit einem Durchmesser von 20cm und einer Höhe von 5cm verwendet. Dieser Zylinder bestand aus gewebeäquivalentem Material mit einer Dicke von 1,5cm. Somit konnte eine einheitliche Ganzkörperbestrahlung der Tiere gewährleistet werden. Während der Bestrahlung wurden die Mäuse nicht anästhesiert. Die verwendete Bestrahlungsenergie betrug 6MeV, die Dosisleistung lag bei 2Gy/min und der Fokus-Hautabstand lag bei 99cm. Das gesamte Bestrahlungsfeld nahm eine Fläche von $30 \times 30\text{cm}^2$ ein.

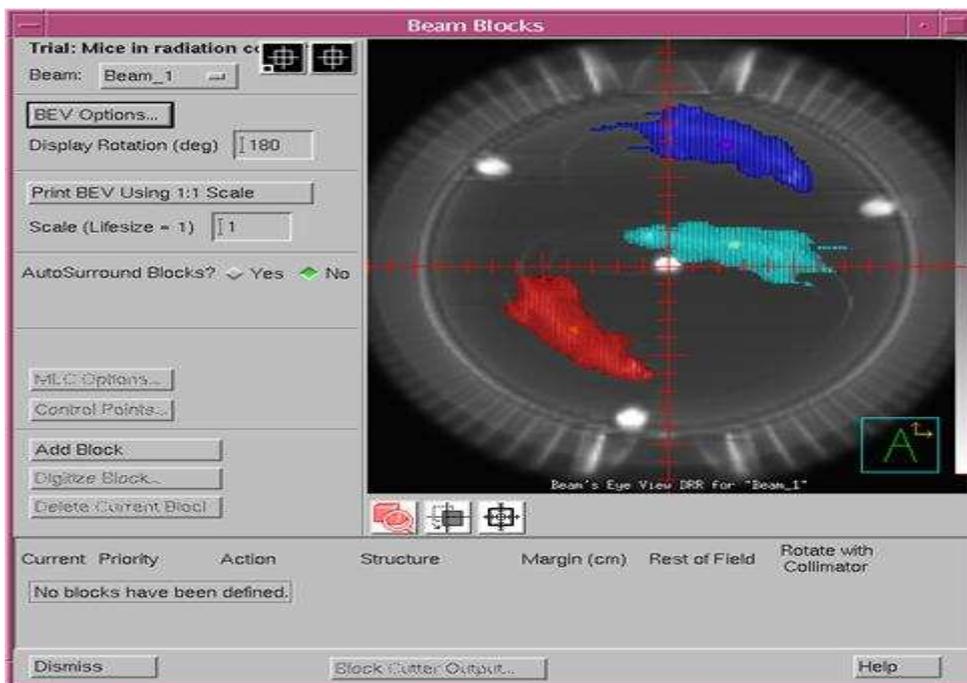


Abbildung 9: Computertomographie-Plan der Ganzkörperbestrahlung. In den mittels Computertomographie gefahrenen Schichten wurde der Körper der Mäuse konturiert. Daraus ergaben sich die Bestrahlungsvolumina der Mäuse.

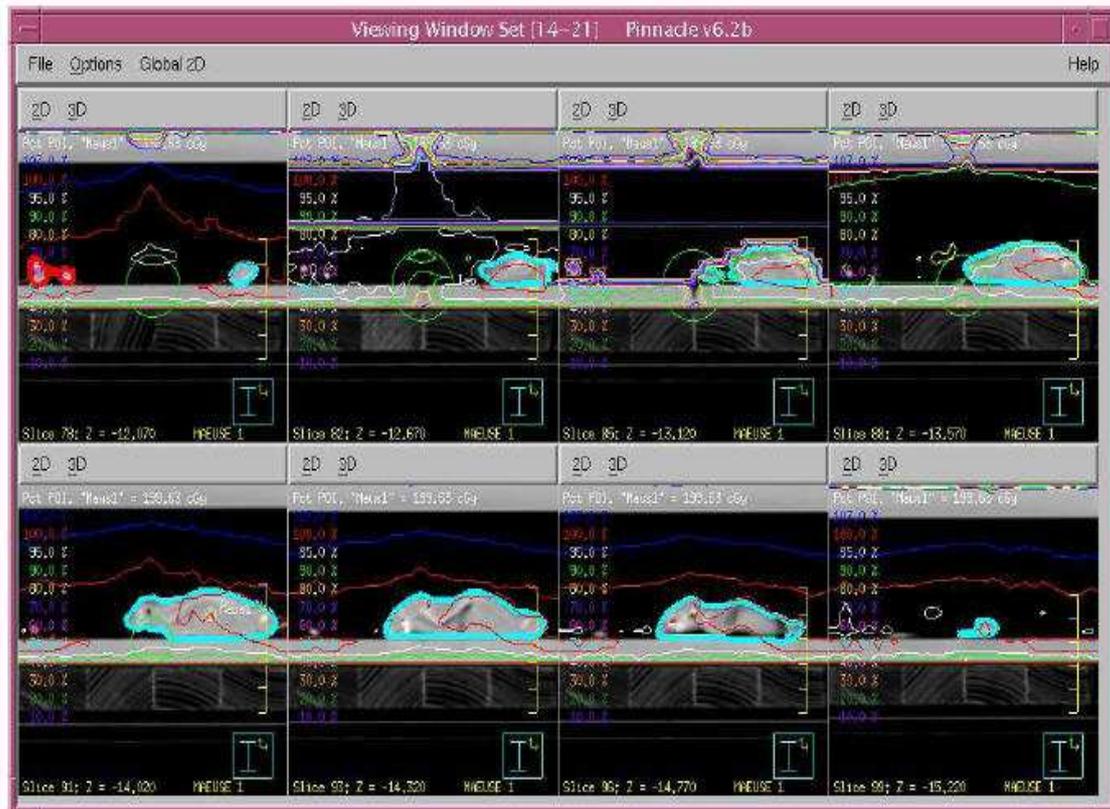


Abbildung 10: Darstellung der Isodosenverteilung. Die Isodosenverteilung wurde mit dem ADAC Pinnacle 3-dimensionalen Planungssystem berechnet. Die 95% Isodose umfasste den gesamten Körper einer Maus.

3.2.3. Einzeitbestrahlung

12 Wochen alte $ATM^{+/+}$ - und $ATM^{+/-}$ -Mäuse erhielten eine Ganzkörperbestrahlung mit einer Bestrahlungsdosis von 2Gy. Die Tiere wurden nach folgenden Reparaturzeitpunkten 0,5h, 2,5h, 5h, 24h und 48h nach einer Bestrahlung getötet. Die Organe Lunge, Niere, Darm und Herz wurden entnommen. Als Kontrolle wurde unbestrahltes Mausgewebe von $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Tieren analysiert. Die Tabellen 1 und 2 geben eine Übersicht über die Anzahl der Experimente, die zu jedem Reparaturzeitpunkt durchgeführt wurden.

Dosis	Kontrollen	2Gy	2Gy	2Gy	2Gy	2Gy
Reparaturzeit		0,5h	2,5h	5h	24h	48h
ATM ^{+/+}	2	2	2	2	3	2
ATM ^{+/-}	4	8	4	2	7	4

Tabelle 1: Anzahl der Experimente Einzeitbestrahlung Lunge. Anzahl der durchgeführten Experimente zu jedem Reparaturzeitpunkt. Als Kontrolle diente unbestrahltes ATM^{+/+} und ATM^{+/-}-Lungen-Gewebe.

Dosis	Kontrollen	2Gy	2Gy	2Gy	2Gy	2Gy
Reparaturzeit		0,5h	2,5h	5h	24h	48h
ATM ^{+/+}	2	2	2	2	4	2
ATM ^{+/-}	5	8	4	4	8	3

Tabelle 2: Anzahl der Experimente Einzeitbestrahlung Niere. Anzahl der durchgeführten Experimente zu jedem Reparaturzeitpunkt. Als Kontrolle diente unbestrahltes ATM^{+/+} und ATM^{+/-}-Nierengewebe.

3.2.4. Fraktionierte Bestrahlung

12 Wochen alte ATM^{+/+}, ATM^{+/-}-Mäuse sowie SCID-Tiere wurden fraktioniert bestrahlt. Die Fraktionierung wurde mit Einzelfraktionen von 2Gy pro Tag durchgeführt. Die Mäuse wurden an aufeinander folgenden Tagen immer zur selben Tageszeit mit 2Gy bestrahlt (Tabelle 3). Am ersten Tag einer Bestrahlungsserie (1 x 2Gy) wurden die Tiere 0,5h und 24h nach Bestrahlung getötet. Am dritten Bestrahlungstag (3 x 2Gy) wurden die Mäuse ebenfalls 24h nach Bestrahlung getötet. Nach einer Gesamtdosis von 5 x 2Gy am fünften Bestrahlungstag wurden die Tiere 24h und 72h nach Bestrahlung getötet. Die Tabellen 4 und 5 geben eine Übersicht über die Anzahl der durchgeführten fraktionierten Experimente in Lunge und Niere.

				
1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
0,5h		24h		24h
24h				72h

Tabelle 3: Fraktionierungsschema: An jedem Tag wurden die Mäuse zur selben Tageszeit einer Ganzkörperbestrahlung mit 2Gy (schwarze Pfeile stehen für die Bestrahlung mit 2Gy) unterzogen. Die Tiere wurden zu den definierten Reparaturzeitpunkten nach Bestrahlung getötet.

Dosis Reparaturzeit	Kontrollen	2Gy 0,5h	2Gy 24h	6Gy 24h	10Gy 24h	10Gy 72h
ATM ^{+/+}	2	2	3	3	3	3
ATM ^{+/-}	4	8	7	4	4	4
SCID	3	3	3	3	3	1

Tabelle 4: Anzahl der Experimente der fraktionierten Bestrahlung Lunge. Anzahl an durchgeführten Experimenten in ATM^{+/+}, ATM^{+/-}- und SCID-Zellen in der Lunge für jeden Experimentpunkt. Als Kontrollen dienten unbestrahlte ATM^{+/+}, ATM^{+/-}- und SCID-Lungenzellen.

Dosis Reparaturzeit	Kontrollen	2Gy 0,5h	2Gy 24h	6Gy 24h	10Gy 24h	10Gy 72h
ATM ^{+/+}	2	2	4	3	3	3
ATM ^{+/-}	5	8	8	4	4	4
SCID	3	3	3	3	3	1

Tabelle 5: Anzahl der Experimente der fraktionierten Bestrahlung Niere. Anzahl an durchgeführten Experimenten in ATM^{+/+}, ATM^{+/-}- und SCID-Zellen in der Niere für jeden Experimentpunkt. Als Kontrollen dienten unbestrahlte ATM^{+/+}, ATM^{+/-}- und SCID-Nierenzellen.

3.3. Organgewinnung und Gewebeaufarbeitung

Zu den definierten Untersuchungszeitpunkten werden die Mäuse mittels intraperitonealer Gabe von Rompun und Ketamin anästhesiert (Rompun 1ml; Ketamin 0,75ml; verdünnt in 8,25ml 0,9% Natriumchlorid-Lösung, 0.1ml/10g). Das Blut wird durch Punktion des linken Ventrikels entnommen. Es werden die Organe Lunge, Niere, Herz und Darm entnommen und 16h in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Im fixierten Zustand werden die Organe in kleine Stücke geschnitten. Bei der Lunge ist darauf zu achten, dass die geschnittenen Bereiche wenig Knorpelspangen des oberen Bronchialsystems enthielten, denn dies erschwerte das spätere Schneiden unter dem Mikrotom. Die Niere wird sowohl längs als auch quer aufgeschnitten. Die gewonnenen Organstücke werden anschließend mit Hilfe eines Einbettautomaten in Paraffinblöcke (Histosette II; Simport; Bernard-Pilon; Kanada) eingebettet. Zur Vorbereitung der γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung müssen die das Gewebe enthaltenden Paraffinblöcke mittels Mikrotom (Leica RM 2235) in 4 μ m dicke

Schichten geschnitten werden. Diese werden dann auf Objektträgern (Histo Band, Marienfeld; Laboratory Glassware; Lauda-Königshofen; Germany) fixiert. Die Fixierung erfolgt, indem die 4µm dicken Schnitte in ein 50°C heißes Wasserbad für ca. 20 Sekunden gehalten werden. Durch das heiße Wasser können sich die Organschnitte ausbreiten und haften so im Anschluss auf den Objektträgern. Die mit den Gewebeschichten fixierten Objektträger werden ca. 18h bei 37°C im Brutschrank (Binder Tuttlingen; Germany) zum Trocknen aufbewahrt.

3.4. Immunfluoreszenz-Färbung

3.4.2. γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung

Nach Entparaffinierung der Gewebelöcke erfolgt ein zweimal 10 minütiges Xylol-Bad (Xylol Pharm. Helv. 4; Isomerengemisch; Hedinger; Stuttgart). Anschließend werden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe 100%, 96%, 90%, 80% und 70% für jeweils 10 Minuten bewässert. Die Bewässerung erfolgt bei mäßigem Rühren auf einem Magnetrührer (Bibby Stuart). Darauf folgen mehrere Waschschrte mit Aqua dest. (B. Braun; Melsinger AG; vollentsalzt und destilliert) auf einem Magnetrührer. Für die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte werden diese in einem 95°C Citratbad mit einem Citrat:Wasser-Verhältnis von 1:10 (30ml Citrat; 270ml Aqua. dest.) für eine Stunde aufbewahrt (Citratpuffer; Dakro Real™; Target Retrieval Solution; S2031; Glostrup; Dänemark; pH 6,0). Anschließend folgen weitere Waschschrte mit Aqua dest. und PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung; pH 7,2-7,4; Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes). Um nicht spezifische Bindungsstellen zu sättigen, werden die Organschnitte für eine Stunde in PBS/NS (normales Kälberserum; cat. 642921 ICN; Irvine; CA; USA) bei Raumtemperatur geblockt. Im Anschluss daran werden 200 µl des Primärantikörpers (Upstate; CA 925 90; Anti-Phospho-Histone H2AX; Ser 139; JBW 103; mouse monoclonal) in einer Konzentration von 1:800 aufgetragen. Der Antikörper inkubiert in einer Feuchtkammer für ca. 12h bei 4°C.

Nach dieser 12-stündigen Inkubation des Primärantikörpers werden die Schnitte unter starkem Rühren in PBS/NS und PBS gewaschen. Danach werden diese in PBS/NS geblockt. Anschließend werden 200µl der Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG; Invitrogen A 110011; Eugene; Oregon USA) in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen. Unter abgedunkelten Bedingungen inkubiert dieser eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach

weiteren Waschschrte mit PBS wird abschlieÙend das Auftragen von Dapi (Mounting Medium with Dapi; Hard Set; H-1500 Vectashield; Vector Laboratories Burlingame, CA, USA) durchgeföhrt. Die Aushärtung der gefärbten Objektträger erfolgt bei 4°C unter abgedunkelten Verhältnissen für weitere 12h.

3.4.3. 53BP1/ γ H2AX-Doppelfärbung

Die Abläufe der 53BP1/ γ H2AX-Doppelfärbung ähneln bis auf die verwendeten Antikörper denen der γ H2AX-Färbung. Nach Entparaffinierung der Gewebeblöcke erfolgt ein zweimal 10 minütiges Xylol-Bad (Xylol Pharm. Helv. 4; Isomergemisch; Hedinger; Stuttgart). Anschließend werden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe 100%, 96%, 90%, 80% und 70% für jeweils 10 Minuten bewässert. Die Bewässerung erfolgt bei mäßigem Röhren auf einem Magnetröhler (Bibby Stuart). Die darauf folgenden Waschschrte werden mit Aqua dest. (B. Braun; Melsinger AG; vollentsalzt und destilliert) durchgeföhrt. Für die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte werden diese in einem 95°C Citratbad mit einem Citrat:Wasser-Verhältnis von 1:10 (30ml Citrat; 270ml Aqua. dest.) für eine Stunde aufbewahrt (Citratpuffer; Dakro Real™; Target Retrieval Solution; S2031; Glostrup; Dänemark; pH 6,0). Die nächsten Waschschrte werden mit Aqua dest. und PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung; pH 7,2-7,4; Apotheke der Universitätskliniken des Saarlandes) durchgeföhrt. Um nicht spezifische Bindungsstellen zu sättigen, werden die Organschnitte für eine Stunde in PBS/NS (normales Kälberserum; cat. 642921 ICN; Irvine; CA; USA) bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend werden 140 μ l des Primärantikörpers der γ H2AX-Färbung (Upstate; CA 925 90; Anti-Phospho-Histone H2AX; Ser 139; JBW 103; mouse monoclonal) in einer Konzentration von 1:400 aufgetragen. Die Inkubation des Antikörpers erfolgt bei 4°C für ca. 12h.

Nach einer ca. 12-stündigen Inkubation des Primärantikörpers werden die Schnitte unter starkem Röhren in PBS/NS und PBS gewaschen. Danach werden diese in PBS/NS geblockt. Anschließend werden 140 μ l des Sekundärantikörpers der γ H2AX-Färbung (Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG; Invitrogen; Eugene; Oregon USA) in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen. Unter abgedunkelten Bedingungen inkubiert dieser bei Raumtemperatur für eine Stunde. Anschließend erfolgen weitere Waschschrte mit PBS/NS und PBS. Danach wird für eine Stunde in PBS/NS geblockt. Im Anschluss an diesen Blockschrte werden 140 μ l des Primärantikörpers der 53BP1-Färbung (anti 53BP1; IHC-00001; Bethyl Laboratories; TX,

USA) in einer Verdünnung von 1:400 aufgetragen. Dieser inkubiert ca. 12h unter abgedunkelten Verhältnissen bei 4°C.

Nach einer ca. 12-stündigen Inkubation des Primärantikörpers der 53BP1-Färbung erfolgen Waschschrte mit PBS/NS und PBS. Anschließend wird für acht Minuten in PBS/NS geblockt. Im Anschluss daran werden 140µl des Sekundärantikörper der 53BP1-Färbung (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG; Invitrogen; Eugene; Oregon; USA) in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen. Dieser inkubiert eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach weiteren sich anschließenden Waschschrten mit BPS/NS und PBS erfolgt das Auftragen von Dapi (Mounting Medium with Dapi; Hard Set; H-1500 Vectashield; Vector Laboratories Burlingame, CA, USA) und die Aushärtung der gefärbten Objektträger bei 4°C unter abgedunkelten Verhältnissen für ca. 12h.

3.5. Analyse der Gewebeschnitte

3.5.2. Auszuwertende Zellen

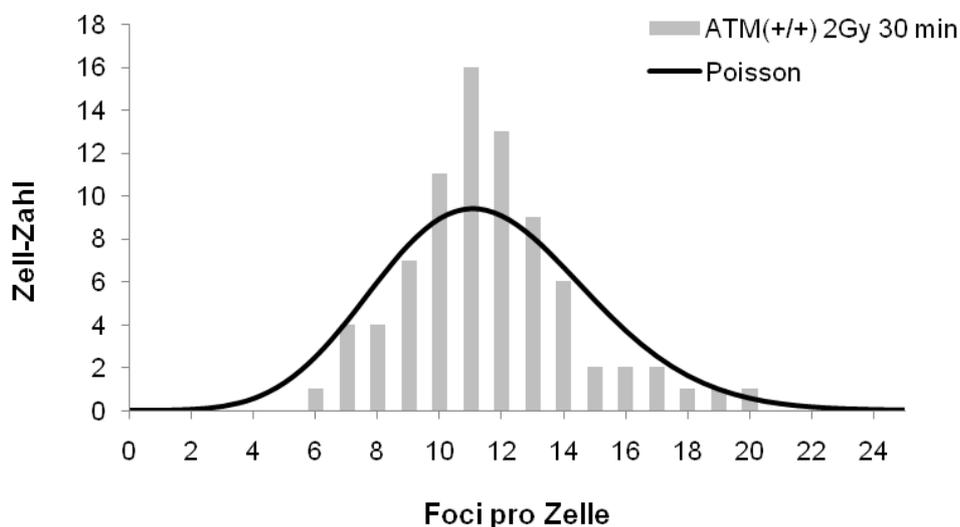
Die vorliegende Arbeit konzentriert sich mit den Organen Lunge und Niere auf strahlensensibles spät reagierendes Gewebe. Aufgrund der komplexen Organ-Architektur war es wichtig, die genauen Zelltypen, die untersucht werden sollten, im Vorfeld festzulegen. In der Lunge wurden die Zellen des Bronchialepithels, welches sich palisadenförmig darstellt, betrachtet. In der Niere wurde der Fokus auf die sich im Cortex befindenen proximalen Glomeruli einschließlich der Zellen des proximalen und distalen Tubulus gelegt. Das Lungen- und Nierengewebe wurde mit der γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung gefärbt. Dadurch wurden die strahleninduzierten DSBs als hell leuchtende Foci im Zellkern der Zellen sichtbar.

3.5.3. Quantifizierung der H2AX-Foci

Die Quantifizierung der γ H2AX-Foci in den Zellkernen erfolgte mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop (Nikon Eclipse E600). Die sich im Zellkern befindenden γ H2AX-Foci wurden per visueller Wahrnehmung gezählt. Zur Auswertung der Gewebe dienten zwei unterschiedliche Einstellungen am Mikroskop. Zum einen wurde ein DAPI-Filter genutzt, um die angefärbten Zellen zu lokalisieren. Zum anderen wurde ein FITC-Filter verwandt, mit dem die γ H2AX-Foci in den Zellkernen als hell leuchtende Foci sichtbar

waren. Die in Abbildung 16-18 angefertigten Bilder der γ H2AX- Immunfluoreszenzfärbung und der γ H2AX/53BP1 Doppelfärbungen wurden mit der Kamera (Digital Sight DS-2MBWc; Nikon) sowohl mit einem DAPI- als auch mit einem FITC-Filter aufgenommen.

Die Quantifizierung der Foci fand in der $\times 60$ -Vergrößerung statt. In jedem Experiment wurde für die Quantifizierung der γ H2AX-Foci eine Verteilung der Foci in den Zellen gezählt. Aus diesen Werten wurde anschließend ein Mittelwert berechnet. Die stochastische Verteilung der γ H2AX-Foci in den Zellen lässt sich für jeden Mittelwert als Poissonverteilung darstellen. Die Poissonverteilung gibt einen Hinweis auf die natürliche Verteilung der Foci in den Zellen nach Induktion von ionisierender Strahlung. Um zuverlässige Werte zu erlangen, wurden mindestens 40 Foci und mindestens 80 Zellen in jedem Gewebeschnitt gezählt. In den Kontrollen, die kaum Foci aufwiesen, mussten dementsprechend bis zu ca. 1000 Zellen per Handzählmaschinen quantifiziert werden. In den Abbildungen 11 und 12 sind exemplarisch Poissonverteilungen für den 2Gy 0,5h-Punkt und den 2Gy 5h-Punkt in ATM^{+/+}-Zellen der Lunge dargestellt. Die schwarzen Kurven stellen die für die beobachteten Mittelwerte errechneten Poissonverteilungen dar. Die grauen Balken zeigen die Anzahl an gezählten Zellen in Abhängigkeit von ihrer Focizahl. Mit Ausnahme von einigen Ausreißern entsprechen die gezählten Verteilungen der Foci in den Zellen den dargestellten Poissonverteilungen.



xd

Abbildung 11: Darstellung der Poissonverteilung für den 2Gy 0,5h-Punkt in ATM^{+/+}-Lungenzellen. Die Poissonverteilung stellt die stochastische Verteilung der Foci in den Zellen für einen Mittelwert von 11,56 Foci pro Zelle dar. Die grauen Balken zeigen die Anzahl an quantifizierten Zellen in Abhängigkeit von ihrer Focizahl.

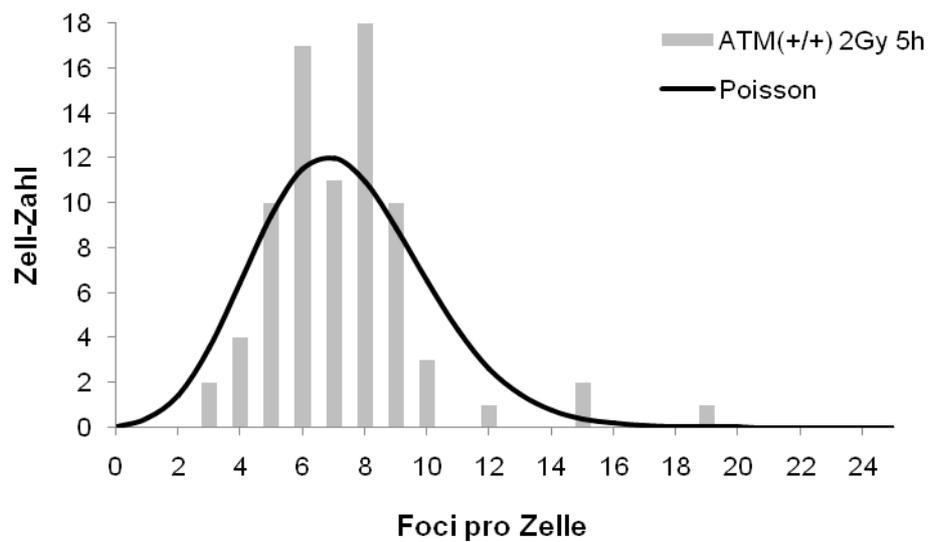


Abbildung 12: Darstellung der Poissonverteilung für den 2Gy 5h-Punkt in ATM^{+/-}-Lungenzellen. Die Poissonverteilung stellt die stochastische Verteilung der Foci in den Zellen für einen Mittelwert von 7,31 Foci pro Zelle dar. Die grauen Balken zeigen die Anzahl an quantifizierten Zellen in Abhängigkeit von ihrer Focizahl.

Während der Quantifizierung der γ H2AX-Foci war zu beachten, dass der Zellkern einer Zelle ein dreidimensionales Objekt darstellt, so dass die Foci nicht in einer Ebene des Zellkerns lagen. Aus diesem Grund war bei der Quantifizierung der Fluoreszenzsignale das genaue Durchfokussieren in der optischen Z-Achse des Mikroskops von großer Bedeutung. Für die γ H2AX-Foci-Quantifizierung wurden laborinterne Kriterien festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Messung von DSBs in unbestrahlten Kontrollen

Unbestrahlte $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und SCID-Zellen repräsentieren den natürlichen Hintergrund. Das unbestrahlte Lungen- und Nierengewebe der verwendeten Mäuse wies unabhängig vom Genotyp kaum Foci pro Zelle auf. Die Werte der unbestrahlten Kontrollen lagen zwischen 0,037 und 0,068 Foci pro Zelle. Die Abbildung 13 zeigt die gezählten γ H2AX-Foci in unbestrahlten Lungen- und Nierenzellen von $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und SCID-Zellen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied im γ H2AX-Niveau der unbestrahlten Zellen zwischen den Genotypen beobachtet werden. Da die Werte der unbestrahlten Kontrollen im Mittel konstant waren, wurden diese nicht von den Ergebnissen der Experimente abgezogen.

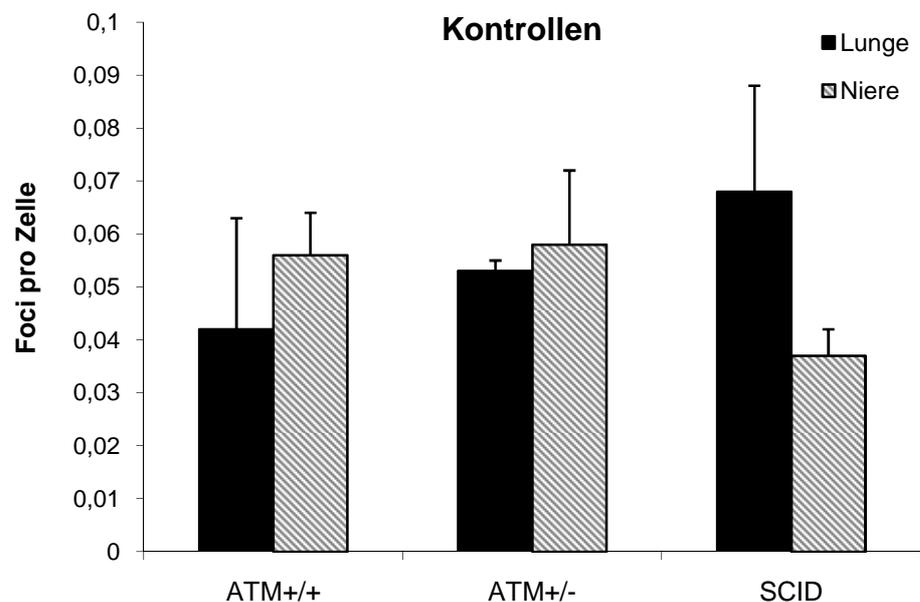


Abbildung 13: Darstellung der gezählten Foci pro Zelle in unbestrahltem $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und SCID-Zellen in Lunge und Niere. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardfehler dar.

4.2. DSB-Reparaturkinetik nach Einzeitbestrahlung

Im ersten Teil der Arbeit wurden $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Mäuse mit Einzeldosen von 2Gy bestrahlt. Die verwendete Einzeldosis entspricht derer, wie sie in der Klinik in standardisierten Bestrahlungsplänen verwendet wird. Nach festgelegten Reparaturzeitpunkten (0,5h, 2,5h, 5h, 24h und 48h) wurden die Lungen- und Nierenzellen hinsichtlich der Induktion und der Reparatur strahleninduzierter DSBs mittels γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung untersucht. Als Kontrolle diente unbestrahltes Gewebe von $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Tieren. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen die gemessenen γ H2AX-Foci in Lungen- und Nierenzellen von $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit. Nach Induktion (0,5h-Punkt) wurden bei den $ATM^{+/+}$ -Zellen im Lungengewebe ca. $11,66 \pm 0,72$ Foci pro Zelle und im Nierengewebe rund $11,08 \pm 0,26$ Foci pro Zelle beobachtet. Die analysierten Focizahlen in den $ATM^{+/-}$ -Zellen lagen zum Induktionszeitpunkt im Durchschnitt in der Lunge bei $11,93 \pm 0,27$ und in der Niere bei $11,81 \pm 0,32$ Foci pro Zelle. Im Zeitraum von 0,5h- bis 5h nach Bestrahlung kam es in den Lungen- und Nierenzellen der $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Tiere zu einem schnellen Abfall der Foci pro Zelle. Nach 5h wurden in den Lungenzellen der $ATM^{+/+}$ -Tiere ca. $6,37 \pm 0,84$ Foci pro Zelle und den Nierenzellen durchschnittlich $6,79 \pm 0,29$ Foci pro Zelle gezählt. Die $ATM^{+/-}$ -Mäuse wiesen nach einer Reparaturzeit von 5h in den Lungenzellen ca. $6,69 \pm 0,08$ Foci pro Zelle und in den Nierenzellen ca. $6,16 \pm 0,24$ Foci pro Zelle auf. Im Zeitraum von 5h bis 24h nach Bestrahlung kam zu einem deutlich langsameren Abfall der quantifizierten Foci. Nach einer Reparaturzeit von 24h lag sowohl in den $ATM^{+/-}$ als auch in den $ATM^{+/+}$ -Zellen in Lunge und Niere ein geringer Anteil an unreparierten DSBs vor. In den $ATM^{+/+}$ -Zellen der Lunge wurden nach 24-stündiger Reparaturzeit im Durchschnitt $0,73 \pm 0,12$ Foci pro Zelle und in der Niere rund $0,72 \pm 0,21$ Foci pro Zelle detektiert. In den $ATM^{+/-}$ -Zellen der Lunge wurden zu diesem Zeitpunkt ca. $0,74 \pm 0,08$ Foci pro Zelle und in den Zellen der Niere rund $0,92 \pm 0,07$ Foci pro Zelle gezählt. Nach dem 24h-Punkt verlief die DSB-Reparaturkinetik der $ATM^{+/+}$ -Zellen sehr langsam. Die $ATM^{+/-}$ -Zellen hingegen waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr in der Lage, die induzierten DSBs zu reparieren. Während in den $ATM^{+/+}$ -Zellen der Lunge nach einer Reparaturzeit von 48h durchschnittlich $0,22 \pm 0,04$ Foci pro Zelle und in der Niere ca. $0,18 \pm 0,04$ Foci pro Zelle gezählt wurden, blieb der Anteil an unreparierten DSBs in den $ATM^{+/-}$ -Zellen nach 48h mit durchschnittlich $0,83 \pm 0,07$ Foci pro Zelle auf etwa gleichem Niveau wie zum 2Gy 24h-Punkt.

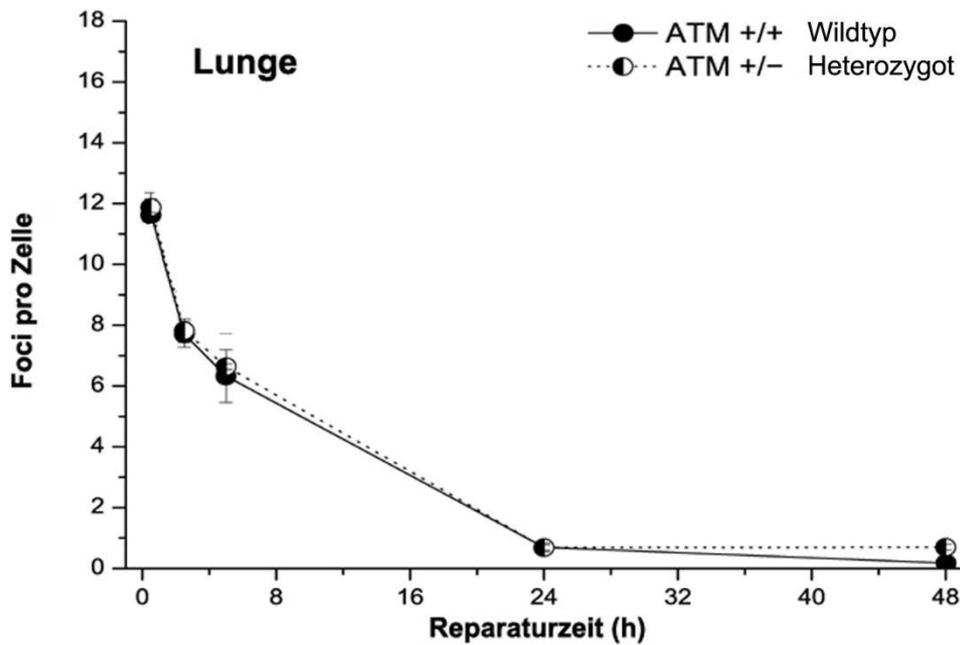


Abbildung 14: Einzeitbestrahlung Lunge mit 2Gy und Reparaturzeiten von 0,5h, 2,5h, 5h, 24h und 48h. Vergleichende Darstellung der ermittelten Focizahlen pro Zelle in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen in der Lunge. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardfehler dar.

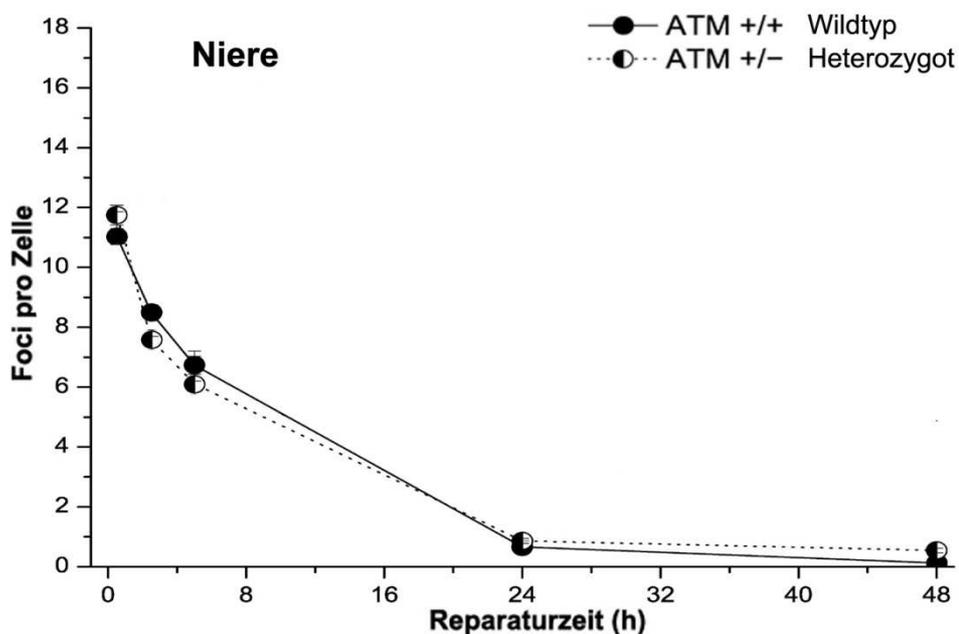


Abbildung 15: Einzeitbestrahlung Niere mit 2Gy und Reparaturzeiten von 0,5h, 2,5h, 5h, 24h und 48h. Vergleichende Darstellung der ermittelten Focizahlen in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen in der Niere. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardfehler dar.

In Kooperation mit der Biometrie der Universität des Saarlandes wurde zur Prüfung der Signifikanz der Mann-Whitney-Test durchgeführt (Tabelle 6). Da die Hypothese der Arbeit gerichtet war, d.h., es wurde im Vorfeld der Experimente ein Unterschied in der strahleninduzierten DSB-Reparatur zwischen $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen angenommen, kann zur Signifikanzprüfung die exakte Signifikanz (1-seitig) herangezogen werden. Ist dieser Wert $\leq 0,05$, so besteht ein statistisch signifikanter Unterschied in der Reparatur von strahleninduzierten DSBs zwischen beiden Genotypen. Den Werten aus der Tabelle 6 ist zu entnehmen, dass zu keinem Reparaturzeitpunkt in der Einzeitbestrahlung mit 2Gy ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen beobachtet werden konnte. Dennoch ist zu beobachten, dass trotz fehlender statistischer Signifikanz der 2Gy 48h-Punkt einen geringen Unterschied in der Reparatur von strahleninduzierten DSBs zwischen $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen aufweist. Während die $ATM^{+/+}$ -Zellen in der Lage waren den zum 2Gy 24h-Punkt bestehenden Anteil an DSBs bis zum 2Gy 48h-Punkt zu reparieren, fand in den $ATM^{+/-}$ -Zellen keine weitere DSB-Reparatur statt.

3.	Kontrollen	2Gy 0,5h	2Gy 2,5h	2Gy 5h	2Gy 24h	2Gy 48h
4 Lunge	0,314	0,139	0,200	0,500	0,464	0,200
5 Niere	0,190	0,267	0,067	0,200	0,184	0,100

Tabelle 6: Darstellung der exakten Signifikanz (1-seitig) berechnet nach dem Mann-Whitney-Test. Es wurden die Ergebnisse der Lungen- und Nierenzellen von $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Mäusen verglichen. Ist der Wert der exakten Signifikanz (1-seitig) $\leq 0,05$, so besteht ein signifikanter Unterschied in der Reparatur von strahleninduzierten DSBs zwischen $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen.

Im Rahmen der Einzeitbestrahlung wurde ebenfalls die DSB-Reparatur bezüglich Unterschiede in der Induktion und der Reparatur zwischen den Organen Lunge und Niere analysiert. Es konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in der DSB-Reparatur zwischen Lungen- und Nierenzellen beobachtet werden.

Die Abbildung 16 zeigt repräsentative Beispiele der γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung in $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen in Lunge und Niere nach Einzeitbestrahlung mit 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h. Als Kontrollen sind unbestrahlte $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Lungen- und Nierenzellen dargestellt.

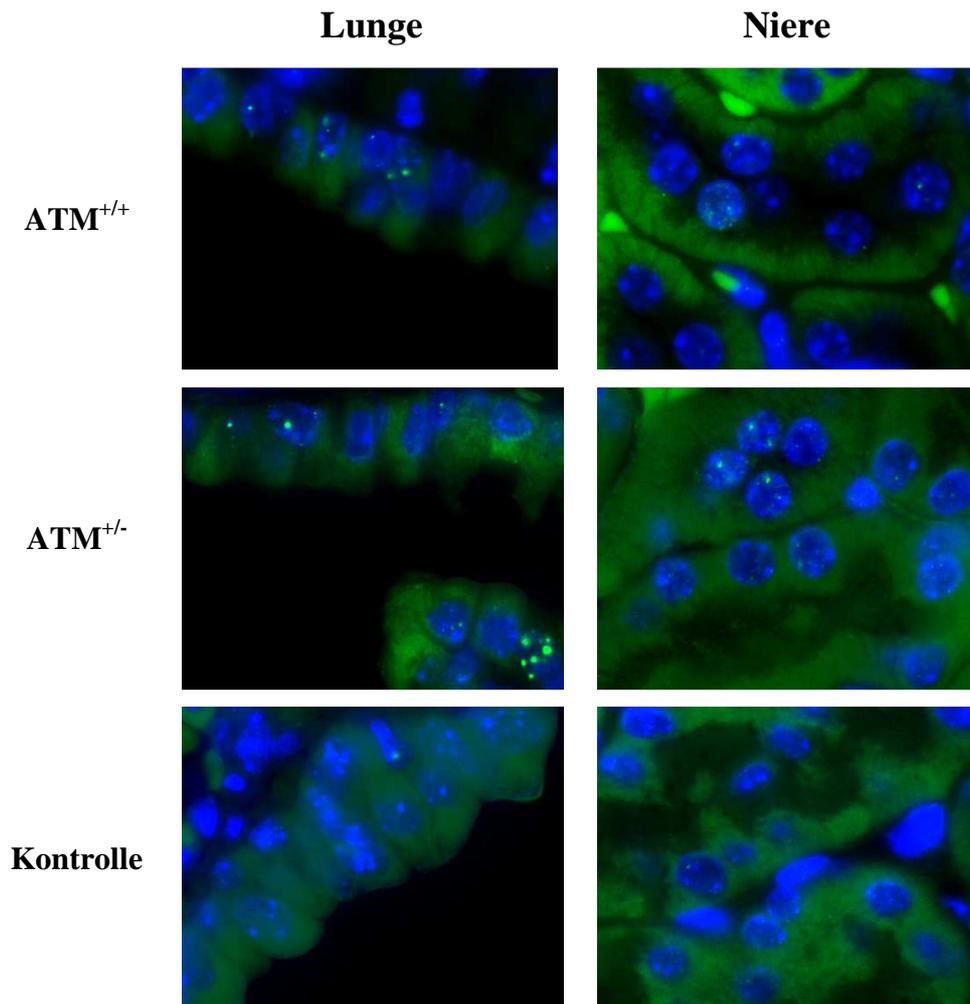


Abbildung 16: γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung in Lungen- und Nierenzellen von ATM^{+/+} und ATM^{+/-}-Mäusen nach einer Einzelbestrahlung mit 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h. Als Kontrolle sind unbestrahlte Lungen- und Nierenzellen von ATM^{+/+}-Mäusen dargestellt.

4.3. DSB-Reparaturkinetik nach fraktionierter Bestrahlung

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Reparatur von strahleninduzierten DSBs im Lungen- und Nierengewebe nach fraktionierter Bestrahlung untersucht. Es wurde dabei die Auswirkung von unterschiedlichen Reparaturkapazitäten hinsichtlich der Akkumulation von residuellen DSBs im Normalgewebe analysiert. Für die Untersuchungen wurden Lungen- und Nierenzellen von $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und SCID-Zellen fraktioniert bestrahlt. Die Tiere wurden Ganzkörperbestrahlungen mit Einzelfraktionen von 2Gy an fünf aufeinander folgenden Tagen immer zur selben Tageszeit unterzogen. Dies entspricht einem standardmäßigen Fraktionierungsschema in der Strahlentherapie. Am ersten Tag einer Bestrahlungsserie wurden die Mäuse mit 1 x 2Gy bestrahlt und 0,5h (Induktion) und 24h nach Bestrahlung getötet und deren Organe für die Analyse entnommen. Nach Bestrahlung mit 3 x 2Gy (6Gy 24h-Punkt) wurden die Mäuse 24h nach Bestrahlung getötet. Für den 10Gy 24h- und 72h-Punkt (5 x 2Gy) wurden die Tiere an fünf aufeinander folgenden Tagen mit Einzeldosen von 2Gy bestrahlt und deren Organe 24h und 72h nach Bestrahlung entnommen. Der 72h-Punkt imitiert dabei die klinisch relevante Bestrahlungspause am Wochenende. Verglichen wurden diese Ergebnisse mit unbestrahlten $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und SCID-Zellen.

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen die quantifizierten Foci in Lungen- und Nierenzellen von $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und SCID-Zellen in Abhängigkeit von der Fraktionierung und der Reparaturzeit. Wie bereits in der Auswertung der Einzeitbestrahlung erwähnt, konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der strahleninduzierten DSB-Reparatur zwischen $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen nach einmaliger Applikation von 2Gy detektiert werden. Nach fraktionierter Bestrahlung mit 3 x 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h (6Gy 24h-Punkt) kam es in den Lungen- und Nierenzellen sowohl bei den $ATM^{+/+}$ als auch bei den $ATM^{+/-}$ -Mäusen zu einer deutlichen Akkumulation der unreparierten DSBs. Zu diesem Zeitpunkt wurden in den $ATM^{+/+}$ -Zellen der Lunge rund $1,91 \pm 0,08$ Foci pro Zelle und in der Niere ca. $2,13 \pm 0,12$ Foci pro Zelle gezählt. In den $ATM^{+/-}$ -Zellen wurden zu diesem Zeitpunkt in der Lunge ca. $2,95 \pm 0,27$ Foci pro Zelle und in der Niere ca. $2,89 \pm 0,17$ Foci pro Zelle beobachtet. Durch Akkumulation der residuellen DSBs nach einer fraktionierter Bestrahlung mit 3 x 2Gy konnte ein signifikanter Unterschied in der Reparatur von strahleninduzierten DSBs zwischen $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen detektiert werden. Nach fraktionierter Bestrahlung mit 5 x 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h (10Gy 24h-Punkt) konnte dieser Reparaturdefekt noch etwas stärker beobachtet werden. Am deutlichsten kristallisierte sich der Unterschied nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 2Gy und einer Reparaturzeit von 72h heraus. Nach einer

Gesamtdosis von 10Gy und einer Reparaturzeit von 72h kam es zu einer Abnahme der Focizahl in den Lungen- und Nierenzellen in beiden Genotypen. Während es in den ATM^{+/+}-Zellen zu einer Focireduktion auf $1,59 \pm 0,13$ Foci pro Zelle in der Lunge und auf $1,49 \pm 0,25$ Foci pro Zelle in der Niere kam, fand in den ATM^{+/-}-Zellen eine deutlich geringere Reparatur der strahleninduzierten DSBs statt. Die Lungenzellen der ATM^{+/-}-Mäuse wiesen zu diesem Zeitpunkt $4,03 \pm 0,12$ Foci pro Zelle und die Nierenzellen ca. $3,84 \pm 0,22$ Foci pro Zelle auf.

Die SCID-Zellen zeigten unter fraktionierter Bestrahlung ebenfalls eine Akkumulation von residuellen DSBs. Diese war jedoch deutlich stärker als bei den untersuchten AT-Zellen zu beobachten. Zum 2Gy 24h-Punkt (1 x 2Gy) wurden in den SCID-Lungenzellen ca. $5,66 \pm 0,17$ Foci pro Zelle und in den Zellen des Nierengewebes rund $5,03 \pm 0,28$ Foci pro Zelle ermittelt. Nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h wurden in den SCID-Lungenzellen ca. $12,44 \pm 0,28$ Foci pro Zelle und in den Zellen des Nierengewebes rund $12,80 \pm 0,27$ Foci pro Zelle quantifiziert. Einen sehr kritischen Experimentpunkt stellte die Bestrahlung mit 5 x 2Gy und einer Reparaturzeit von 72h dar. Von vier SCID-Mäusen überlebte nur ein Tier diesen Experimentpunkt. Daher sind im Diagramm zu diesem Zeitpunkt keine Fehlerbalken angegeben. In den Zellen der Lunge wurden bei dieser Maus ca. 10,24 Foci pro Zelle und in der Niere ca. 10,92 Foci pro Zelle gezählt. Die beobachteten Werte dieser SCID-Maus lassen darauf schließen, dass SCID-Zellen nach längeren Reparaturzeiten (72h) weiter in der Lage sind, die residuellen DSBs zu reparieren.

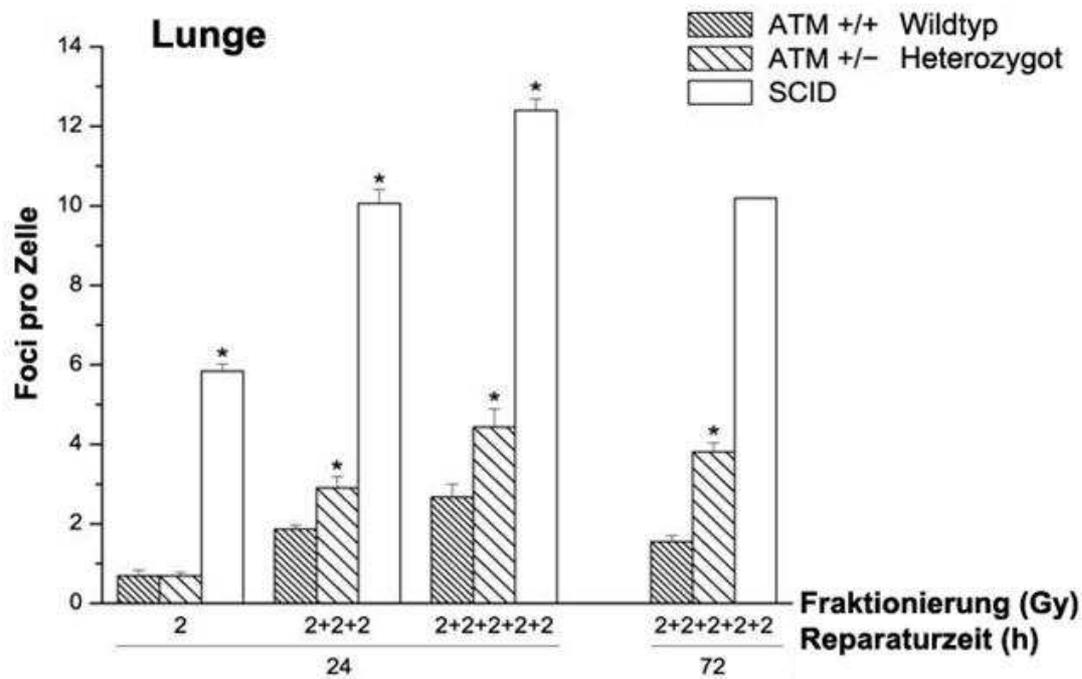


Abbildung 17: Vergleich der fraktionierten Bestrahlung in ATM $^{+/+}$, ATM $^{+/-}$ und SCID-Lungenzellen. Bestrahlt wurde mit Einzelfraktionen von 2Gy. Die ermittelten Foci sind in Abhängigkeit von der Fraktionierung und der Reparaturzeit angegeben.

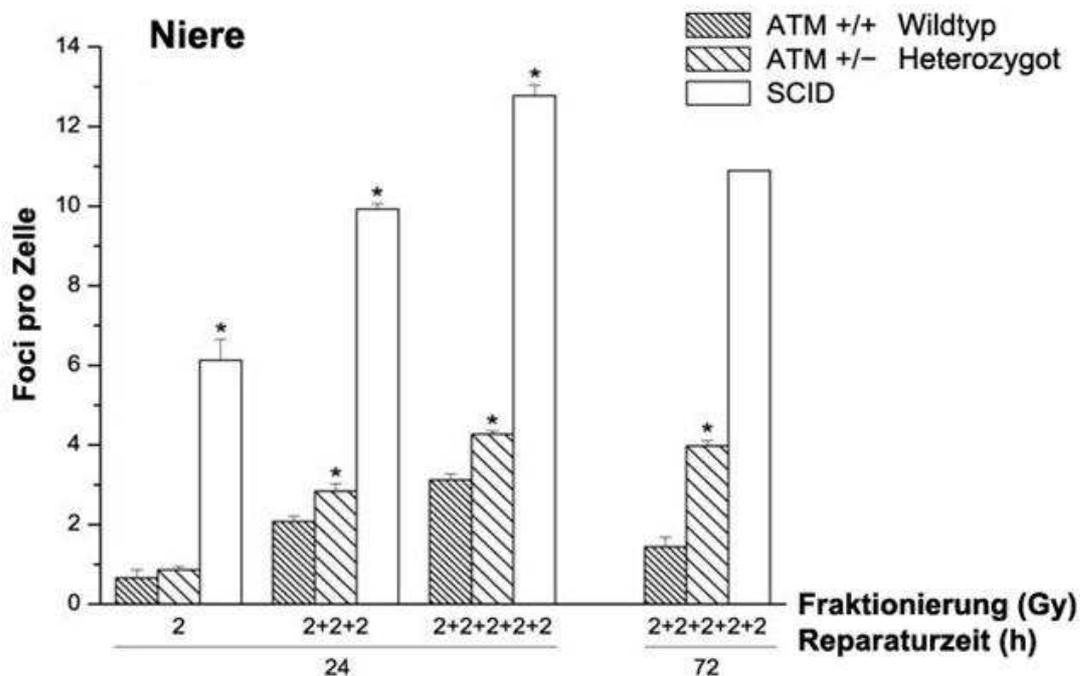


Abbildung 18: Vergleich der fraktionierten Bestrahlung in ATM $^{+/+}$, ATM $^{+/-}$ und SCID-Nierenzellen. Bestrahlt wurde mit Einzelfraktionen von 2Gy. Die ermittelten Foci sind in Abhängigkeit von der Fraktionierung und der Reparaturzeit angegeben.

Die Prüfung der Signifikanz erfolgte in Kooperation mit der Biometrie der Universität des Saarlandes mittels des Mann-Whitney-Tests. In der Tabelle 7 ist die exakte Signifikanz (1-seitig) der jeweiligen Experimentpunkte für Lunge und Niere dargestellt. Ist dieser Wert $\leq 0,05$, so besteht ein statistisch signifikanter Unterschied in der Reparatur von strahleninduzierten DSBs zwischen $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen.

	2Gy 24h	6Gy 24h	10Gy 24h	10Gy 72h
Lunge	0,464	0,025	0,025	0,014
Niere	0,184	0,029	0,029	0,029

Tabelle 7: Fraktionierte Bestrahlung mit 2Gy. Darstellung der exakten Signifikanz (1-seitig) berechnet nach dem Mann-Whitney-Test für die einzelnen Experimentzeitpunkte. Es wurden die Ergebnisse innerhalb der Lungen- und Nierenzellen von $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Tieren verglichen. Ist der Wert der exakten Signifikanz (1-seitig) $\leq 0,05$, so besteht ein signifikanter Unterschied in der strahleninduzierten DSB-Reparatur zwischen $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen.

Mit den Experimenten der Einzeitbestrahlung konnte die geringe DSB-Reparaturdefizienz der $ATM^{+/-}$ -Mäuse nicht signifikant detektiert werden. Unter fraktionierter Bestrahlung kam es in $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und SCID-Zellen zu einer Akkumulation der residuellen DSBs, wobei gezeigt werden konnte, dass selbst geringe Einschränkungen in der DSB-Reparatur zu einem überproportionalen Anstieg von strahleninduzierten DSBs führen, wodurch der DSB-Reparaturdefekt in $ATM^{+/-}$ -Mäusen detektiert werden konnte. Beim Vergleich der DSB-Reparatur zwischen Lunge und Niere konnte jedoch kein signifikanter Unterschied beobachtet werden, so dass anzunehmen ist, dass die Reparatur von strahleninduzierten DSBs organunabhängig verläuft.

Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu bestätigen, wurde 53BP1 ein weiterer hoch signifikanter Biomarker für DSBs verwendet. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen repräsentative Beispiele der γ H2AX/53BP1-Doppelfärbung in Lunge und Niere von $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und SCID-Zellen nach fraktionierter Bestrahlung mit 5 x 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h. Die 1:1 Kolo-kalisation der γ H2AX- und 53BP1-Foci konnte sowohl im Lungen- als auch im Nierengewebe demonstriert werden. Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass selbst geringe DSB-Reparatureinschränkungen eine Auswirkung auf die Akkumulation von strahleninduzierten DSBs nach fraktionierter Bestrahlung besitzen und somit eine mögliche Ursache für die sehr variablen Früh- bzw. Spättoxizitäten im Normalgewebe darstellen.

Lunge

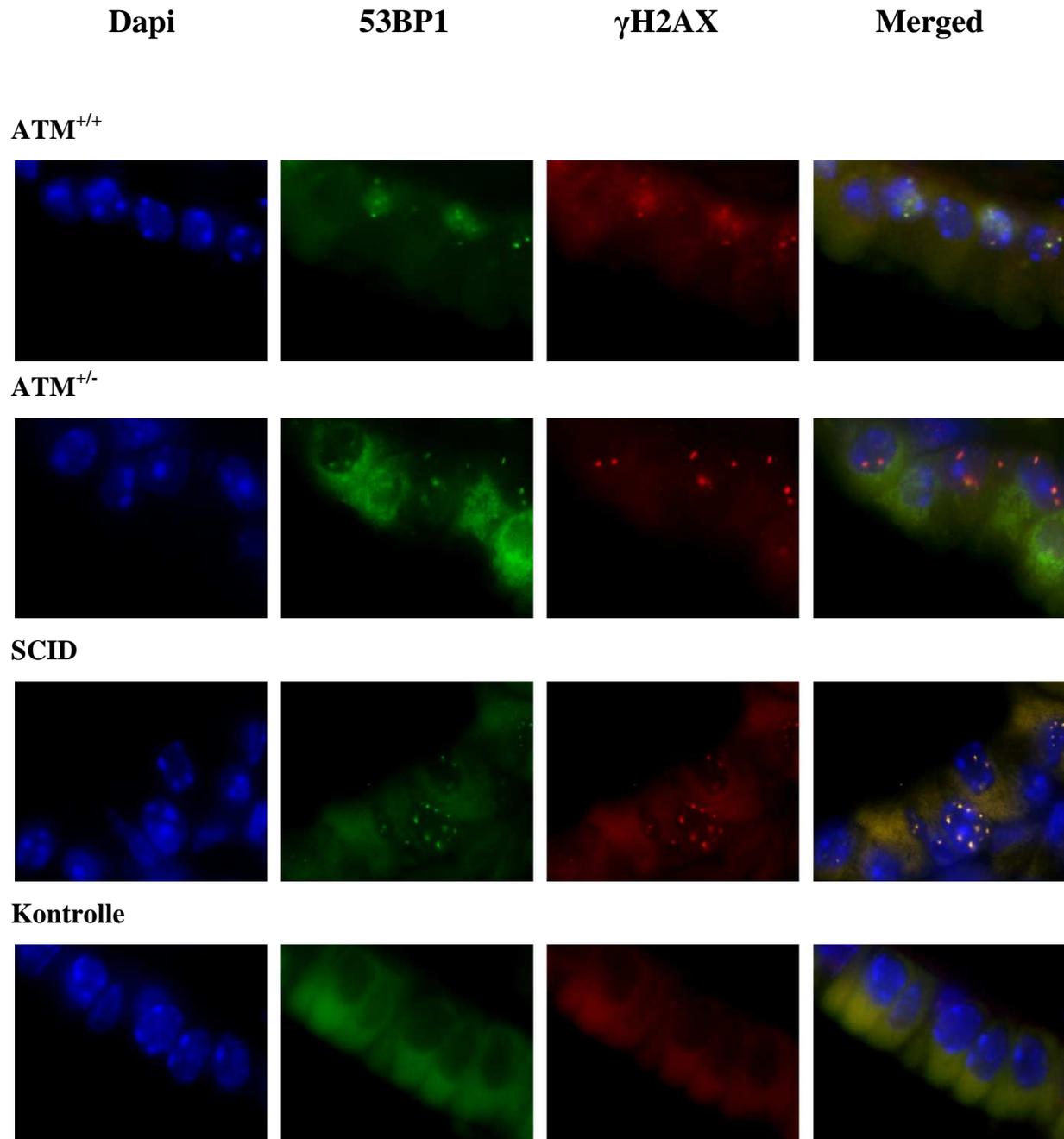


Abbildung 19: 53BP1/ γ H2AX-Doppelfärbung in Lungenzellen von ATM^{+/+}, ATM^{+/-} und SCID-Mäusen nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h. Als Kontrollen sind unbestrahlte ATM^{+/+}-Zellen dargestellt.

Niere

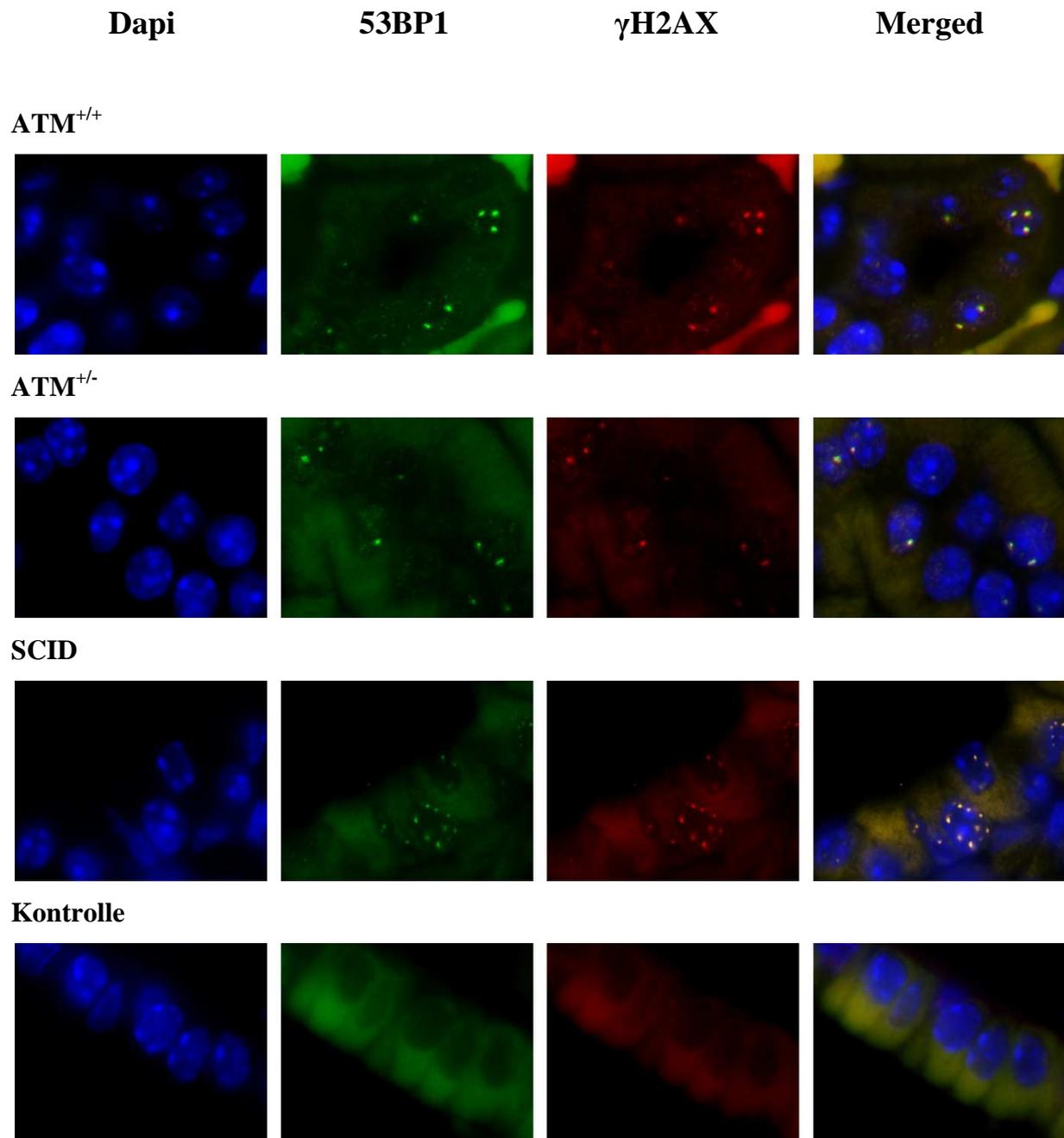


Abbildung 20: 53BP1/ γ H2AX-Doppelfärbung in Nierenzellen von ATM^{+/+}, ATM^{+/-} und SCID-Mäusen nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h. Als Kontrollen sind unbestrahlte ATM^{+/+}-Zellen dargestellt.

5. Diskussion

5.1. Relevanz der Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung genetisch definierter DSB-Reparaturkapazitäten während klinisch relevanter Fraktionierungsschemata untersucht. Als Ziel der Arbeit galt der Nachweis von DSB-Reparaturdefekten als Hinweis auf eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit. Die Untersuchung erfolgte an $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und SCID-Mauszellen, welche stellvertretend für weitere Erkrankungen, die mit DSB-Reparaturdefekten assoziiert sind, stehen.

Die Untersuchung erfolgte in Hinblick auf die Beobachtung der Reparatur von DSBs innerhalb der jeweiligen gewebespezifischen Umgebung, die für die Ausbildung von strahleninduzierten Nebenwirkungen verantwortlich sind, um diese in Zukunft besser erkennen und verstehen zu können.

Die individuellen Ausprägungen der zellulären Strahlenempfindlichkeit bei klinisch unauffälligen Patienten, die sich einer Strahlentherapie unterziehen, unterscheiden sich in der unterschiedlichen Ausprägung von Früh- bzw. Spättoxizitäten. In einer prospektiven Studie von Turesson et al. 1996 wurde die Strahlensensibilität von Brustkrebspatienten, die eine identische Behandlung erfahren haben, verglichen. Annähernd 70% der unterschiedlichen Toleranzen konnten Turesson et al. nicht mit vorbestehenden Komorbiditäten erklären, so dass angenommen werden muss, dass diese unterschiedlichen Toleranzen durch genetische Prädispositionen wie Mutationen oder Polymorphismen determiniert sind.

Bereits 1975 war bekannt, dass Defekte in Proteinen, die in der DSB-Reparatur involviert sind, zu erhöhter Strahlensensibilität führen (Taylor, 1978). Zunehmende Hinweise unterstützen die Beobachtung, dass Patienten mit genetischen Alterationen in Proteinen, die an der DNA-Schadensantwort beteiligt sind, ein erhöhtes Risiko besitzen, schwere radiogen induzierte Toxizitäten im Normalgewebe auszubilden (Fernet et al., 2004; Rieger et al., 2004; Svensson et al., 2006).

Besonders dramatischer Ausdruck einer genetischen Prädisposition ist die extrem erhöhte Strahlensensibilität von Patienten, welche an Ataxia telangiectatica (AT) erkrankt sind und eine Strahlentherapie erhalten haben. Es sind schwere Nebenwirkungen bis hin zu Todesfällen bei AT-Patienten aufgrund einer Strahlentherapie beschrieben. Genetische Syndrome, die mit Einschränkungen in der DSB-Reparatur einhergehen sind sehr selten. Heterozygote

Mutationen in Genen der DNA-Schadensantwort sind in der Normalbevölkerung jedoch immer häufiger vertreten (Pollard et al., 2009). Es ist bekannt, dass Menschen, die heterozygote Mutationen in Genen der DSB-Reparatur besitzen, im Rahmen einer Strahlentherapie häufiger schwere Komplikationen erleiden (Löbrich et al., 2003) und ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von strahleninduzierten Zweitmalignomen besitzen (Chistiakov et al., 2008).

Da die Strahlentherapie eine wichtige Therapieoption in der Behandlung von malignen Tumoren darstellt, ist es von grossem klinischen Interesse die Auswirkung unterschiedlicher Reparaturkapazitäten nach klinisch relevanten Fraktionierungsschemata zu untersuchen.

5.2. Betrachtungen zur Methodik

5.2.2. Quantifizierung von DSBs mittels γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung

Die Messung von DSBs erlaubt die Reparaturkapazität von Zellen zu beurteilen. Es stehen derzeit verschiedene Verfahren zum Nachweis von DNA-DSBs zur Verfügung. Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ist eine Methode, mit der DSBs durch den physikalischen Nachweis von DNA-Fragmenten nach ionisierender Strahlung gemessen werden können. Der Nachteil ist, dass diese Methode den Nachweis von DSBs nur nach sehr hohen Bestrahlungsdosen (60-80Gy) erlaubt. Im Vergleich dazu zeichnet sich der Nachweis von strahleninduzierten Foci durch eine deutlich erhöhte Sensitivität aus und kann nach sehr geringen und damit physiologischen Bestrahlungsdosen durchgeführt werden (Rothkamm und Löbrich, 2003). Jedoch wird beim Nachweis von fluoreszenzmarkierten Foci der DSB nicht direkt, sondern es werden Proteinagglomerate, die sich an einem DSB befinden, gemessen. Ein in der Forschung häufig verwendetes Protein ist die phosphorylierte Histonvariante H2AX, die sehr schnell nach Induktion von ionisierender Strahlung am DSB nachzuweisen ist. Die Anzahl an γ H2AX-Foci korreliert mit der applizierten Dosis und nimmt mit zunehmender Reparaturzeit ab. In vergleichenden Experimenten mit PFGE (Sedelnikova et al., 2002, Rothkamm und Löbrich 2003) konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der γ H2AX-Foci mit der fortschreitenden DSB-Reparatur übereinstimmt. Jeder Focus enthält mehrere hundert γ H2AX-Moleküle und die Foci-Anzahl korreliert eng mit der Anzahl an vorhandenen DSBs, so dass man annehmen kann, dass jeder DSB durch einen γ H2AX-Focus dargestellt werden kann (Sedelnikova et al. 2002, 2003, Rothkamm und Löbrich 2003).

Eine weitere Möglichkeit zur Messung von DSBs ist die Analyse von Chromosomenschäden nach vorzeitiger Kondensation. Diese Methode beruht auf dem Nachweis von Chromosomenbrüchen und kann mit sehr niedrigen Bestrahlungsdosen durchgeführt werden. Allerdings führt nicht jeder DSB zu einem Chromosomenbruch, so dass die Gefahr besteht, die tatsächlich vorhandene Anzahl an DSBs zu unterschätzen.

Vor diesem Hintergrund ist der Nachweis von γ H2AX-Foci ein geeignetes Verfahren, um in vivo induzierte DSBs während klinisch relevanter Fraktionierungsschemata zu erfassen. In der Literatur wird bei manueller Auszählung von γ H2AX-Fluoreszenzsignalen eine Sensitivitätsgrenze der Methode von 1 mGy angegeben (Rothkamm und Löbrich 2003), so dass dieses in vivo Modell die Analyse der Induktion und der Reparatur von DSB im komplexen Normalgewebe während fraktionierter Bestrahlung mit Einzelfractionen von 2Gy erlaubt.

Anzumerken ist jedoch, dass die Quantifizierung von DSBs mittels γ H2AX-Foci auf Zellen beschränkt ist, in denen der Reparaturmechanismus des NHEJ stattfindet. Somit werden nur Zellen sichtbar, die sich entweder in der G0 oder G1-Phase des Zellzyklus befinden. Um die Reparatur von DSBs mit Hilfe der γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung zellzyklusphasenspezifisch untersuchen zu können, kann die zusätzliche Detektion von Proteinen, deren Auftreten auf bestimmte Zellzyklusphasen beschränkt ist, vorgenommen werden. So können z.B. Zellen, die sich in der G2-Phase des Zellzyklus befinden, durch ein pan-nukleäres Signal, das so genannte Centromerprotein F (CENP-F), identifiziert werden. Dieses Centromerprotein F ist nur in der späten S- und G2-Phase im Zellkern vorhanden (Liao et al., 1995). Die betrachteten Zellen des Lungen- und Nierengewebes befinden sich jedoch hauptsächlich in der G0 oder G1-Phase des Zellzyklus, so dass eine zellzyklusphasenspezifische Detektion nicht notwendig war.

Da die γ H2AX-Agglomeration am DSB eine Art „Plattform“ für die Akkumulation und Retention von anderen an der DSB-Reparatur beteiligter Proteine darstellt, bestehen weitere Möglichkeiten, DSBs mittels Immunfluoreszenz sichtbar zu machen. γ H2AX-Foci kolokalisieren mit Proteinen, die in der DNA-Schadensantwort involviert sind und ebenfalls in Form von Foci an DNA-DSBs akkumulieren (Paull et al., 2002). Zu diesen Proteinen gehören z.B. das Produkt des Tumorsuppressor-Gens BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1), 53BP1 (p53-binding protein), MDC1 (mediator of DNA damage-checkpoint 1), Rad51 und der MRN-Komplex (Paull et al., 2002; Schultz et al., 2000; Stewart et al., 2003; Bekker-Jensen et al., 2006). Als Beispiel ist an dieser Stelle MDC1 genannt. NFB1/MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1) ist ein nukleärer Faktor mit einer aminoterminalen

FHA (forkhead-associated) Domäne und sich wiederholenden BRCT-Domänen (breast cancer susceptibility gene-1 carboxyl terminus). Physiologisch assoziiert MDC1 mit ATM, p53, Komponenten des MRN-Komplexes und γ H2AX (XU und Stern, 2003). Die Darstellung von DSBs mittels MDC1-Antikörper wird derzeit im Labor für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes etabliert. Zurzeit stellen die Immunfluoreszenzfärbungen sowohl mit γ H2AX als auch mit 53BP1-Antikörpern gleichrangige und gut durchführbare Verfahren zur Detektion von DSBs dar.

Während der Färbeprozesse konnten natürlich in jedem Arbeitsschritt Fehler auftreten, die zu schlecht auswertbaren Färbungen führten. Ausschlaggebend für gute Färbungen waren die Waschschrte und die richtige Konzentration des korrekten Antikörpers. Fehlerquellen in diesen Schritten resultierten in schlechten Färbungen und mussten wiederholt werden, so dass die auftretenden Fehler in der verwendeten γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung keinen großen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit besitzen. Zur Überprüfung der Ergebnisse der γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung wurde 53BP1, ein weiterer signifikanter Biomarker für DSBs, eingesetzt. Die 1:1 Kolokalisation der γ H2AX- und der 53BP1-Foci bestätigt die Ergebnisse der γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung. Demnach ist der Nachweis von DSBs mittels γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung und die manuelle Auswertung der Foci ein glaubhaftes in vivo Modell für die Erfassung von strahleninduzierten DSBs.

Es ist jedoch zu beachten, dass die manuelle Auszählung der γ H2AX-Foci sehr zeitaufwendig und vor allem personenabhängig ist und somit nicht die absoluten Ergebnisse der Arbeit, sondern die Relationen zueinander betrachtet werden müssen.

Eine weitere Problematik besteht in der Überlagerung von γ H2AX-Fluoreszenzsignalen nach Applikationen von höheren Strahlendosen. Diese Problematik wird bei manueller Foci-Quantifizierung ab einer Dosis von 2Gy beschrieben (Rogakou et al., 1999). Nach Applikation von höheren Strahlendosen kann es zur Überlagerung von Fluoreszenzsignalen kommen, die dann nicht mehr als getrennt liegende Foci in Erscheinung treten. Dies wirkt sich umso deutlicher aus, je mehr Foci pro Zellkern vorliegen (Rogakou et al., 1999; Böcker und Iliakis, 2006). Zur Minimierung dieser Fehlerquelle wurden laborinterne Kriterien für die manuelle Auswertung der γ H2AX-Foci festgelegt.

Eine Alternative zur manuellen Auswertung stellen vollautomatische Bildanalysesysteme dar, durch die das Problem der Überlappung von zwei nah nebeneinander liegenden Foci durch die Anwendung mathematischer Filter behoben werden kann (Böcker und Iliakis, 2006). Die einheitliche Verwendung dieser Bildanalysesysteme könnte somit eine gute Vergleichbarkeit der Daten aus unterschiedlichen Laboratorien darstellen, denn ein generelles Problem beim

Vergleich der von verschiedenen Arbeitsgruppen bei manueller Foci-Quantifizierung ermittelten Ergebnisse besteht sowohl in den Variationen der verwendeten mikroskopischen Ausstattung als auch in der Subjektivität der Untersuchungen (Redon et al., 2008; Scherthan et al., 2008). Vor diesem Hintergrund wäre der Einsatz von automatischen Bildanalyse-Systemen eine Möglichkeit, um die γ H2AX-Quantifizierung weiter optimieren zu können.

Unabhängig mit welcher Methode die Fociquantifizierung stattfindet, besteht der Vorteil dieses verwendeten *in vivo* Modells in einer direkten Korrelation zwischen unreparierten DSBs und gewebespezifischen pathomorphologischen und pathophysiologischen Mechanismen nach einer Strahlentherapie. In den vergangenen Jahren haben eine Vielzahl von Studien bewiesen, dass die Antwort im Normalgewebe auf Bestrahlung nicht auf einen einfachen Zelluntergang zu reduzieren ist, sondern vielmehr ein fließender pathogenetischer Prozess existiert, der durch Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie durch ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen zellulären Komponenten mit der extrazellulären Matrix gekennzeichnet ist (Rübe et al., 2005; Yang et al., 2007; Rodier et al., 2009). Dieses *in vivo* Modell erlaubt die Analyse der DSB-Reparaturkapazität von Zellen, ohne die komplizierten Mechanismen genau beleuchten zu müssen. Dabei erfasst dieses Modell nur die kurzfristige Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zellen und keine pathophysiologischen oder pathomorphologischen Prozesse, die erst Wochen bis Monate nach Bestrahlung auftreten und zu sichtbaren histopathologischen Korrelationen führen.

Mit diesem *in vivo* Modell wird es in Zukunft möglich sein, das strahlentherapeutische Wissen während anderer klinisch relevanter Fraktionierungsschemata wie der Hyperfraktionierung oder der Akzelerierung zu erweitern. Die Methode der γ H2AX-Immunfluoreszenz lässt sich aber auch in anderen Therapieoptionen wie der Chemotherapie einsetzen, um die Sensibilität der Zellen auf die jeweilige Noxe zu untersuchen. Die Analyse von DSBs mittels der γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung wird somit auch in Zukunft eine bedeutende Rolle in der experimentellen als auch in der klinischen Medizin spielen.

5.2.3. Wahl des Induktionszeitpunktes

In ersten Experimenten zur γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung konnten drei Minuten nach Bestrahlung kleine γ H2AX-Foci beobachtet werden. Neun Minuten nach Bestrahlung erschienen diese Foci heller und größer. Ihre maximale Größe und Helligkeit erreichten die γ H2AX-Foci 30 Minuten nach Bestrahlung (Bonner et al., 2008). Weitere Studien an

Säugerzellen haben gezeigt, dass bereits eine Minute nach Bestrahlung die Hälfte der H2AX-Histone und nach 10 Minuten die gesamte Anzahl an H2AX-Histonen phosphoryliert ist (Rogakou et al., 1997). In der Literatur werden für die Induktion von strahleninduzierten DSBs in AT-Zellen sowohl Zeiten von 10 Minuten als auch von 30 Minuten angegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Induktion mit 2Gy ein Induktionspunkt von 30 Minuten gewählt. Aufgrund dessen mussten die Tiere für die Bestrahlung nicht anästhesiert werden, sondern konnten nach dieser zur Organentnahme betäubt werden. Somit wurde das Risiko minimiert, dass Mäuse aufgrund der Anästhesie vor Abschluss der Experimente verstarben. Desweiteren wurde für die Präparation bzw. Entnahme der Organe eine Dauer von 5-10 Minuten benötigt. Bei einem Induktionspunkt von 10 Minuten würde diese Präparationszeit einen großen Einfluss auf den Induktionszeitpunkt nehmen. Der Einfluss der Präparationszeit von 5-10 Minuten auf einen Induktionspunkt von 30 Minuten ist demgegenüber deutlich geringer. Vor diesem Hintergrund wurde die Induktion in der vorliegenden Arbeit nach 30 Minuten gemessen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass 30 Minuten nach Bestrahlung ein geringer Anteil an strahleninduzierten DSBs schon wieder repariert worden sein kann.

5.3. Betrachtung der Versuchsergebnisse

5.3.2. Unterschiede in der DSB-Reparaturkinetik zwischen ATM^{+/+}- und ATM^{+/-}-Zellen nach Einzeitbestrahlung

Im ersten Teil der Arbeit wurden ATM^{+/+} und ATM^{+/-}-Zellen mit Einzelfractionen von 2Gy bestrahlt. Mit den Ergebnissen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl ATM^{+/+}-Zellen als auch ATM^{+/-}-Zellen einen Anteil von ca. 6% an strahleninduzierten DSBs 24h nach Bestrahlung unrepariert lassen. Von Kato et al. 2006 wurde die Reparaturkinetik von menschlichen ATM^{+/-}-Fibroblasten nach Einzeitbestrahlung mit 1Gy im Vergleich zu gesunden Fibroblasten analysiert. Die Beobachtungen von Kato et al. gehen mit den Ergebnissen dieser Arbeit konform, denn sowohl die ATM^{+/-} als auch die gesunden Fibroblasten ließen einen Anteil von 5% an residuellen DSBs 12 h bzw. 24h nach Bestrahlung zurück. Die geringe Abweichung von einem Prozent ist möglicherweise durch die bei Kato et al. verwendete unterschiedliche Methode der Auswertung mittels PSI Bildanalyse-System im Vergleich zur manuellen Auszählung begründet. Andererseits tritt das Problem der γ H2AX-

Fluoreszenzsignalüberlagerung bei einer geringeren Bestrahlungsdosis von 1Gy weniger stark in Erscheinung.

Kato et al. konnten jedoch im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit einen signifikanten Unterschied in der Reparaturkinetik zwischen $ATM^{+/-}$ und gesunden Fibroblasten im Zeitraum zwischen 45 Minuten und 60 Minuten nach Bestrahlung beobachten. Dies ist auf einen verzögerten Anstieg der γ H2AX-Foci bei $ATM^{+/-}$ -Fibroblasten nach ca. 20-60 Minuten im Vergleich zu gesunden Zellen nach ca. 20 Minuten zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung, warum dieser Unterschied in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden konnte, ist die unterschiedliche Auswahl des Induktions- als auch der weiteren Reparaturpunkte, die in dieser Arbeit im Vergleich zu Kato et al. sehr viel länger gewählt worden sind, so dass dieser Unterschied in der Reparaturkinetik zwischen $ATM^{+/+}$ -Zellen und $ATM^{+/-}$ -Zellen in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse der Arbeit sowie weitere Studien demonstrieren, dass selbst gesunde Zellen strahleninduzierte DNA-Schäden während der klinisch relevanten Bestrahlungspause von 24h nicht vollständig reparieren (Rübe et al., 2008). Die Daten der Arbeit zeigen jedoch, dass 48h nach Bestrahlung die $ATM^{+/+}$ -Zellen in der Lage sind, den Anteil von 6% nach 24h auf 2% zu reduzieren. Die $ATM^{+/-}$ -Zellen hingegen können den Anteil von 6% an residuellen DSBs nicht weiter reparieren. Es wird vermutet, dass 48h nach Bestrahlung der Defekt in den $ATM^{+/-}$ -Zellen im langsamen und ATM-abhängigen Reparaturweg zum Tragen kommt (Löbrich und Jeggo, 2005).

Homozygote $ATM^{-/-}$ -Zellen (Abbildung 21), die einen schweren Defekt in der DSB-Reparatur aufweisen, lassen einen Anteil von ca. 10% an residuellen DSBs über einen längeren Zeitraum unrepariert (Löbrich und Jeggo, 2005; Kühne et al., 2004). Dies konnte sowohl nach sehr hohen Strahlendosen von 80Gy und Auswertung mittels PFGE als auch nach sehr geringen Strahlendosen von 0,02Gy 0,2Gy und 2Gy und Auswertung mittels γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung beobachtet werden (Kühne et al., 2004). Ein heterozygoter Defekt im ATM-Gen resultiert hingegen in einem geringeren Anteil an residuellen DSBs (ca. 5-6%) und wird somit erst nach längeren Reparaturzeiten (> 48h) sichtbar. In den Experimenten zur Einzeitbestrahlung konnte somit ein geringer, jedoch nicht statistisch signifikanter Unterschied in der Reparatur zwischen $ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$ -Zellen beobachtet werden. Mit einer größeren Anzahl an Experimenten würde dieser geringe Unterschied möglicherweise an statistischer Signifikanz gewinnen.

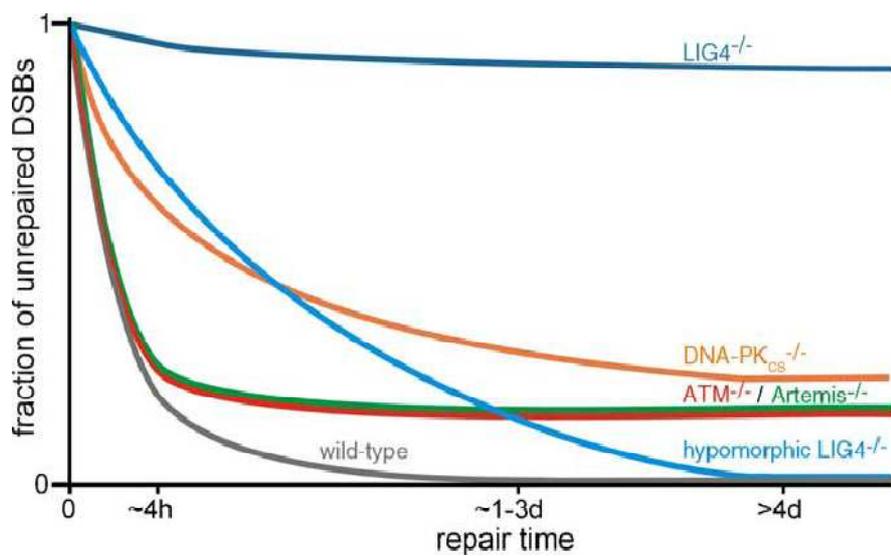


Abbildung 21: Übersicht der Reparaturkinetiken in Fibroblasten mit verschiedenen DNA-Reparaturdefekten nach Einzeitbestrahlungen mit 2Gy (Löbrich und Jeggo, 2005). Die Fibroblasten von $ATM^{-/-}$ -Mäusen zeigen initial nach Bestrahlung eine ähnliche Reparaturkinetik wie Wildtyp-Fibroblasten. Nach 4-24h nach Bestrahlung wird der DSB-Reparaturdefekt in den $ATM^{-/-}$ -Fibroblasten sichtbar. Artemis defiziente Fibroblasten weisen ein ähnliches Reparaturverhalten von strahleninduzierten DSBs auf. $ATM^{-/-}$ - und Artemis defiziente Zellen lassen einen Anteil von ca. 10% der induzierten DSBs über einen langen Zeitraum unrepariert. $DNA-PKcs^{-/-}$ defiziente Zellen zeigen initial nach Bestrahlung einen großen Reparaturdefekt, der nach 4-24h immer noch sehr stark ausgeprägt ist.

Da sowohl $ATM^{+/+}$ als auch $ATM^{+/-}$ -Zellen nach längeren Reparaturzeiten einen gewissen Anteil an strahleninduzierten DSBs unrepariert lassen, scheint es sich um eine besondere Klasse von DSBs zu handeln. Wird die Reparatur in Artemis defizienten Fibroblasten (Abbildung 21) betrachtet, so lassen diese ebenfalls einen gewissen Anteil an DSBs über einen langen Zeitraum unrepariert. Die Ähnlichkeiten der Reparaturkinetiken und der Strahlensensibilitäten zwischen $ATM^{-/-}$ - und $Artemis^{-/-}$ -Fibroblasten (Abbildung 21) lassen vermuten, dass sowohl ATM als auch Artemis am gleichen Weg in der DNA-Schadensantwort beteiligt sind. Die Nuklease Artemis besitzt eine Einzelstrang-Exonukleaseaktivität, die von 5' in 3' Richtung arbeitet. In Abhängigkeit von ATM und der $DNA-PKcs$ erhält Artemis eine zusätzliche Endonukleaseaktivität (O'Driscoll et al., 2004). Die Nukleaseaktivität von Artemis deutet darauf hin, dass es sich bei diesen DSBs um komplexe Brüche handelt, denn Artemis ist in der Lage einzelsträngige DNA-Überhänge, die im Fall von komplexen DSBs auftreten und mehrere Basenschäden enthalten, zu prozessieren. Die Reparatur von solchen DNA-Schäden ist deutlich komplizierter als bei einfachen DSBs

(Dianov, 2001), so dass eine Prozessierung des Schadens vor der Reparatur notwendig ist. Und für diesen Prozessierungsschritt scheint die Nuklease Artemis verantwortlich zu sein.

In weiteren Experimenten von Riballo et al. (Riballo et al., 2004) konnte bewiesen werden, dass die Nuklease Artemis und ATM am selben DSB-Reparaturweg fungieren. Unter Anwendung eines ATM spezifischen Inhibitors (KU-55933) wurde die Reparaturkapazität von KU-53933 behandelten Artemis defizienten Zellen, unbehandelten ATM^{-/-}-Zellen und KU-53933 behandelten ATM^{-/-}-Zellen verglichen, wobei alle drei Zelltypen identische Reparaturkinetiken aufwiesen.

5.3.3. Einschränkungen in der DSB-Reparatur als mögliche Ursache von strahlenbedingten Nebenwirkungen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde an SCID^{-/-} und AT-Tieren die Akkumulation von DNA-Schäden nach klinisch relevanten Fraktionierungsschemata untersucht. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass Reparatur defiziente Mäuse eine ausgesprochen starke Akkumulation von DSBs nach fraktionierter Bestrahlung aufweisen. Die starke Kumulation der DSBs bei SCID^{-/-}-Mäusen korreliert mit der sehr hohen Strahlenempfindlichkeit der Tiere. Diese Strahlenempfindlichkeit führte im 10Gy 72h-Punkt (5 x 2Gy) dazu, dass nur eine von vier SCID-Mäusen den Experimentpunkt überlebt hat. Diese sehr hohe Strahlenempfindlichkeit wurde ebenfalls von Riballo et al. 2004 in Experimenten an SCID^{-/-}-Fibroblasten beobachtet. Nach Applikation von Einzelfractionen von 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h ließen die Fibroblasten einen Anteil von ca. 15% an residuellen DSBs unrepariert. Die SCID^{-/-}-Zellen dieser Arbeit ließen einen Anteil von ca. 30% an unreparierten DSBs nach 24h Reparaturzeit zurück. Die Abweichung im Anteil an residuellen DSBs ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Riballo et al. einen um die Hälfte kürzeren Induktionszeitpunkt von 15 Minuten gewählt haben und zu diesem Zeitpunkt deutlich mehr Foci im Zellkern analysiert werden konnten. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass möglicherweise 30 Minuten nach Bestrahlung bereits ein gewisser Anteil an strahleninduzierten DSBs repariert ist. Zum anderen wurde die Analyse der DSBs mittels automatischer Bildanalysesysteme durchgeführt, in der zu jedem Reparaturzeitpunkt deutlich mehr Foci im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit gezählt worden sind, so dass die Abweichung möglicherweise auch auf die unterschiedliche methodische Auswertung zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen weiterhin, dass bereits geringe Einschränkungen in der DSB-Reparatur (ATM^{+/-}-Zellen) zu einem signifikanten Anstieg der residuellen DSBs nach

fraktionierter Bestrahlung führen. Selbst in Wildtypmäusen führt die fraktionierte Bestrahlung zu einem überproportionalen Anstieg an strahleninduzierten DSBs. Die während jeder Bestrahlung induzierten DSBs können in den Bestrahlungspausen von 24h nicht vollständig repariert werden und summieren sich mit jeder erneuten Bestrahlung auf. Die Ergebnisse der Arbeit liefern somit einen möglichen Ansatz, mit dem die stark variablen Nebenwirkungen im Normalgewebe bei Patienten nach fraktionierter Bestrahlung erklärt werden können. Mit dem Wissen, dass bereits geringe Einschränkungen in der DSB-Reparatur zu einem überproportionalen Anstieg an unreparierten DSBs führen, können die bereits beschriebenen Korrelationen zwischen $ATM^{+/-}$ -Merkmalsträger und schweren Strahlennebenwirkungen möglicherweise erklärt werden. Weiterhin existieren Hinweise dafür, dass je stärker die Akkumulationen von DSBs ist, desto mehr „misrepaired“ DSBs vorliegen, die zu Chromosomenaberrationen führen und somit ein erhöhtes Risiko für Tumorentstehung darstellen (Scherthan et al., 2008).

Derzeit existieren nur begrenzt Daten zur klinischen Strahlensensibilität von AT heterozygoten Patienten. Der Brustkrebs ist, wie bereits erwähnt, der am besten untersuchte solide Tumor bei AT-Patienten. Die klinische Strahlensensibilität von heterozygoten AT Brustkrebspatientinnen wird in Studien äußerst kontrovers diskutiert. Weissberg et al. 1998 berichten über 11 AT heterozygote Brustkrebspatientinnen, bei denen keine gesteigerten strahlenbedingten Akut- und Spättoxizitäten nach konventionell fraktionierter Bestrahlung beobachtet werden konnten. Dagegen postuliert Iannuzzi et al. 2002 eine Analyse, die eindeutig gesteigerte subkutane Spättoxizitäten nach Bestrahlung bei drei AT heterozygoten Patientinnen, die Träger von seltenen AT Missense-Mutationen waren, zeigt.

Allen Studien gemeinsam ist das Problem der genauen Aufschlüsselung der ATM Mutationen bzw. Polymorphismen. Bis zum heutigen Stand der Wissenschaft sind über 400 Mutationen im ATM Gen bekannt, so dass sich der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen dem Gen und erhöhter Strahlensensibilität als schwierig gestaltet.

Dennoch weisen die Ergebnisse der Arbeit daraufhin, dass geringe DSB-Reparatureinschränkungen zu einem überproportionalen Anstieg an residuellen DSBs führen und dies möglicherweise ein Hinweis für eine erhöhte klinische Strahlensensibilität ist, die sich in der Ausbildung von schweren Akut- bzw. Spättoxizitäten äussert.

5.3.3.1. Zukünftige klinische Konsequenz

Unter Berücksichtigung der erhöhten Strahlenempfindlichkeit sowie des erhöhten Krebsrisikos bei geringen DSBs-Reparatureinschränkungen wäre es wünschenswert, Patienten, die sich einer Strahlentherapie unterziehen müssen, diese im Vorfeld einer Therapie auf DSBs-Reparaturdefekte hin zu untersuchen. Solch eine präklinische Untersuchung auf DNA-Reparatureinschränkungen müsste jedoch an möglichst gut zugänglichen Zellen durchgeführt werden, um eine zusätzliche Belastung der Patienten zu vermeiden. Im Labor für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes wurde in weiterführenden Experimenten die Reparatur von strahleninduzierten DSBs in Blutlymphozyten im Vergleich zu Zellen des Normalgewebes von SCID-, BALBc-, AT- und C75BL/6 Mäusen analysiert. Dabei war die Reparatur von strahleninduzierten DSBs in peripheren Blutlymphozyten mit der Reparatur im Normalgewebe vergleichbar (Rübe et al., 2008). Vor diesem Hintergrund könnte die Analyse von menschlichen Blutlymphozyten vor einer strahlentherapeutischen Behandlung in Zukunft eine routinemäßige Untersuchung darstellen. Die sich im peripheren Blut der Patienten befindenden Lymphozyten werden im Labor isoliert, bestrahlt und mit der γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung gefärbt, um daraufhin strahleninduzierten DSBs zu quantifizieren. Für Patienten, die im Rahmen einer solchen Untersuchung auffällig werden, müssen das Nutzen-Risiko-Verhältnis einer Bestrahlung sowie die verabreichten Bestrahlungsdosen genau abgewogen werden, um ausgeprägte Strahlennebenwirkungen zu vermeiden.

Andererseits gibt es Hinweise dafür, dass zugrunde liegende heterozygote Mutationen in DSB-Reparaturgenen ($ATM^{+/-}$ -Zellen) möglicherweise aufgrund der eingeschränkten Reparaturkapazität strahleninduzierter Schäden strahlensensibilisierend auf Tumorzellen wirken (Su und Swift, 2001). Aufgrund der gesteigerten zellulären Strahlensensibilität könnten Patienten mit DSB-Reparaturdefekten von einer Durchführung einer strahlentherapeutischen Behandlung besonders profitieren und sich gerade deshalb für Studien zur Durchführung einer Volumen- und Dosisreduktion qualifizieren.

5.4. Organunabhängige Reparatur von strahleninduzierten DSBs

Die fraktionierte Bestrahlung gewährleistet eine Schonung des Normalgewebes, in dem die gesunden Zellen einen gewissen Anteil an subletalen DNA-Schäden während der Bestrahlungspausen reparieren können. Dabei existiert ein deutlicher Unterschied zwischen

frühreagierendem Gewebe, wie dem sehr strahlensensiblen Dünndarm und spätreagierendem Gewebe wie der Lunge und der Niere. Zwischen beiden Gewebearten variiert die Halbwertszeit, in der die Zellen den entstandenen Zellschaden reparieren können, so dass frühreagierendes Gewebe sehr viel strahlensensibler als spätreagierendes Gewebe ist (Thames, 1984). Aber auch innerhalb des spätreagierenden Normalgewebes bestehen Unterschiede in Ausbildung und Schwere von Nebenwirkungen, die nach klinisch relevanten Fraktionierungsschemata auftreten. Im Rahmen der Experimente wurden sowohl die Organe Lunge und Niere als zwei Vertreter von spätreagierendem Gewebe als auch der Dünndarm als ein Vertreter des frühreagierenden Gewebes bezüglich Unterschiede in der Induktion und der Reparatur von strahleninduzierten DSBs analysiert und untereinander verglichen. Es konnte jedoch zu keinem Reparaturzeitpunkt ein Unterschied in der DSB-Reparatur in Lunge, Niere und Dünndarm während klinisch relevanter Fraktionierungsschemata beobachtet werden.

Die klinische Strahlensensibilität eines Organs kann somit nicht durch das Reparaturverhalten von DSBs erklärt werden. Experimente an C57BL/6-Mäusen, in denen die Tiere mit 0,1Gy, 0,5Gy und 2Gy bestrahlt wurden, zeigen ebenfalls identische und organunabhängige Kinetiken in der γ H2AX-Focireduktion (Rübe et al., 2008). Die Annahme, dass der histologische Aufbau in Zellen ursächlich für die Strahlensensibilität in früh- bzw. spätreagierendem Gewebe verantwortlich ist, ist demnach nicht zu beobachten. Die Zerstörung der schnell proliferierenden Stammzellen des Dünndarms nach Bestrahlung äußert sich nicht in einer stärkeren Akkumulation von residuellen DSBs.

Die in dieser Arbeit analysierten Flimmerepithelzellen der Lunge und die Tubulusepithelzellen der Niere bestanden hauptsächlich aus Zellen, die sich in der G0 oder G1-Phase des Zellzyklus befinden. Zellen in diesen Phasen des Zellzyklus scheinen DSBs organunabhängig ohne erkennbaren Unterschied in der DSB-Reparatur zu reparieren. Es müssen dementsprechend andere Faktoren für die unterschiedlichen Strahlensensibilitäten der Organe eine Rolle spielen. Als Ursachen der verschiedenen klinischen Strahlenempfindlichkeiten der Organe scheinen eine Reihe von Prozessen wie unterschiedliche Regenerationsraten, Seneszenz, Einleitung der Nekrose sowie epigenetische Faktoren eine Rolle zu spielen. Zellen eines Vielzelllers sind zwar genetisch homogen angelegt, besitzen jedoch strukturelle und funktionelle Heterogenität bezüglich ihrer unterschiedlich exprimierten Gene. Diese organspezifischen Unterschiede sind für die Entwicklung und Differenzierung der Zellen von Bedeutung und werden als „epigenetisch“ bezeichnet. Beispiele sogenannter epigenetischer Prozesse sind DNA-Methylierung und

Histonmodifikation (Jaenisch und Bird, 2003). Diese Prozesse werden jedoch mit in dieser Arbeit verwendeten γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung nicht betrachtet. Des Weiteren wurden mit Wahl der Reparaturzeitpunkte nur Effekte der kurzfristigen Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen und keine langfristigen Effekte analysiert.

6. Zusammenfassung

Mit Hilfe des in der Arbeit verwendeten in vivo Modells kann erstmalig gezeigt werden, dass strahleninduzierte DSBs im Rahmen einer fraktionierten Bestrahlung im Gewebe akkumulieren. Die Arbeit zeigt, dass selbst geringe DSB-Reparatureinschränkungen zu einem überproportionalen Anstieg an DSBs führen und dies vermutlich für die Ausbildung von Nebenwirkungen im Normalgewebe verantwortlich ist. Dieses in vivo Modell gewährleistet die Beobachtung der Reparatur von DSBs innerhalb der jeweiligen gewebespezifischen Umgebung und stellt somit eine Grundlage dar, mit dem die komplexen Interaktionen auf molekularer und zellulärer Ebene, die für die Ausbildung von strahleninduzierten Nebenwirkungen verantwortlich sind, in Zukunft besser erkannt und verstanden werden können.

7. Literatur

1. Adams MM und Carpenter PB: Tying the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1. *Cell Div.* 2006; 31: 1-19
2. Andreassen CN, Overgaard J, Alsner J, Overgaard M, Herskind C, Cesaretti JA, Atencio DP, Green S, Formenti SC, Stock RG, Rosenstein BS.: ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 64(3):776-83
3. Arlett Colin F., Lowe Jillian E., Harcourt Susan A., Waugh Alastair P. W. , Cole Jane, Roza Leendert, . Diffey Brian L, Mori Toshio, Nikaido Osamu, und Green Michael: Hypersensitivity of human lymphocytes to UV-B and solar irradiation. *Cancer Res.* 1993; 53(3): 609-614
4. Bakkenist CJ und Kastan MB: DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003; 421: 499–506
5. Bakkenist CJ und Kastan MB: Phosphatases join kinases in DNA-damage response. *Trends Cell Biol.* 2004; 14(7):339-41
6. Bartek J. und Lukas J. Mammalian: G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13(6): 738-747
7. Bayle HJ, Elenbaas B, and Levine AJ: The carboxylterminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 5729-5733
8. Becker-Catania SG, Chen G, Hwang MJ, Wang Z, Sun X, Sanal O, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Chessa L, Lee EY, Gatti RA.: Ataxia-telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations and radiosensitivity. *Mol Genet Metab.* 2000; 70(2):122-33
9. Bekker-Jensen S. , Lukas Claudia, Kitagawa Risa, Melander Fredrik, Kastan Michael, Bartek Jiri und Lukas Jiri: Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol.* 2006; 173(2): 195-206
10. Belani CP, Wang W, Johnson DH, Wagner H, Schiller J, Veeder M, Mehta M: Phase III study of the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG 2597): induction chemotherapy followed by either standard thoracic radiotherapy or hyperfractionated accelerated radiotherapy for patients with unresectable stage IIIA and B non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(16):3760-7
11. Böcker W. und Iliakis G.: Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells. *Radiat Res.* 2006; 165(1):113-24

12. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y.: GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(12):957-67
13. Broeks A., Urbanus HJ, Floore AN, Dahler EC, Klijn JG, Rutgers EJ, Devilee P, Russell NS, van Leeuwen FE, van Veer LJ: ATM heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. *Am J Hum Genet*. 2000; 66:494-500
14. Burma S., Chen Benjamin P., Murphy Michael, Kurimasa Akihiro und Chen David J.: ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Biol Chem*. 2001; 276(45): 42462-42467
15. Canman CE und Lim DS: The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene* 1998; 17(25):3301-8
16. Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig; A.Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*. 2003; 5(7):675-9
17. Cesaretti JA, Stock RG, Lehrer S, Atencio DA, Bernstein JL, Stone NN, Wallenstein S, Green S, Loeb K, Kollmeier M, Smith M, Rosenstein BS.: ATM Sequence Variants are Predictive of Adverse Radiotherapy Response Among Patients Treated for Prostate Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61:196-202.
18. Chan DW, Chen BP, Prithivirajasingh S, Kurimasa A, Story MD, Qin J, Chen DJ.: Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev*. 2002; 16(18):2333-8
19. Charles River Laboratories Severe Combined Immunodeficiency 2004
20. Chenevix-Trench, G., Spurdle, A.B., Gatei, M., Kelly, H., Marsh, A., Chen, X., Donn, K., Cummings, M., Nyholt, D., Jenkins, M.A., Scott, C., Pupo, G.M., Dork, T., Bendix, R., Kirk, J., Tucker, K., McCredie, M.R., Hopper, J.L., Sambrook, J., Mann, G.J. und Khanna, K.K: Dominant negative ATM mutations in breast cancer families. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94:205-21
21. Chistiakov Dimitry A.; Voronova Natalia V.; Chistiakov Pavel A. : Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncologica*. 2003
22. Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J.: gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell*. 2005; 20(5):801-9
23. Correlagen-Diagnostics Severe Combined Immunodeficiency SCID - including Omenn Syndrome and Zap-70 Deficiency. Correlagen Diagnostics Inc. 2006

24. Dianov GL, O'Neill P, Goodhead DT: Securing genome stability by orchestrating DNA repair: removal of radiation-induced clustered lesions in DANN. *Bioessays*. 2001; 23(8):745-9: Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(16):5836-48
25. DiTullio RA Jr, Mochan TA, Venere M, Bartkova J, Sehested M, Bartek J, Halazonetis TD.: 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol*. 2002; 4: 998-1002
26. Dörk T., Bremer M., Karstens H.J., Sohn C.: Brustkrebs und Strahlensensibilität: eine gemeinsame erbliche Veranlagung? *Thieme Journals*. 2002; 62:1162-1169
27. Dörr W. und Herrmann Th. *Im Focus Onkologie: Strategien zur Begrenzung des Organsschaden*. ASORS. 2007
28. Douglas P, Sapkota GP, Morrice N, Yu Y, Goodarzi AA, Merkle D, Meek K, Alessi DR, Lees-Miller SP.: Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Biochem J*. 2002; 368(Pt 1):243-51
29. Downey M. und Durocher D. gamma H2AX as a Checkpoint Maintenance Signal. *Cell Cycle*. 2006; 5(13):1376-81
30. Fernandez-Capetillo Oscar. Chen Hua-Tang, Celeste Arkady, Ward Irene, Romanienko Peter J., Morales Julio C., Naka Kazuhito, Xia Zhenfang, Camerini-Otero R. Daniel, Motoyama Noboru., Carpenter Phillip B, Bonner William M., Chen Junjie, Nussenzweig André :DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(12): 993-997
31. Fernet M. und Hall J. Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. *DNA Repair* 2004; 3(8-9):1237-43 Review
32. Furuta Takahisa, Haruyuki Takemura, Zhi-Yong Liao, Gregory J. Aune, Christophe Redon, Olga A. Sedelnikova, Duane R. Pilch, Emmy P. Rogakou, Arkady Celeste, Hua Tang Chen, Andre Nussenzweig, Mirit I. Aladjem, William M. Bonner und Yves Pommier: Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replicationdependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem*. 2003; 278(22): 20303-20312
33. Gatti Richard A., Tward Aaron und Concannon Patrick: Cancer risk in AT heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab*. 1999; 68: 419-423
34. Gedik C. M., Ewen S. W. B., Collins A. R. : Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol*. 1992; 62(3): 313-320

35. Goodarzi AA, Yu Y, Riballo E, Douglas P, Walker SA, Ye R, Härer C, Marchetti C, Morrice N, Jeggo PA, Lees-Miller SP.: DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* 2006; 25(16):3880-9
36. Goodhead D. T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DANN. *Int J Radiat Biol.* 1994; 65(1): 7-17
37. Green M. H. [et al.] Effect of deoxyribonucleosides on the hypersensitivity of human peripheral blood lymphocytes to UV-Band UV-C irradiation. *Mutat Res.* 1994; 315(1): 25-32
38. Gregoire V.: Tumor control probability (TCP) and normal tissue complication probability (NTCP) in head and neck cancer. *Rays.* 2005; 30:105-108
39. Haber JE: Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.* 2000; 16(6):259-64 Review
40. Hall Eric J. und Giaccia Amato J. (200) *Radiobiology for the Radiologist.* Williams und Wilkins, Lippincott
41. Hammarsten O. und Chu G. DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(2):525-30
42. Hermann und Baumann (1997) *Klinische Strahlentherapie* M Gustav Fischer Verlag
43. Hoeijmakers J. H.: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001; 411(6835): 366-374
44. Höller U. und Feyer P. *Im Fokus Onkologie: Pneumotoxizität unter Strahlentherapie* 2007
45. Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhattar V, Bedford MT, Jenuwein T und Berger SL: p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* 2007; 449: 105-108
46. Iannuzzi CM, Atencio DP, Green S, Stock RG, Rosenstein BS.: ATM mutations in female breast cancer patients predict for an increase in radiation-induced late effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002; 52(3):606-13.
47. Iijima K, Ohara M, Seki R, Tauchi H.: Dancing on damaged Chromatin: Functions of ATM and RAD50/MRE11/NSB1 Complex in cellular Response to DNA Damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 52(3):606-13 Review
48. Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S.: Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:6098-6102
49. Jackson SP: Sensing and repairing DNA double strand breaks. *Carcinogenesis* 2002, 23(5):687-96 Review
50. Jackson-Laboratory Jax Mice Data Sheet 2007

51. Jaenisch R. und Bird A. : Epigenetic regulation of gene expression:how the genome intergrates intrinsic and enviromental signals. *Nature Genetics* . 2003; 245 - 254
52. Jeggo P. und Löbrich M.: Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry*. 2006; 122(1-4):124-7
53. Kao GD, McKenna WG, Yen TJ. : Detection of repair activity during the DANN damage-induced G2 delay in human cancer cells. *Oncogene* 2001; 3486-34
54. Kannah K K und Jackson SP: DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001; 27(3):247-54 Review
55. Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Little JB, Bedford JS.: Levels of gamma H2AX foci after low- dose- rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two AT families and in another apparently normal individual. *Radiat Res*. 2006; 166(3):443-53
56. Koike M, Sugasawa J, Yasuda M, Koike A.: Tissue-specific DNA-PK-dependent H2AX phosphorilisation and γ H2AX elimination after X-irradiation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 376(1):52-5
57. Kozlov SV, Graham ME, Peng C, Chen P, Robinson PJ, Lavin MF.: Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J*. 2006; 25(15):3504-14
58. Kurz und Lees-Miller DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair*. 2004; 3(8-9):889-900 Review
59. Kühne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Löbrich M.: A Double-Strand Break Repair Defect in ATM-Deficient Cells Contributes to Radiosensitivity. *Cancer Res*. 2004; 64(2):500-8
60. Lavin MF: Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(10):759-69
61. Lee JH und Paull TT.: ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. 2005; 308(5730):1870
62. Liao H, Winkfein RJ, Mack G, Rattner JB, Yen TJ.: CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J. Cell Biol*. 1995; 130, 507-518
63. Löbrich M. und Jeggo PA. : Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair* 2005; 4(7):749-59
64. Löbrich M. und Jeggo PA. :The two edges of the ATM sword: Co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother Oncol*. 2005; 76(2):112-8
65. Löbrich M. und Jeggo PA .: The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(11):861-

66. Lou Zhenkun, Chen Benjamin Ping-Chi, Asaithamby Aroumougame, Minter-Dykhouse Katherine, Chen David J. und Chen Junjie: MDC1 regulates DNA-PK autophosphorylation in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 2004; 279(45):46359-62
67. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP: Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J.* 2009; 417(3):639-50 Review
68. Mannironi C, Bonner WM, Hatch CL. : H2A.X. a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals *Nucleic. Acids Res.* 1989; 17(22): 9113-9126
69. Mavrou A, Tsangaris GT, Roma E, Kolialexi A.: The ATM Gene and Ataxia Telangiectasia. *Anticancer Res.* 2008; 28(1B):401-5 Review
70. Meyn MS : Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet.* 1999; 55(5):289-304 Review
71. Modesti M. und Kanaar R. DNA repair: spot(light)s on chromatin. *Curr Biol.* 2001; 11(6):R229-32 Review
72. 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.: Artemis, A Novel DNA Double Strand-Break Repair/ VDJ Recombination Protein is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency. *Cell.* - 2001; 105(2):177-86
73. Neubauer S., Arutyunyan R, Stumm M, Dörk T, Bendix , Bremer M, Varon R, Sauer R, Gebhart E: Radiosensitivity of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome homo- and heterozygotes as determined by three-colour-FISH chromosome painting. *Radiat Res.* 2002; 157:312-321
74. Nikjoo H, O'Neill P, Goodhead DT, Terrissol M.: Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *Int J Radiat Biol.* 1997; 71(5): 467-483
75. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martínez-López W, Folle GA, Drets ME.: Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2002; 504(1-2): 17-36
76. O'Driscoll M, Gennery AR, Seidel J, Concannon P, Jeggo PA.: An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair .* 2004; 3(8-9):1227-35

77. Offit K, Gilad S, Paglin S, Kolachana P, Roisman LC, Nafa K, Yeugelewitz V, Gonzales M, Robson M, McDermott D, Pierce HH, Kauff ND, Einat P, Jhanwar S, Satagopan JM, Oddoux C, Ellis N, Skaliter R, Yahalom J.: Rare variants of ATM and risk for Hodgkin's disease and radiation-associated breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(12):3813-9
78. Olive PL, Banáth JP, Durand RE.: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.* 1990; 122(1): 86-94
79. Olive P.L. und Banath J. P.: Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. *Int J Radiat Biol.* 1993; 64(4): 349-358
80. Olive P.L.: The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res.* 1998. 150(5 Suppl): S42-51
81. Ostling O. und Johanson K. J.: Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1987; 52(5): 683-691
82. Park EJ, Chan DW, Park JH, Oettinger MA, Kwon J. : DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner *Nucleic. Acids Res.* 2003.; 31(23): 6819-6827
83. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM.: A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* 2000; 10(15): 886-895
84. Pearce A. K. und Humphrey T. C.: Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint
85. Pollard JM und Gatti RA : Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: An overview. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009; 74(5):1323-31
86. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. : A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389: 300-305
87. Povirk LF, Wübter W, Köhnlein W, Hutchinson F. : DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin. *Nucleic Acids Res.* 1997; 4(10): 3573-3580
88. Powell S. und McMillan T. J.: DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiother Oncol.* 1990; 19(2): 95-108
89. Prokopcova J, Kleibl Z, Banwell CM, Pohlreich P.: The role of ATM in breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 104(2):121-8

90. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W.: Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12(2):162-9
91. Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA. : gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood. *Adv Space Res.* 2008; 43(8):1171-1178
92. Riballo E, Kühne 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, Löbrich M.: A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis and proteins locating to gamma H2AX foci. *Mol Cell.* 2004; 16(5):715-24
93. Rich T, Allen RL, Wyllie AH.: Defying death after DNA damage. *Nature.* 2000; 407(6805): 777-783
94. Rieger KE, Hong WJ, Tusher VG, Tang J, Tibshirani R, Chu G.: Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(17):6635-40
95. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J : Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(8):973-9
96. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM.: DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139*. *J Biol Chem.* 1997; 273(10):5858-68
97. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. : Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo. *J Cell Biol.* 1999; 146(5):905-16
98. Rothkamm K. und Löbrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(9):5057-62
99. Rube CE, Uthe D, Wilfert F, Ludwig D, Yang K, König J, Palm J, Schuck A, Willich N, Remberger K, Rube C. : The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005; 61(5):1482-92
100. Rube CE, Dong X, Kühne M, Fricke A, Kaestner L, Lipp P, Rube C. : DNA double-strand break rejoining in complex normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 72(4):1180-7
101. Rube CE, Grudzinski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rube C.: DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res.* 2008 - 14(20):6546-55.

102. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y.: A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*. 1995; 1749-1753
103. Scherthan H, Hieber L, Braselmann H, Meineke V, Zitzelsberger H. : Accumulation of DSBs in gamma-H2AX domains fuel chromosomal aberrations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 371(4): 694-697
104. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD.: p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*. 2000; 151(7): 1381-1390
105. Scott SP, Bendix P, Chen P, Clark R, Dörk T, Lavin MF: Missense mutations but not allelic variants alter the function of ATM by dominant interference in patients with breast cancer. *PNAS*. 2002, 99:925-930
106. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. : Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res*. 2002; 158, 486-492.
107. Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM.: Histone H2AX in DANN damage and repair. *Cancer Biol*. 2003; 2, 233-235.
108. Shiloh Y .: ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(3):155-68
109. Shiloh Y.: The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci*. 2006; 31(7):402-10
110. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA.: Regulation of DNA double strand break repair pathway choice. *Cell Res*. 2008; 18(1):134-47 Review
111. Smith GC, Divecha N, Lakin ND, Jackson SP. : DNA-dependent protein kinase and related proteins. *Biochem Soc Symp*. 1999; 64:91-104
112. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA.: ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer Res*. 2004; 64(7):2390-6
113. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, A. Taylor MR und Elledge SJ: MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*. 2003; 421(6926): 961-966
114. Stürzbecher HW, Donzelmann B, Henning W, Knippschild U, Buchhop S.: p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J*. 1996; 15:1992-2002

115. Su Y. und Swift M. Outcomes of adjuvant radiation therapy for breast cancer in women with ataxia telangiectasia. *N Engl J Med.* 1991; 325:1831-1836
116. Svensson JP, Stalpers LJ, Esveldt-van Lange RE, Franken NA, Haveman J, Klein B, Turesson I, Vrieling H, Giphart-Gassler M.: Analysis of gene expression using gene sets discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity. *PLoS Med.* 2006; 3(10):e42
117. Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T, Van Dyke T. : p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell.* 1994; 8: 703-711
118. Taylor: Unrepaired DNA strand breaks in irradiated ataxia teleangiectasia lymphocytes suggested from cytogenetic observation. *Mutat Res.* 1978; 50(3):407-18
119. Thames : Effect-independent measures of tissue responses to fractionated irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1984; 45(1):1-10
120. Trott und Kummermehr: Rapid repopulation in radiotherapy: a debate on mechanism Accelerated repopulation in tumours and normal tissues. *Radiother Oncol.* 1991; 22: 159-160
121. Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Odén A.: Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996; 36: 1065-1075
122. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. : Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* 2003; 22(20):5612-21
123. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. : Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet.* 2001, 2(3): 196-206
124. Varghese S, Schmidt-Ullrich RK, Dritschilo A, Jung M. : Enhanced radiation late effects and cellular radiation sensitivity in an ATM heterozygous breast cancer patient. *Radiat Oncol Investig.* 1999; 7: 231-237
125. Vijayalaxmi, Strauss GH, Tice RR.: An analysis of gamma-ray-induced DNA damage in human blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes *Mutat Res.* 1993; 292(2): 123-128
126. Wallesch Claus-Werner (2005) *Neurologie: Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis*, Elsevier Urban & Fischer
127. Wang S, Guo M, Ouyang H, Li X, Cordon-Cardo C, Kurimasa A, Chen DJ, Fuks Z, Ling CC, Li GC.: The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 1584-1588
128. Wannemacher M., Debus J. und Wenz F. (2006) *Strahlentherapie*; Springer Verlag

129. Ward I. M. und Chen J.: Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem.* 2001; 276(51): 47759-47762
130. Weissberg JB, Huang DD, Swift M.: Radiosensitivity of normal tissue in ataxia telangiectasia heterozygotes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998; 42:1133-1136
131. West MH und Bonner WM : Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry.* 1980; 19(14):3238-45
132. West CM, Elyan SA, Berry P, Cowan R, Scott D.: A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia telangiectasia (AT) and heterozygotes. *Int J Radiat Biol.* 1995; 68:197-203
133. Weterings E. und Chen DJ: The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* 2008; 18(1):114-24
134. Wolkowicz R, Peled A, Elkind NB, Rotter V.: Augmented DNA-binding activity of p53 protein encoded by a carboxyl-terminal alternatively spliced mRNA is blocked by p53 protein encoded by the regularly spliced form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 6842-6846
135. Xu X und Stern DF: NFB1/MDC1 regulates ionizing radiation-induced focus formation by DNA checkpoint signaling and repair factors. *FASEB J.* 2003; 17(13):1842-8
136. Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ.: ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis.* 2003. 24(10):1571-80

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die Anzahl der Experimente Einzeitbestrahlung Lunge	33
Tabelle 2:	Übersicht über die Anzahl der Experimente Einzeitbestrahlung Niere	33
Tabelle 3:	Fraktionierungsschema	33
Tabelle 4:	Übersicht über die Anzahl der Experimente fraktionierte Bestrahlung Lunge	34
Tabelle 5:	Übersicht über die Anzahl der Experimente fraktionierte Bestrahlung Niere	34
Tabelle 6:	Einzeitbestrahlung: Darstellung der exakten Signifikanz (1-seitig) berechnet nach dem Mann- Whitney-Test	43
Tabelle 7:	Fraktionierte Bestrahlung: Darstellung der exakten Signifikanz (1-seitig) berechnet nach dem Mann-Whitney-Test	48

9. Bildverzeichnis

Abbildung 1:	Direkte und indirekte Wirkung ionisierender Strahlung (Hall und Giacci, 2000)	8
Abbildung 2:	Effekt der Fraktionierung einer Dosis auf das Zellüberleben nach Elkind und Sutton 1960 (Michael Wannemacher et al., 2006)	12
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der zellulären Schadensantwort einer Zelle (Khanna und Jackson, 2001)	14
Abbildung 4:	ATM und seine Rolle in der zellulären Schadensantwort (modifiziert nach Kurz u. Lees-Miller, 2004).	16
Abbildung 5:	Reparatur von DSBs: NHEJ und HR (Löbrich und Jeggo, 2007)	22
Abbildung 6:	Beispiel für eine Amplifikationskurve unter Verwendung der Neo Generic Primer	29
Abbildung 7:	Beispiel für eine Amplifikationskurve unter Verwendung der Wildtyp-Primer	29
Abbildung 8:	Beispiel von Schmelzkurven nach Durchführung der Wildtyp-PCR	30

Abbildung 9:	Computertomographie-Plan der Ganzkörperbestrahlung	31
Abbildung 10:	Darstellung der Isodosenverteilung	32
Abbildung 11:	Darstellung der Poissonverteilung für den 2Gy 0,5h-Punkt in ATM ^{+/+} und ATM ^{+/-} -Lungenzellen	38
Abbildung 12:	Darstellung der Poissonverteilung für den 2Gy 5h-Punkt in ATM ^{+/+} und ATM ^{+/-} -Lungenzellen	39
Abbildung 13:	Darstellung der Ergebnisse: Unbestrahlte Kontrollen	40
Abbildung 14:	Darstellung der Ergebnisse: Einzeitbestrahlung Lunge	42
Abbildung 15:	Darstellung der Ergebnisse: Einzeitbestrahlung Niere	42
Abbildung 16:	Bilder der γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung nach Einzeitbestrahlung in Lungen- und Nierenzellen von ATM ^{+/+} und ATM ^{+/-} -Mäusen	44
Abbildung 17:	Darstellung der Ergebnisse: Fraktionierte Bestrahlung Lunge	47

Abbildung 18:	Darstellung der Ergebnisse: Fraktionierte Bestrahlung Niere	47
Abbildung 19:	Bilder der 53BP1/ γ H2AX-Doppelfärbung in Lungenzellen von ATM ^{+/+} , ATM ^{+/-} und SCID-Mäusen nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h.	49
Abbildung 20:	Bilder der 53BP1/ γ H2AX-Doppelfärbung in Nierenzellen von ATM ^{+/+} , ATM ^{+/-} und SCID-Mäusen nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 2Gy und einer Reparaturzeit von 24h.	50
Abbildung 21:	Übersicht der Reparaturkinetiken in Fibroblasten mit verschiedenen DNA-Reparaturdefekten nach einer Bestrahlungsdosis von 2GY. (Löbrich et al., 2005)	58

10. Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53 bindenes Protein; DNA Checkpoint Protein
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AT	Ataxia telangiectasia
ATM	Ataxia telangiectasia mutated protein
ATR	Ataxia telangiectasia Rad3 related protein
BRCA	breast cancer gene
Cdc	Cell division control protein
Cdk	Cyclin dependent kinase
Chk	Checkpoint" Kinase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit der DNA- abhängigen Proteinkinase
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphate
DSB	Doppelstrangbruch
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HR	Homologe Rekombination
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint 1
Mdm2	"mouse double minute clone2"
MRE11	DNA-Reparatur-Komplex
NHEJ	Nicht-homologes Endjoining
NS	Normales Kälberserum
NSB1	DNA-Reparatur-Komplex

p53	Tumorsuppressorprotein p53
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung; pH 7,2-7,4
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-like-kinase
Rad	Radiation sensitivity abnormal/yeast RAD-related
RPA A	Replikationsprotein A
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt
SYBR Green I	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)- propylamino]-1-phenyl- 1H-chinolin-4-ylidenmethyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
TRAP-Domäne	transactivation/transformation domain-associated protein
XLF	XRCC4-like Faktor; Protein im NHEJ
XRCC4	“X-Ray Cross Complementation group 4 Protein“

11. Publikationen/Dank

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Homburg (Saar) *Herrn Prof. Dr. med. Ch. Rübe* und der Leiterin des Labors für molekulare Radioonkologie des Universitätsklinikums Homburg (Saar) *Frau PD Dr. med. C. E. Rübe* für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit als Medizinstudent in einem experimentellen Umfeld tätig zu sein.

Daniela Ludwig möchte ich für die Genotypisierung der Mäuse danken.

Egil Gleditsch danke ich für die Hilfe bei der Präparation der Organe.

Andreas Fricke möchte ich für die angenehme und hilfreiche Zusammenarbeit im Labor danken.

Annika Stützel danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung in der Experimentierphase.

Martin Kühne möchte ich für seine unermüdliche Unterstützung bei der Durchsicht der Arbeit danken.

Meiner Familie danke ich für die tolle Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem *Ehemann*, der besonders in der Zeit des Schreibens viel Geduld aufbringen musste.

Rübe CE, Fricke A, *Wendorf J*, Stützel A, Kühne M, Ong MF, Lipp P, Rübe C

Accumulation of DNA double-strand breaks in normal tissues after fractionated irradiation.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010 Mar 15;76(4):1206-13