

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/ Saar
Direktor: Univ. Prof. Dr. Ch. Rube

Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in murinem Nierengewebe

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

vorgelegt von: Christoph Edzard Seifert
geboren am: 29. Juli 1978 in Köln

Inhalt	Seite
1 Zusammenfassung	06
Summary	07
2 Einleitung	08
2.1 Wirkung ionisierender Strahlung	08
2.1.1 Akute und späte strahleninduzierte Normalgewebs-Toxizitäten	08
2.1.2 Strahlenschäden in der Niere	10
2.1.3 Klinische Symptomatik eines Strahlenschadens in der Niere	10
2.2 Niere in der Strahlentherapie	13
2.3 Schädigungen und Reparatur der Desoxyribonukleinsäure	15
2.4 DNA-Doppelstrangbruch	18
2.4.1 Homologe Rekombination	19
2.4.2 Nicht homologe End-joining	22
2.5 Zentrale Proteine der DSB-Reparatur	25
2.5.1 Histon γ -H2AX	25
2.5.2 ATM-Proteinkinase und MRN-Komplex	29
2.5.3 Ataxia telangiectasia-like disorder	31
2.5.4 DNA-abhängige Proteinkinase	32
2.6 Ziele der Arbeit	34
3 Material und Methoden	35
3.1 Mausstämme	35
3.2 Versuche	37
3.3 Gewebeprobengewinnung	40
3.3.1 Immunhistologische Färbung für γ -H2AX-IRIF	40
3.3.2 Immunfluoreszenz-Färbung für γ -H2AX-IRIF	42
3.4 Quantitative Auswertung der γ -H2AX-IRIF	43

Inhalt	Seite
4 Ergebnisse	44
4.1 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere	45
4.2 DNA-Doppelstrangbruchreparatur in der Niere	47
5 Diskussion	52
5.1 Beobachtungen zur Methodik	52
5.2 Diskussion der Versuchsergebnisse	54
5.3 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Mausegeweben	57
5.4 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	58
6 Quellen	60
7 Danksagungen	85
8 Lebenslauf	86

Abkürzungen

γ -H2AX	Phosphoryliertes Histon H2AX
ATLD	Ataxia telangiectasia-like disorder
ATM	Proteinkinase Ataxia telangiectasia-mutated
B-NHEJ	backup-NHEJ
bp	Basenpaare
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase aus den Untereinheiten KU 70, KU 80 und DNA-PK _{CS}
D-NHEJ	DNA-PK abhängiges NHEJ
DNA, DNS	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EBS	DNA-Einzelstrangbruch
eV	Elektronenvolt
Gy	Energiedosis: 1 Gray [Gy] = 1 Joule [J] pro Kilogramm [kg]
HR	Homologe Rekombination
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10. Ausgabe
MRN	Komplex aus Proteinen MRE11, RAD50, NBS1
mRNA	Messenger-RNA
NHEJ	non homologous end-joining, Nicht homologe End-joining
PBS	Phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Salzlösung
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Disorder
ssDNA	3'-Überhang aus DNA-Einzelstränge an DSB
Sv	Äquivalentdosis: 1 Sievert [Sv] = 1 Joule [J] pro Kilogramm [kg]

1 Zusammenfassung

Ziele der Arbeit

Bei radioonkologischen Patienten werden eine Vielzahl von Bestrahlungsreaktionen beobachtet. Deren Auftreten ist je nach bestrahltem Organ zeitlich und interindividuell verschieden. Der Doppelstrangbruch der DNA (DSB) durch ionisierende Strahlung wird als ein biologisch bedeutsamer Schaden angesehen. Eine gestörte DSB-Reparatur gefährdet einen Organismus. Einer der ersten Reparatur-schritte ist die Phosphorylierung der DSB-nahen H2AX-Histone. Diese strahleninduzierten Einheiten, ionizing radiation induced foci (IRIF), werden als γ -H2AX-IRIF bezeichnet. Für die vorgelegte Arbeit war es ein Ziel ein Verfahren zur Quantifizierung von DSB in dem Normalgewebe Niere zu etablieren. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Methode zur Vorhersage der DSB-Reparaturkapazität bei klinisch relevanter Strahlenbelastung geeignet ist.

Material und Methoden

Für die DSB-Induktion wurden reparaturprofiziente Wildtypmäuse (C57BL/6) einmalig mit einer Dosis von 0,1 Gy, 0,5 Gy, oder 1 Gy bestrahlt. In der Versuchsreihe zur DSB-Reparaturkinetik wurden unterschiedlich reparaturprofiziente Mausstämmen (C57BL/6, BALB/c, AT und SCID) einer Bestrahlung von 2 Gy unterzogen. Die Analyse der Gewebeschnitte erfolgte zur Induktionsbestimmung nach 10 min, bei der Reparaturkinetik je 30 min, 2,5 h, 5 h, 24 h und 48 h nach Bestrahlung. Die γ -H2AX-Gewebefärbung erfolgte qualitativ immunhistologisch und quantitativ mittels Immunfluoreszenz.

Ergebnisse

Es gelang der Nachweis eines linearen Verhältnisses von definierten, geringen Strahlendosen zu verursachtem Strahlenschaden. Mit der genutzten Methode konnten die Mäuse in ihrer Strahlen-Empfindlichkeit deutlich voneinander unterschieden werden. In dem Beobachtungszeitraum zeigte sich bei allen Mausstämmen eine Abnahme der strahleninduzierten DSB. Je Mausstamm in unterschiedlicher Ausprägung und Verlauf.

Diskussion

Bei klinisch relevanten Strahlendosen ist eine Bestimmung der spezifischen Reparaturkapazität von Mäusen mit definierten Defekten möglich. Die für die Niere gewonnenen Daten sind vergleichbar mit denen in der Arbeitsgruppe bestimmten Werten von Lunge, Gehirn, Dünndarm und Herz. Dass nur Unterschiede in den Mausstämmen und nicht in den Geweben gefunden wurden, unterstützt die These, dass genetische Faktoren der DSB-Erkennung und -Reparatur die individuelle Strahlensensitivität bestimmen und es keine gewebsspezifische DSB-Reparatur gibt. Die geringe IRIF-Anzahl am Ende des Beobachtungszeitraums lässt vermuten, dass die Ursache der klinisch beobachteten Strahlenreaktionen in der DSB-Reparatur nachgeschalteten Prozessen liegt. Der DSB-Nachweis bei geringer Strahlenbelastung unterstreicht die Bedeutung der Prävention durch den Strahlenschutz.

Repair of DNA double-strand breaks in renal tissue of mouse by C.E. Seifert

Summary

Purpose:

In patients receiving radiotherapy a plethora of temporal different and interindividual radiation induced reactions are observed. The double-strand break (DSB) of DNA induced by ionizing radiation is regarded as the most biological relevant damage. That's why a malfunctioning DSB-repair is hazardous for the organism. One of the first steps of DSB-repairing is the phosphorylation of the DSB-near histon H2AX. This radiation induced unit, ionizing radiation induced foci (IRIF) are also named γ -H2AX-IRIF. The intention of this study was to establish a method of DSB-quantification in normal tissue of kidney. Furthermore the ability of this technique for the prediction of DSB-repair capacity was analysed for clinically relevant radiation exposure.

Methods:

For the DSB induction in repair-proficient wild type mice (C57BL/6) the kidney tissue was analyzed 10 min after whole body irradiation with 0.1 Gy, 0.5 Gy or 1.0 Gy. For the DSB repair kinetics the kidney tissue of repair-proficient mice (C57BL/6) and repair-deficient mouse strains (BALB/c, A-T and SCID) were analyzed at 0.5 h, 2.5 h, 5 h, 24 h and 48 h after whole body irradiation with 2 Gy. γ -H2AX immunohistochemistry and γ -H2AX immunofluorescence analysis was used to measure DSB formation and repair in tissue of the different mouse strains.

Results:

A clear linear dose-correlation of irradiation induced damage by low dose exposition of ionizing radiation was noticed. By the use of the established method it was possible to discriminate the radiosensitivity of each analysed mice strain and to follow the decrease of the measured damage.

Conclusion:

The analysis of specific repair capacity of mice strains with predefined repair defects is possible. The data of kidney are comparable to the previous measurement data of the research group for the tissues of lung, brain, small intestine and heart. That the measured data only differs in mice strains supports the thesis that genetic parameters, which control DSB-detection and -repair, determinate the individual radiosensitivity. A special tissue DSB-repair is not presumably. The low IRIF-level at the end of the observation period in kidney tissue hypothesizes an origin of the clinical responses on irradiation in downstream processes. Even more the prevention via radiation protection is necessary because in this study it could be shown, that every low dosed irradiation causes a detectable damage.

2 Einleitung

2.1 Wirkung ionisierender Strahlung

Strahlenbiologisch wird das Model der stochastischen von der deterministischen Wirkung ionisierender Strahlen unterschieden. Die stochastische Strahlenwirkung ist die angenommene Wahrscheinlichkeit eines Effekts bei einer bestimmten Dosis. Es wird von einer linearen Dosisabhängigkeit eines Schadens ausgegangen. Je höher die Dosis, desto größer ist der Schaden. Grundlage ist die so genannte Linear-Non-Threshold (LNT)-Hypothese. Es gibt keine Mindest- oder Schwellendosis für eine Wirkung. Selbst kleinste Dosen haben einen Effekt. Jedoch bilden die Grundlage für die LNT-Hypothese Daten nach Exposition mit hohen Strahlendosen und Langzeitbeobachtungen.

Das Modell der deterministischen Strahlenwirkung begründet sich auf beobachteten Veränderungen nach einer Strahlenexposition. Die pathologische Wirkung einer Bestrahlung zeigt sich erst, nachdem eine Schwellendosis überschritten wurde. Der Schweregrad der Läsion nimmt mit steigender Dosis zu. Unterhalb der Schwellendosis kommt es zu keinen sichtbaren Veränderungen [DÖRR, HERMANN, 2006].

2.1.1 Akute und späte strahleninduzierte Normalgewebs-Toxizitäten

Im klinischen Alltag der Radioonkologie wird die Therapieplanung nach der beobachteten deterministischen Strahlenwirkung ausgerichtet. Ziel ist es, die Schwellendosis des bestrahlten Gewebes nicht zu überschreiten. Jedoch tolerieren die einzelnen Gewebe und Organe unterschiedlich hohe Dosen an Strahlung (Toleranzdosen). Des Weiteren wird beobachtet, dass die Symptome der Organe zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Bestrahlung auftreten. Es können früh- von spät reagierenden Gewebe bzw. Organe unterschieden werden. Ein früher angenommener Zusammenhang zwischen Strahlenempfindlichkeit und der Proliferationsrate eines Gewebes besteht nicht. Jedoch zeigen schnell proliferierende Wechselgewebe früher die Symptome eines Strahlenschadens als langsam proliferierende Dauergewebe. So kann es nicht nur nach Tagen oder Wochen sondern, erst nach Jahren zur Manifestation eines Strahlenschadens kommen [SCHERER et al., 1991; BECK-BORNHOLD et al., 1997; PÖTTER, DIECKMANN 2006; STÖVER, FEYER, 2010].

Wenn die Toleranzdosis überschritten wurde ist der erste sichtbare Eindruck das Bild einer Entzündung. Die Zerstörung von Proteinkomplexen bewirkt eine Störung der Zellmembranen. In Folge des resultierenden Wassereinstroms schwellen die Zellen im bestrahlten Gewebeverband an. Frei werdende intrazelluläre Bestandteile stimulieren den Entzündungsprozess. Weiter von Bedeutung ist die auftretende Entzündung der Kapillaren und der kleineren Gefäße. Diese Strahlenvaskulitis beeinflusst alle durch die entzündeten Gefäße versorgten Zellen und damit die radiogenen Veränderungen im Gewebe. Es kommt zu einem Einsickern von Plasmabestandteilen des Blutes in die Gefäßumgebung. Reaktiv können zelluläre Anteile wie Leukozyten folgen. Je nach Dosis sind auch Einblutungen in das Gewebe und thrombembolische Verschlüsse möglich. Die resultierende Minderversorgung des Gewebes trägt zum Strahlenschaden bei [SCHERER et al., 1991; QUARMBY S et al., 1999; ZAWASKI JA et al., 2011].

Tabelle 1:

Mikroskopisch sichtbarer zeitlicher Ablauf einer Strahlennephritis nach Überschreiten der Toleranzdosis von 12 - 15 Gy [nach SCHERER et al., 1991]:

Zeitraum	Beobachtungen im Nierengewebe
bis 48 h	In der akuten Phase werden eine kurzzeitig vermehrte Durchblutung und ein interstitielles Ödem gesehen (exsudative Entzündung).
bis Tag 8	Niere scheint sich nach außen wieder normal zu verhalten.
Tag 5 - 32	Progressiver, nicht stoppender tubulärer Schaden setzt ein: Degeneration des Tubuluskonvolut, Harnzylinderbildung, beginnende Gewebsfibrosierung.
Tag 21 – 60	Fortschreitende Parenchymdegeneration und Ersatz durch Bindegewebe. Gelegentliche Regenerationsinseln von Tubulusepithel. In dieser Periode werden die Glomeruli als normal beobachtet.
Tag 60 – 230	In der letzten Phase mündet der Strahlenschaden in weiterem Tubulusrückgang mit einzelnen Regenerationsinseln, glomerulärer Sklerose, bindegewebigen Umbau, radiogener Gefäßerweiterungen und Gefäßneubildung.

Nach dem Abschluss der akuten Entzündungsphase kommt es zu einer Neubildung der untergegangenen Zellen und Repopulierung des Gewebes. Dies kann durch Zellen des ursprünglichen Gewebes erfolgen, die dann die Funktion des Organs wiederaufnehmen. Als Beispiel ist hier die Darmmukosa zu nennen. Es kann aber auch zu einem fibrotischen Umbau der untergegangenen und nicht mehr ersetzbaren Gewebe kommen. Der chronische Strahlenschaden ist der Ersatz von Funktionsgewebe durch Bindegewebe und damit der dauerhafte Funktionsverlust des Organs. Ständige Entzündungen stören neben den Organfunktionen auch die normalen zellulären Prozesse im Zellkern. So können dauerhafte Entzündungsprozesse sekundär zu bösartigen Entartungen führen [QUARMBY S et al., 1999; DÖRR, HERMANN, 2006; ZAWASKI JA et al., 2011].

2.1.2 Strahlenschäden in der Niere

Die strahlensensible Niere zählt zu den spät reagierenden Organen. Eine strahleninduzierte Hypertonie oder eine chronische Niereninsuffizienz zeigt sich erst nach Jahren. Auch in der Niere beginnen die primären Veränderungen an den kleinen Gefäßen. Es kommt zu einer Vaskulopathie der Kapillaren und einer Glomerulonephrose. Der mögliche makroskopische sichtbare Endpunkt einer radiogenen Schädigung der Niere ist der bindegewebige Umbau zu einer Schrumpfniere. Diese ist meist annähernd funktionslos und kann eine maligne Hypertonie bedingen [SCHERER et al., 1991].

2.1.3 Klinische Symptomatik eines Strahlenschadens in der Niere

Die Symptomatik eines Strahlenschadens in der Niere kann sich in einer Strahlenephritis, einer renaler Hypertonie oder einer asymptomatischen Proteinurie äußern [KUHLMANN et al., 2008]. Nach einer Gesamtstrahlendosisbelastung von über 15 bis 25 Gy manifestiert sich die Strahlenephritis an den Gefäßendothelien (Glomerula) und dem Tubulusepithel in einem Zeitraum von sechs Monaten bis zu zehn Jahren. Sie ähnelt histologisch dem hämolytisch-urämischem Syndrom mit primärem Gefäßendothelschaden, intravasaler Gerinnung und Gefäßobliterationen. Die Ausprägung ist neben der Dosis abhängig vom bestrahlten Nierenvolumen. So kann die Niere durch den parallelen Aufbau der Nierentubuli einen Schaden bis zu 50 % nach außen hin kompensieren. Durch das hohe Kompensationsvermögen können die Frühschäden an der Niere ohne eine sichtbare klinische Symptomatik ablaufen. [SCHERER et al., 1991; PÖTTER, DIECKMANN 2006; STÖVER, FEYER, 2010].

Die akute Strahlennephritis tritt sechs bis zwölf Monate nach einer Bestrahlung auf. Die Symptome können sich, neben einer allgemeinen Entzündungssymptomatik, in einem neu aufgetretenem Bluthochdruck, einer Proteinurie und einem akuten Nierenversagen äußern. Bei unzureichender antihypertensiver Therapie ist als Komplikation der Übergang in eine maligne Hypertonie möglich [COHEN et al., 1992].

Eine chronische Strahlennephritis entwickelt sich aus der akuten Form oder entsteht als eigenständiges Krankheitsbild nach Jahren. Sie gleicht in ihrem klinischen Erscheinungsbild einer akuten Strahlennephritis. Eine chronische Niereninsuffizienz mit renaler Anämie kann folgen [KUHLMANN et al., 2008].

Zu einer milden renalen Hypertonie mit einem möglichen Übergang in die maligne Form, kann es bei ein- und beidseitiger Nierenbestrahlung kommen. Bei einseitiger Nierenerkrankung kann die Nephrektomie einer Schrumpfniere zur Heilung der malignen Hypertonie führen. Bei der Therapie der Strahlennephritis müssen nephrotoxische Substanzen vermieden, der arterielle Blutdruck auf niedrignormale Werte eingestellt, z.B. durch ACE-Hemmer, und auf eine ausgeglichene Bilanz mit ausreichender Flüssigkeitszufuhr geachtet werden. Bei akutem oder chronischem Nierenversagen kann ein Nierenersatzverfahren durchgeführt werden [COHEN et al., 1992; CLASSEN et al., 2003; HARRISON et al., 2008]. Die auftretende asymptomatische Proteinurie ist ein Zeichen erhöhter Kapillarpermeabilität bei Entzündungen allgemein. Größere Proteine werden filtrierte und nicht mehr resorbiert. Sie heilt meist folgenlos aus. In der Regel kommt es aufgrund des hohen Kompensationsvermögens der Niere zu keiner Hypertonie oder Niereninsuffizienz [KUHLMANN et al., 2008].

Neben den oben beschriebenen Symptomen einer radiogenen Nephritis treten, je nach Größe des Bestrahlungsfeldes, zum einen unspezifische Allgemeinsymptome wie eine Abgeschlagenheit oder eine verminderte Belastbarkeit auf. Zum anderen können Schädigungen der Nachbarorgane die Gesamtsituation mitbestimmen. Stenosierungen und ein fibrotischer Umbau der ableitenden Harnwege können beispielsweise durch einen chronischen Harnstau zu einem post renalem Nierenversagen führen [STÖVER, FEYER, 2010].

Des Weiteren ist durch seine anatomische Nähe zur Niere meist der Gastrointestinaltrakt betroffen. Nausea, Emesis und eine Enteritis sind Symptome einer akuten Reaktion. Schleimhautatropie, Ulzerationen, Stenosierungen und Fibrosierungen als chronischer Schaden. Bei einer Bestrahlung der rechten Niere sind Hepatopathien mit Leberfunktionsstörungen und einem Umbau bis zu einer Zirrhose möglich [STÖVER, FEYER, 2010].

Tabelle 2:

Die Tabelle gibt die Toleranzdosen (TD) für unterschiedliche Organe nach konventioneller fraktionierter Strahlentherapie an. Die TD 5/5- und TD 50/5-Werte geben die Gesamtdosis einer Strahlentherapie an bei der 5 % bzw. 50 % der behandelte Patienten innerhalb von 5 Jahren die genannten Toxizitäten entwickeln. Die angegebenen Dosen sind ein Konsens von Erfahrungswerten bzw. Meinungen, keine Studienergebnisse. Im Verlauf der Jahre wurden die Dosen für das Auftreten von Normalgewebetoxizitäten nach unten korrigiert. Die in einer Therapie vertretbare Dosis ist von der Gesamtsituation des Patienten abhängig [SCHERER et al., 1991, PÖTTER, DIECKMANN 2006; STÖVER, FEYER, 2010].

Organ	Komplikation nach 5 Jahren	1% - 5 % TD 5/5 (Gy)	25% - 50 % TD 50/5 (Gy)	bestrahtetes Volumen
Haut	Ulzera, Fibrose	45 – 50	70	10 cm ³
Dünndarm	Ulzera, Stenosen	40	65	10 cm ³
Leber	Leberversagen, Ascites	25 – 30	40	vollständig
Niere	Nephritis, Nierenfibrose	12 – 15	28	vollständig
Lunge	Pneumonitis, Fibrose	40	60	Lungenflügel
Knochen, ausgewachsen	Nekrosen, Frakturen	60	150	10 cm ³
Knochenmark	Hypoplasie	10 (1-2)	40-50	lokal
Kornea	Kreatinitis	50	<60	vollständig
Linse	Katarakt	5	12	vollständig
Gonaden	Infertilität	2-3		vollständig

2.2 Die Niere in der Strahlentherapie

Die Strahlentherapie von soliden Tumoren ist im heutigen klinischen Alltag fest eingebunden in das multimodale Therapiekonzept aus Operation, Chemotherapie, Immunotherapie und Bestrahlung. Zur Qualitätssicherung erfolgt eine leitliniengerechte Krebstherapie heute meist in Studien oder analog von Studienprotokollen. Diese richten sich nach dem Ausmaß bzw. dem Stadium der Krebserkrankung und der Histologie des Tumors [PÖTTER, DIECKMANN 2006; STÖVER, FEYER, 2010].

Das Nephroblastom oder Wilms-Tumor ist der häufigste Nierentumor im Kindes- und Jugendalter (Inzidenz von 1 pro 100.000). An dieser Krebserkrankung lässt sich gut die Bedeutung der Strahlentherapie im Laufe der Jahre beobachten. Das sehr strahlensensible Nephroblastom wird heute nur noch selten bestrahlt. Innerhalb von 30 Jahren (Therapiestudien SIOP 1 bis SIOP 9) reduzierte sich der Anteil der bestrahlten Patienten von über 80 % auf unter 20 %. Diese Entwicklung ist neben einer früheren Diagnose durch verbesserte Bildgebung, vor allem aber durch die Entwicklung effektiver Chemotherapiekonzepte bedingt. Die auch das gesunde Gewebe besonders schädigende Strahlentherapie wurde reduziert. Als problematisch zu nennen ist bei Kindern mit Nephroblastom besonders die Bestrahlung der im Wachstum befindlichen Wirbelsäule. Bestrahlt wird heute nur noch zur lokalen Risikoreduktion bei höhergradigem Stadium und selten bei Lungenmetastasen [GRAF, REINHARD 2003; STÖVER, FEYER, 2010].

Das häufigere Nierenzellkarzinom (Inzidenz 10 pro 100.000) hat seinen Häufigkeitsgipfel nach dem 50. Lebensjahr. Histologisch sind 80% Adenokarzinome (Klarzellkarzinome). Der vom Epithel der Sammelrohre oder Tubuli ausgehende Tumor kann kausal nur durch eine Nephrektomie behandelt werden. Chemo- und Strahlentherapie sind ohne heilenden Effekt [HARRISON et al., 2008; BECKER et al., 2009; HEROLD et al., 2010; STÖVER, FEYER, 2010].

Die Niere wird, wie oben beschrieben, heute nur selten als Zielorgan bestrahlt. Jedoch kann das strahlensensible Organ im Bestrahlungsfeld für andere Organe liegen. Dieses kann in der aktuellen Therapie von soliden Tumoren des Abdomens (zum Beispiel die rechte Niere bei Leber- und Gallentumoren), sowie abdominellen oder retroperitonealer Lymphomen und Sarkomen [STÖVER, FEYER, 2010], bzw. der Bestrahlung des retroperitonealen Abflussgebietes von Hodentumoren der Fall sein [GRETEN et al., 2010].

Da Sarkome, bis auf die Sonderform des Kaposi-Sarkoms, eine geringe Strahlenempfindlichkeit besitzen, ist die Therapie der Wahl eine Operation. Je nach Stadium der Erkrankung erfolgt zur lokalen Tumorkontrolle eine neoadjuvante oder adjuvante

Strahlentherapie mit einer Gesamtdosis bis zu 50 Gy. Intraoperative Radio- oder Brachytherapie ist möglich [STÖVER, FEYER, 2010].

Für das Hodgkin-Lymphom gibt es in allen Stadien Therapieschema mit Chemo- und Strahlentherapie. Bei einer Gesamtdosis von 30 bis 40 Gy ist eine Schädigung der lymphomnahen Organe und Gewebe wahrscheinlich. Das Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) besitzt eine hohe Strahlen- und Chemosensibilität. Die Primärtherapie richtet sich nach dem der Ann-Arbor-Klassifikation entsprechendem Krankheitsstadium, dem Allgemeinzustand des Patienten und der Histologie des Lymphoms. Diese besteht nach den meisten Studienprotokollen zu Beginn aus einer Chemo- und Immuntherapie. Nach der systemischen Therapie kann eine Radiotherapie des Restlymphoms erfolgen. [REINARTZ et al., 2006; HEROLD et al., 2010; STÖVER, FEYER, 2010; www.Lymphome.de].

2.3 Schädigungen und Reparatur der Desoxyribonukleinsäure

Eine gestörte Integrität des Erbinformationsträgers DNA gefährdet die Lebensfähigkeit einer Zelle. Zu den die DNA beeinflussenden Prozessen gehören Veränderungen an den einzelnen Basen (Dimerisierung, Cytosindesaminierung), Verlust von Basen, die Schädigung des DNA-Grundgerüsts (Desoxyribose und Phosphat) durch Einzel- und Doppelstrangbrüche (ESB/DSB), sowie Intrastrangveränderungen durch unphysiologische Cross-Links [DIEGWEEED, SPERLING, 2007].

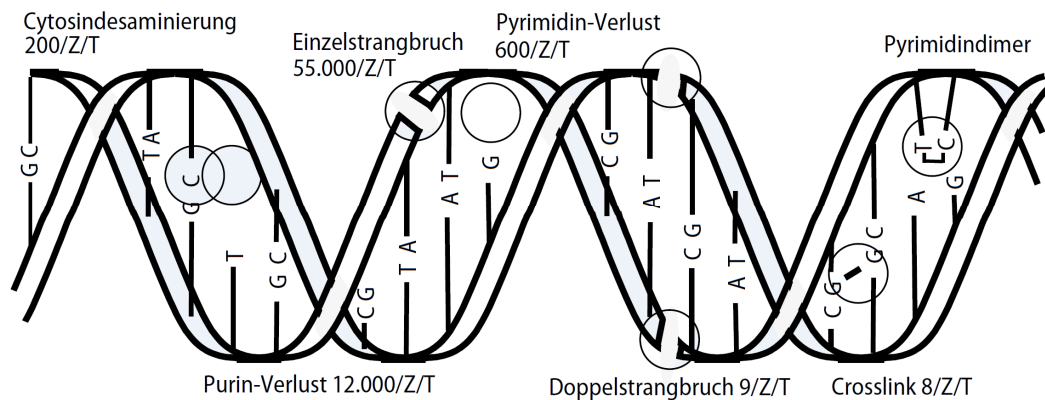


Abbildung 1:

Die abgebildete Grafik gibt die natürlich vorkommenden Schäden der DNA-Doppelhelix wieder (Schaden: Vorkommen/ Zelle/ Tag) [nach DIEGWEEED, SPERLING, 2007]

Zu den endogenen Ursachen der genannten DNA-Schäden gehören unter anderem die Vorgänge auf Zellebene. Zu nennen sind Teilungs- und Regenerationsvorgänge direkt an der DNA. Des Weiteren systemische Prozesse des Körpers in Form von beispielsweise Entzündungen. In ihrer Bedeutung erforscht wurden vor allem die Schäden in der DNA-Replikation. Dies insbesondere in den Bereichen der Zellteilung und der somatische Rekombination mit der V(D)J-Rekombination [KHANNA, JACKSON 2001; VAN GENT et al., 2001; BASSING et al., 2002; YIN et al., 2009].

Exogen schädigen vor allem Chemikalien, Chemotherapeutika und ionisierende Strahlung. Chemotherapeutika, die zur Zytostase in der Krebstherapie verwendet werden, verändern die DNA insoweit, dass eine erfolgreiche DNA-Replikation zur Zellteilung nicht möglich ist. Sie wirken in der DNA-Synthese durch Schädigung der Matrize (Alkylantien und zytostatische Antibiotika), der Synthese der DNA-Bausteine (Methotrexat als Hemmstoff der

Tetrahydrofolsäure-Synthese) oder durch die Einschleusung falscher DNA-Bausteine (Purin- und Pyrimidinantimetabolite). Hingegen schädigen Radikale und ionisierende Strahlung direkt die Struktur der DNA und stören hierdurch die Auslesung der Erbinformation [AKTORIES K et al, 2009; JACKSON SP, BARTEK J., 2009].

Ionisierende Strahlung besteht aus direkt ionisierender Teilchenstrahlung (alpha- oder beta-Strahlung, Elektronen, Positronen) oder indirekt ionisierenden Photonen (je nach Energiegehalt als Röntgen- oder γ -Strahlung bezeichnet). Die namensgebende Eigenschaft beruht in der Fähigkeit in Wechselwirkung mit der bestrahlten Materie zu treten können. Je nach Energiegehalt der Strahlung kann es auf atomarer Ebene durch unterschiedliche Vorgänge (Paarbildung, Photoeffekt oder Compton-Effekt) zur Herauslösung von Elektronen aus dem getroffenen Atom kommen. Das bestrahlte Atom oder Molekül bleibt als positiv geladenes Ion (Kation) zurück. Bei einem Elektroneneinfang ändern sich auch die chemischen Eigenschaften des betroffenen Atoms. Durch die geänderten Ladungen brechen die Atome aus der bestehenden Verbindung und ein zerstörtes Makromolekül wie die DNA kann zurückbleiben. Ebenfalls können hochreaktive Moleküle, z.B. aus Wasser Hydroxylionen, neu entstehen. Diese Radikale greifen dann die zellulären Strukturen an. Da die Wahrscheinlichkeit in einer Zelle auf ein Wassermolekül zu treffen sehr hoch ist und durch das ionisierende Teilchen auf seiner Bahn nicht nur eine Ionisation erfolgt, wird der meiste Schaden durch Hydroxylionen nach einer Bestrahlung verursacht [KRIEGER H, 2007; FOLKERTS KH 2010].

Grundsätzlich richtet sich die Summe der Effekte einer Bestrahlung nach der verwendeten Dosis. Diese ist definiert als die absorbierte Energie pro Masse. Die Energiedosis wird in der Einheit Gray angegeben. Deren relative biologische Wirksamkeit ist abhängig von der Strahlenart, der Bestrahlungszeit, dem durchstrahlten Medium und dem Abstand zur Strahlenquelle. Röntgenstrahlung verursacht bei einer Dosis von 1 Gy pro Zelle ca. 35 Doppelstrangbrüche. Alpha-Strahlung ca. 63 DSB. Zur Vergleichbarkeit wurde die Äquivalentdosis eingeführt. Sie entspricht der Energiedosis mit einem Gewichtungsfaktor. Ihre Einheit ist Sievert. Die effektive Dosis berücksichtigt zusätzlich die beobachtete Empfindlichkeit der unterschiedlichen Organe gegenüber ionisierender Strahlung an. Die theoretische Größe berechnet sich aus den einzelnen Organdosen HT und den Wichtungsfaktoren WT für einen idealen Körper. Die Wichtungsfaktoren werden von der internationalen Strahlenschutzkommission auf Grundlage statistischer Auswertungen von atomaren Katastrophen wie Hiroshima und Tschernobyl vorgeschlagen [KRIEGER H, 2007; FOLKERTS KH 2010].

Die in einem Organismus durch Strahlung geschädigte Makromoleküle und Proteine werden durch Neubildungen ersetzt. Der Informationsspeicher DNA hingegen wird repariert. Phylogenetisch haben sich die Reparaturmechanismen im Genom wenig verändert. Neben spezifischen Reparaturmechanismen, die Veränderungen an den Basen (Basen-Exzisionsreparatur), oder kurzen DNA-Abschnitten (Nukleodid-Exzisionsreparatur, Fehlpaarungs- oder Mismatch-Reparatur) beheben [KROKAN et al., 2000; ANDRESSOO et al., 2006; MURKEN et al., 2006; DIEGWEEDE, SPERLING, 2007], gibt es die Mechanismen der Rekombinations-Reparatur. Bei Eukaryonten sind die homologe Rekombination und das nicht homologe End-joning zu unterscheiden. Ihre Hauptaufgabe ist die Korrektur von Doppelstrangbrüchen [HOEIJEMAKERS, 2001; CHRISTMANN et al., 2003; SPERLING, DIEGWEEDE, 2007].

2.4 DNA-Doppelstrangbruch

Durch die zentrale Position der DNA als Informationsspeicher besitzen die DNA-Reparaturprozesse von DSB einen hohen Stellenwert. Dieses spiegelt sich in der molekularbiologisch beobachteten strengen Konservierung der Reparaturgene im Genom wieder. Zelltypus und Lebensabschnitt eines Organismus bestimmen die Bedeutung der Reparaturwege für die einzelne Zelle [ZAFAR et al., 2010].

Neben dem Verlust von Erbinformation direkt am DSB, kann es zu einer Störung des Ausleserasters an den codierenden DNA-Sequenzen kommen. Zur Folge hätte beides eine veränderte Proteinexpression in der Zelle. Je nach Phase des Zellzyklus können auch kondensierte Chromosomen geschädigt werden. Eine solche Chromosomenaberration kann den Verlust ganzer Chromosomenabschnitten bewirken. Hierdurch besteht eine potentielle Gefährdung des Genoms in seiner Gesamtheit. Nach außen sichtbare mögliche Effekte bei chromosomalen Umlagerungen sind Dysregulation von Genaktivität und unerwünschte Fusionsproteine von gegebenenfalls systemübergreifendem Ausmaß. Weiter kann es je nach Mutationsart zum Tod oder zur Teilungsunfähigkeit der Zelle kommen. Bei einer überschießenden Teilung ist eine Ausbildung von Tumoren möglich [BEKKER-JENSEN S, MAILAND N, 2010; ZAFAR et al., 2010]. Phylogenetisch hat sich ein hochdifferenzierter Signalprozess als Antwort auf einen DSB entwickelt. Neben dem Erkennen des Schadens beinhaltet dieser die Regulation der Zellantwort. Über die ausgelöste Proteinkaskade wird je nach Schadensausmaß die DNA repariert, die Zelle geht in einen Zellzyklusarrest über oder in dem Prozess der Apoptose zugrunde [KHANNA, JACKSON 2001; BARTEK J, LUKAS J, 2007; BEKKER-JENSEN S, MAILAND N, 2010].

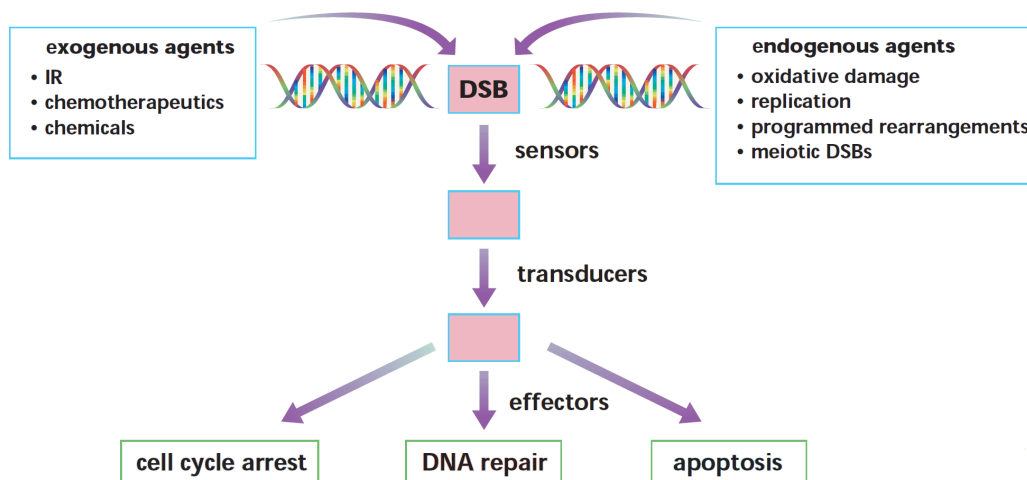


Abbildung 2:

Signalprozess nach einem DNA-Doppelstrangbruch [aus KHANNA, JACKSON 2001].

2.4.1 Homologe Rekombination

Die DSB-Reparatur durch die homologe Rekombination (HR) findet vor allem in Phasen des Organismuswachstums und Mitose statt [ORII et al., 2006]. Hier kann durch den Reparaturmechanismus in der späten S- bzw. G2-Phase auf die originale Sequenzinformation des homologen Schwesterchromatids [WEST et al., 2003; THACKER et al., 2004], die durch den DSB verloren gegangen ist, zurückgegriffen werden. Damit ist dieser zeitlich begrenzte Mechanismus im Vergleich zum nicht homologen End-joining exakter [KINNER et al., 2008]. Für Eukaryonten bzw. Säugetierzellen sind vier relevante HR-Modelle beschrieben [PAQUES, HABER 1999; HUERTAS 2010].

Tabelle 3:

Für Säugetiere relevante Modelle der homologen Rekombination [nach HUERTAS 2010]:

- „double-strand-break-repair“ (DSBR) -Modell,
- „synthesis-depended-strand-annealing“ (SDSA) -Modell,
- „break-induced replication“ (BIR) -Modell,
- „single-strand annealing“ (SSA) -Modell.

Als Startpunkt aller Reparaturmodelle ist die Aktivierung der Proteinkinase Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) zu sehen. Dies erfolgt durch den MRN-Komplex (aus den Proteinen MRE11, Rad50 und NBS1) in der Rekrutierung des inaktiven ATM an den offenen Doppelstrangbruch. Parallel kommt es zur Entwindung der DNA-Doppelhelix am DSB und der Phosphorylierung der vor Ort befindlichen H2AX Histone [KINNER et al., 2008]. Der nächste beobachtete Schritt ist eine Aufbereitung der Bruchstelle (DNA-resection) durch die Bildung von einem 3'-Überhang aus langen DNA-Einzelstränge an der Bruchstelle. Diese ssDNA wird von der 5' - 3'-Exonuklease-Untereinheit des MRN-Komplexes und der Nuklease CtIP erzeugt. An den Enden mit ssDNA bindet dann der „Replication protein A“(RPA)-Proteinkomplex und stabilisiert die Einzelstränge [KINNER et al., 2008; HUERTAS 2010]. Bis auf das „single-strand annealing“ nutzen die drei anderen Reparaturwege der homologen Rekombination die ssDNA um entsprechende DNA-Regionen im Genom des homologen Schwesterchromatids (Donorsequenzen) als Matritze zu finden. Danach unterscheiden sich auch diese drei Reparaturwege [KINNER et al., 2008; HUERTAS 2010].

Am besten erforscht sind das „double-strand-break-repair“ und das „synthesis-depent-strand-annealing“. Dabei werden im Verlauf RPA gegen den Rekombinationsfaktor RAD51 und die als RAD51-Paraloge (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3) bezeichneten Proteine ausgetauscht. Erleichtert wird dies durch RAD52, RAD54 und dem essentiellen „Breast Cancer susceptibility-protein 2“ (BRCA2) [PELLEGRINI et al., 2002; WEST et al., 2003; KINNER et al., 2008; KINNER et al., 2008; HUERTAS 2010]

Als nächstes bildet sich der displacement loop (d-loop). In einer Verschiebungsreaktion (strand invasion) kommt der ssDNA-Einzelstrang neben dem komplementären und vollständigen Einzelstrang des Schwesterchromatids zum liegen. Die gebildete Verdrängungsschleife (d-loop) aus zwei DNA-Duplex, vier DNA-Einzelsträngen wird als „double Holliday-junction“ bezeichnet. Beteiligt sind die RAD54- und RAD51c-Komplexe [LIU et al., 2004; WYMAN et al., 2004; KINNER et al., 2008].

An den freien 3'-OH-Ende des DNA-Bruchs wird die Synthese der neuen DNA gestartet und die Lücke aufgefüllt. Der Syntheseprozess ist mit einer Überkreuzung (branch migration) assoziiert. Der Reparaturprozess endet mit der Lösung der „double Holliday-junction“. In der Auflösung unterscheiden sich die beiden HR-Modelle. In dem SDSA hybridisieren die neu gebildeten Einzelstränge miteinander. Hingegen wird der d-Loop im DSBR durch Nukleasen aufgelöst. Durch das Schneiden der überkreuzenden DNA-Stränge kommt es hier zu einem Cross-Over. Bei der „break-induced replication“ kommt es nur an einem Ende des Bruches zur „strand-inversion“. Hier startet der Replikationsprozess bis die fehlende Sequenz bis zum Chromosomenende erneuert ist [KINNER et al., 2008].

Bei dem „single-strand annealing“ sind homologe Regionen in der DNA zu beiden Seiten des DSB nötig. Diese Regionen werden freigelegt und die ssDNA-Überhänge nähern sich an. In dem folgenden Prozess der Lückenauffüllung kann es zu Verlust oder einer Einfügung von DNA-Sequenzen kommen. Aus diesem Grund scheint das SSA bei höheren Eukaryonten und sonst funktionstüchtigen HR-Wegen selten DSB zu reparieren [KINNER et al., 2008; FRANKENBERG-SCHWAGER et al., 2009].

Bis auf das SSA arbeiten alle der beschriebenen HR-Reparaturwege fehlerfrei, wenn das homologe Schwesterchromatid als Matrize vorliegt. Startet einer dieser HR-Prozesse ohne das homologe Schwesterchromatid kann es zu groben chromosomalen Umlagerungen kommen. Diese werden als gross chromosomal rearrangements (GCRs) bzw. gross chromosomal aberrations bezeichnet und besitzen durch die Störung der Stabilität des Genoms eine große zerstörerische biologische Wirkung [KINNER et al., 2008; HUERTAS 2010; BEKKER-JENSEN S., MAILAND N, 2010].

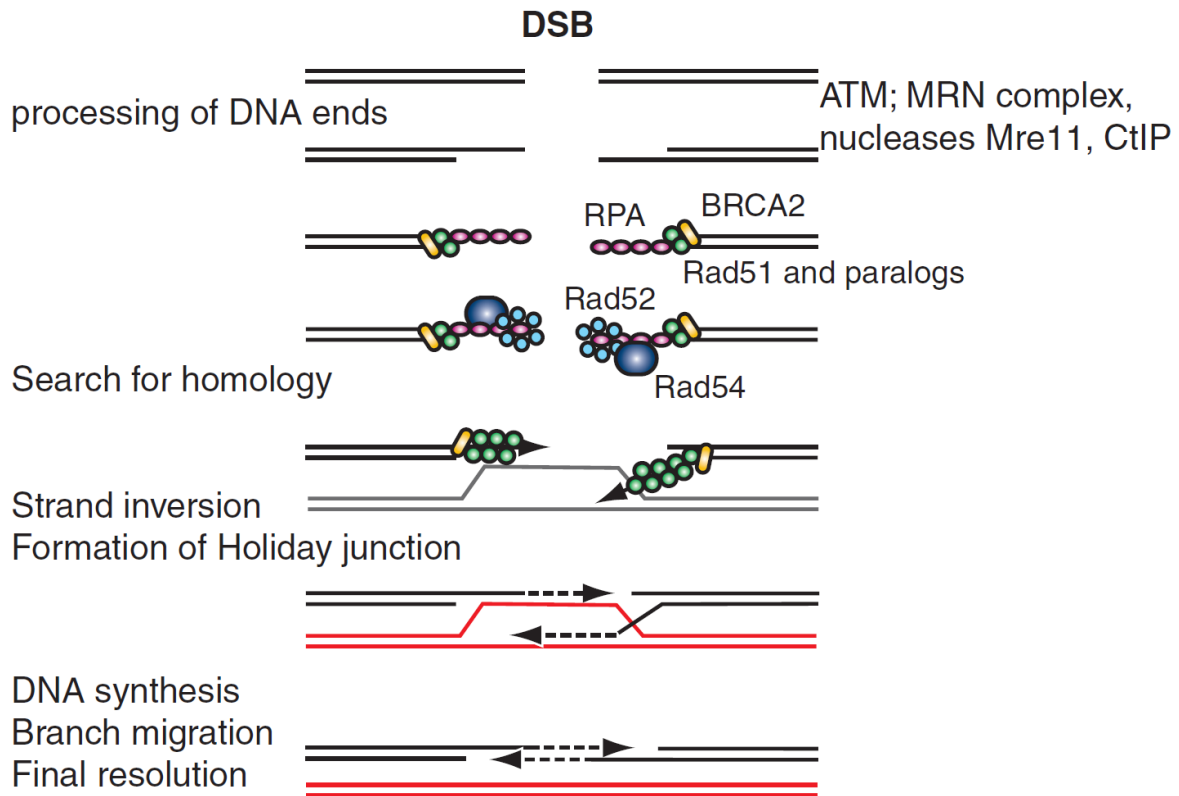


Abbildung 3:

Schematische Darstellung der homologen Rekombination [KINNER et al., 2008].

Weitere folgende Aspekte der homologen Rekombination haben sich aus Studien ergeben. Essentiell für die Effektivität der homologen Rekombination ist der vorgeschaltete Signalweg. Der Zellzyklus schreitet erst dann voran, wenn alle DSB repariert sind. An der Regulation beteiligte Proteine sind vor allem ATM und ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related) [ABRAHAM et al., 2001; DUROCHER, JACKSON, 2001; O'DRISCOLL, JEGGO, 2006]. Auch gibt es Hinweise, dass die homologe Rekombination in teilungsfähigen Zellen NHEJ-refraktäre DSB-Untergruppen repariert. Hier durch würde das Überleben nach einer erhöhten DSB-Belastung, beispielsweise nach einer Bestrahlung des Gewebes, erhöht [KINNER et al., 2008; HUERTAS 2010].

2.4.2 Nicht homologe End-joining

Das nicht homologe End-joining (NHEJ) nutzt keine bzw. nur begrenzt Sequenzhomologien zur DSB-Reparatur und kann ohne das Vorliegen eines homologen Schwesterchromatids ablaufen. Zufällige Basenpaarungen der nicht komplementären Stränge können vorkommen. Dies wird als Mikrohomologie gerichtetes End-joining bezeichnet [COLLIS et al., 2005]. Es besteht keine Beschränkung auf eine bestimmte Zellzyklusphase. Das NHEJ ist damit der Hauptmechanismus zur DSB-Reparatur in den Funktionsphasen des Zellkerns (G1/ G₀-Phase) und im adulten Organismus [VAN GENT et al., 2001; LIEBER et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2008].

In der Literatur wird das NHEJ als ein ungenauer Reparaturmechanismus diskutiert. Durch das Fehlen der DNA-Sequenzvorlage des Schwesterchromatids im haploiden Chromosomensatz [HOEIJEMAKERS, 2001; CHRISTMANN et al., 2003] und der Aufarbeitung (DNA resection) der primär nicht ligierbaren Bruchenden kann es potentiell zu einem Verlust oder dem Einfügen von Nukleotiden kommen. Eine Veränderung der Erbinformation ist damit denkbar [LEES-MILLER et al., 2003; LIEBER et al., 2003; O'DRISCOLL M, JEGGO PA, 2006].

Neben dem gut erforschten DNA-Proteinkinase (DNA-PK) abhängigen NHEJ (D-NHEJ) berichten neuere Studien von einem backup-NHEJ-System (B-NHEJ) [WINDHOFER et al., 2007; MLADENOV E, ILIAKIS G, 2011]. Dieses wird durch höheren Eukaryonten bei Defekten des D-NHEJ zur DSB-Reparatur genutzt. Es besteht hier kein Zusammenhang mit der homologen Rekombination. Das B-NHEJ soll jedoch an der Reparatur von Basenschäden und Einzelstrangbrüchen beteiligt sein [ILIAKIS et al., 2004; KINNER et al., 2008]. Weiter scheint das B-NHEJ ein energetisch ungünstiger Reparaturweg zu sein, so dass die meisten DSB nach dem D-NHEJ behoben werden [LÖBRICH M, JEGGO P A, 2005]. Ebenfalls ist eine reduzierte Effektivität wahrscheinlich, denn Säugetierzellen mit einem Defizit der DNA-Proteinkinase sind sehr strahlensensibel [MAHANANEY BL et al., 2009].

Wann welcher Reparaturweg startet, wird von der Konzentration funktionstüchtiger Enzyme am DSB bestimmt. Diese ändert sich je nach Zellzyklusphase oder durch genetisch determinierte Proteindysfunktionen. Hier durch wird auch bestimmt, ob ein DSB von dem NHEJ oder der homologe Rekombination repariert wird. Wenn in gesunden Eukaryonten die Untereinheit KU der DNA-PK am DSB binden kann, startet die (D)-NHEJ. Ist jedoch in der DNA-resection die DNA-Bruchstelle durch den MRN-Komplex und die Nuklease CtIP mit ssDNA versehen worden, kann KU nicht binden. Die homologe Rekombination beginnt statt des (D)-NHEJ [HUERTAS 2010; MIMITOU EP, SYMINGTON LS, 2011].

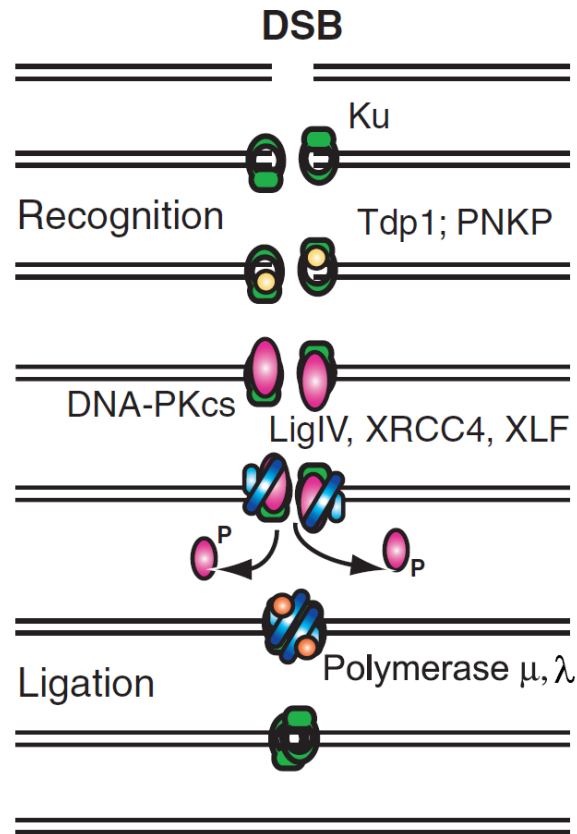


Abbildung 4:

Die Abbildung [aus KINNER et al., 2008] zeigt das DNA-PK-abhängige nicht homologe End-joining. Die freien DNA-Bruchenden werden durch das KU-Protein (aus Untereinheiten KU 70 und KU 80) besetzt, damit stabilisiert und vor Nukleasen geschützt [DEFAZIO et al., 2002; MAHANANEY BL et al., 2009]. Durch den Einfluss der Proteine PNKP und Tdp1, rekrutiert KU die DNA-PKcs-Moleküle zum DSB und es bildet sich das vollständige Enzym DNA-PK (Ku 70/ Ku 80/ DNA-PKcs) an der DNA [KINNER et al., 2008]. In diesem Prozess kommt es zur Autophosphorylierung und Aktivierung der DNA-PK. Die Bruchlücken-Aufbereitung (DNA resection) wird durch Auffüllen kleiner Lücken und das Entfernen von nicht legierbaren Basen fortgeführt. Je nach Bruchtyp sind die Enzyme Artemis (als 5'-3'-Endonuklease hier), DNA-Proteinkinase μ und λ , Polynukleotidproteinkinase (PNKP), Werner syndrom protein (WRN) beteiligt (hier nicht alle abgebildet) [MAHANANEY BL et al., 2009]. In einem folgenden Umlagerungsprozess mit einer Entfernung den DNA-PK von DSB kann ein Komplex aus DNA-Ligase IV/ XRCC4/ XLF die Verbindung der Enden vermitteln. Die DNA-Polymerase μ und λ füllen die Bruchlücke dann auf. Die Histone H2AX der angrenzende Nukleosomen werden zum Reparaturbeginn parallel durch die DNA-PK phosphoryliert [LIEBER et al., 2003; O'DRISCOLL M, JEGGO PA, 2006; KINNER et al., 2008].

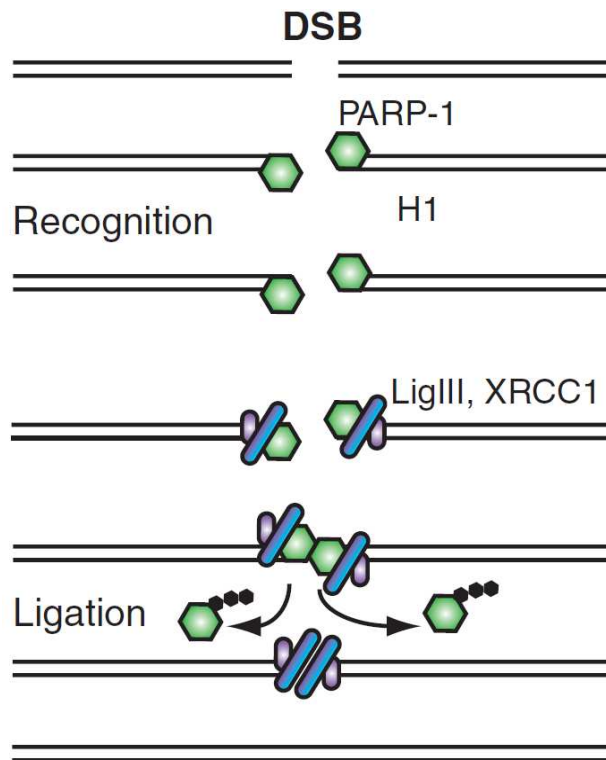


Abbildung 5:

In der obenstehenden Abbildung [aus KINNER et al., 2008] ist ein alternativer Weg des NHEJ abgebildet. Über das B-NHEJ besteht derzeit nur begrenztes Wissen. Es scheint durch eine funktionsfähige DNA-PK unterdrückt zu werden [PERRAULT et al., 2004]. Die DNA-PK-Untereinheiten KU70/80 hemmen das Histon H1 und PARP1 [MLADENOV E, ILIAKIS G, 2011]. PARP-1 erkennt bei Fehlen der DNA-PK den DSB und lagert sich an. Als zentraler Reparaturkomplex fungiert ein Komplex aus den Proteinen PARP-1/ DNA-Ligase III/ XRCC1 [AUDEBERT et al., 2004; WANG H et al., 2005]. Mediatoren des Reparaturvorgangs sind das Histon H1 und das Protein WRN [ROSODI et al., 2008, MLADENOV E, ILIAKIS G, 2011].

2.5 Zentrale Proteine der DSB-Reparatur

2.5.1 Histon γ -H2AX

Im Zellkern von Eukaryonten ist das Nukleosom die kleinste strukturelle Organisationseinheit der kondensierten DNA. Es bildet damit das Grundgerüst des Chromatins bzw. eines Chromosoms [PRUSS et al., 1995]. Zusammengesetzt wird ein Nukleosom aus Histonen und DNA: jeweils zwei gleiche Histone einer Familie (H2A, H2B, H3 und H4) fügen sich zu einem Oktamer zusammen [LUGER et al., 1997]. Um dieses Oktamer lagert sich die DNA in einer Länge von 145 bis 147 Basenpaaren [bp] an. Das ergibt eine relative Atommasse von 206.000 für ein Nukleosom [KINNER et al., 2008].

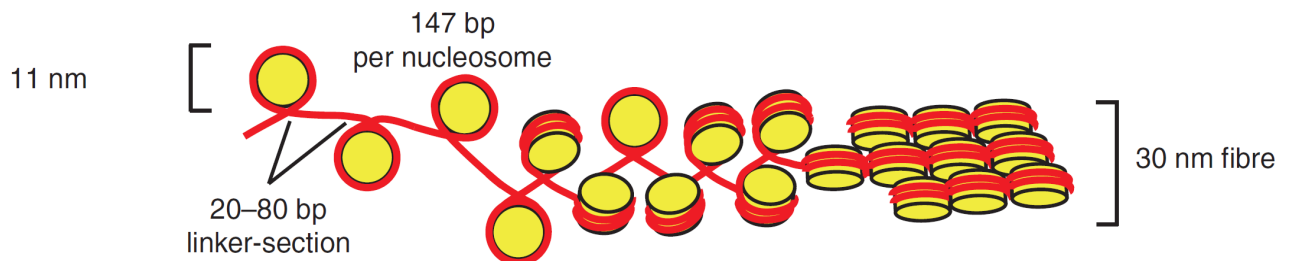


Abbildung 6:

Aufbau des Chromatins aus Nukleosomen [aus KINNER et al., 2008].

Histone werden bei den Säugetieren durch eine Vielzahl von Genen kodiert. Diese sind aufgrund ihrer Bedeutung gut konserviert im Genom. Unter anderem durch repetitives Vorkommen [CELESTE et al 2002]. Aber auch werden die kodierenden DNA-Sequenzen nur dann ausgelesen, wenn während der S-Phase neue DNA gebildet wird. Die Gensequenzen der Histone scheinen phylogenetisch sehr alt zu sein. Sie besitzen keine Introns und es erfolgt kein posttranskriptionelles Processing der ausgelesenen mRNA vor der Translation (kein Spleißen, kein Capping, kein Poly-A-Schwanz). Die DNA-Sequenz entspricht in ihrer Abfolge der kodierten Aminosäuresequenz [HEINTZ et al., 2003]. Dieses ist bei den meisten Proteinen im menschlichen Körper nicht der Fall.

Weiter bemerkenswert ist, dass die Histone der Gruppen H2B, H3 und H4 sich nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden. Bei Gruppe der H2A-Histone hingegen können in den charakteristischen Aminosäuresequenzen drei Subfamilien differenziert werden:

H2A1-H2A2, H2AZ und H2AX. Ihre Gensequenzen wurden evolutionär unabhängig vererbt und sind nicht gekoppelt [WEST et al., 1980; THATCHER et al., 1994]. Für das Histon H2AX ist das Sequenzmotiv von Ser-Gln-Glu (SQE) am C-Terminus typisch [REDON et al., 2002; SEDELNIKOVA et al., 2002].

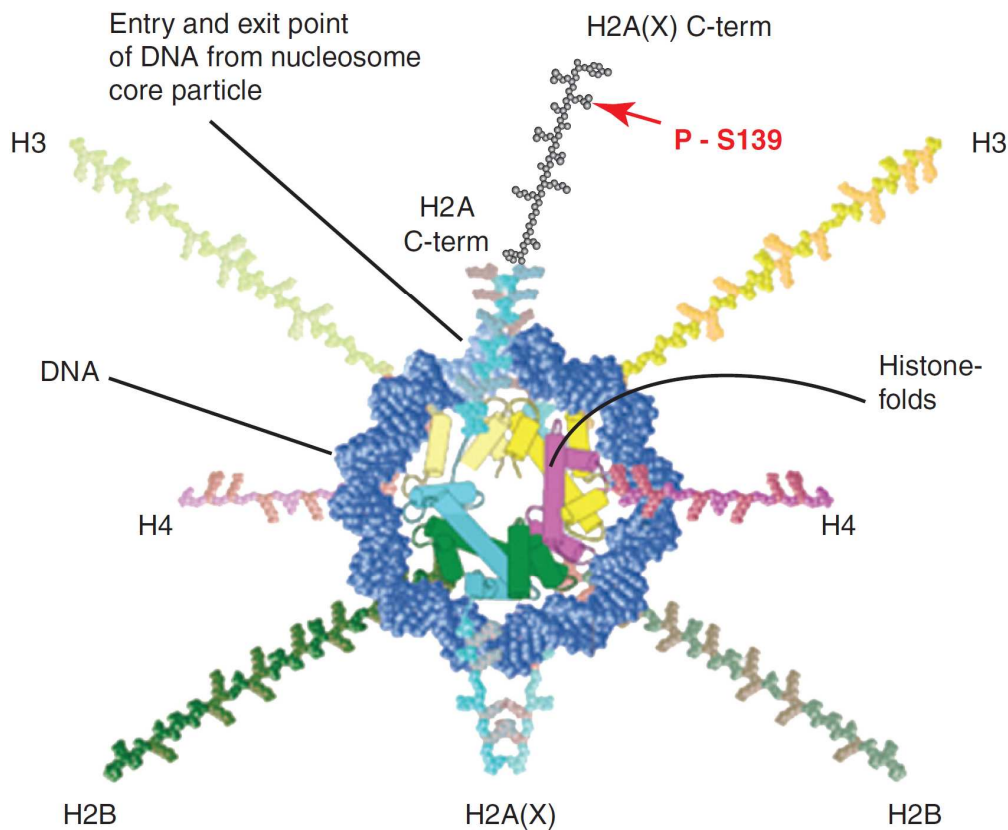


Abbildung 7:

Aufbau eines Nukleosoms mit phosphoryliertem H2AX-Histon [aus KINNER et al., 2008]

Nach einer ionisierenden Bestrahlung wurde an der Bruchstelle des DNA-Doppelstrangs beobachtet, dass die dort befindlichen Histone vom Typ H2AX innerhalb von Minuten phosphoryliert werden. Dies erfolgt redundant durch die genannte spezifische DNA-abhängige Proteinkinase oder die ATM-Proteinkinase [PARK et al., 2003]. Die überlappende Funktion der beiden Enzyme wird in Wirbeltierzellen von Maus und Mensch gefunden [STIFF et al., 2004]. Nach der Anlagerung eines organischen Phosphatrestes an die Aminosäure Serin-139 des Histons wird dieses als γ -H2AX bezeichnet [ROGAKOU et al., 1998; SEDELNIKOVA et al., 2002]. Die Ausdehnung der H2AX-Phosphorylierung um eine Bruchstelle (Doppelstrangs oder Einzelstrangs) kann zwischen einer und zwei Millionen Basenpaare (1-2 Megabasen) groß sein [ROGAKOU et al., 1998 und 1999].

Die γ -H2AX-Bildung ist eine der ersten Stufen in der Signalkaskade der DNA-Schadensantwort. Von γ -H2AX ausgehend, werden die nachgeschalteten Reparaturproteine [SEDELNIKOVA et al., 2003; FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2004] RAD 50, RAD 51, „Breast Cancer susceptibility-protein 1“ (BRCA1) und 53PB1 aktiviert. Durch ihre örtliche Nähe zur DNA und zum Bruch haben sie neben Reparatur-, auch Checkpointfunktionen [FURUTA et al., 2003; HUYEN et al., 2004]. Das Histon γ -H2AX fördert das Zusammenwirken der Proteine und stärkt die Effizienz der DNA-Reparatur [KINNER et al., 2008]. Eine Erhöhung der γ -H2AX-Konzentration am Ort des Doppelstrangbruchs wird durch das Mediator-DNA-Schadens-Checkpoint-Protein 1 (MDC1) bewirkt [STUCKI, JACKSON, 2004]. Dieses erfolgt durch die Bindung von γ -H2AX in einer Domäne am C-terminalen Ende von MDC1 [STUCKI et al., 2005; LOU et al., 2006].

Mit einem spezifischen Antikörper, der an einen primären Antikörper gegen γ -H2AX bindet, ist es möglich, DSB optisch wahrnehmbar zu machen. Diese nach ionisierender Bestrahlung induzierten punktförmigen Signale, beispielsweise in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht, werden als „ionizing-radiation induced foci“ (IRIF) bezeichnet [BEKKER-JENSEN S, MAILAND N, 2010]. Zuvor wurden DNA-Doppelstrangbrüche unter anderem mit der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) nachgewiesen. Nach einer Aufarbeitung der bestrahlten Zellen werden hierbei die entstandenen DNA-Fragmente der Masse nach aufgetrennt. Verlässliche Daten sind mit dieser Methode nach einer Röntgenbestrahlung von ca. 5 Gy zu erhalten [CHU et al., 1986]. Dass ein IRIF, ein γ -H2AX-Focus, einem Doppelstrangbruch entspricht, konnte durch vergleichende Untersuchungen mit einer 95 keV Röntgenstrahlung gezeigt werden [SEDELNIKOVA et al., 2002; ROTHKAMM et LÖBRICH, 2003]. Mit der antikörperbasierten Methode ist nun möglich, DSB direkt im Zellkern durch eine histologische Untersuchung nachzuweisen und zu beobachten. Durch die Nutzung der γ -H2AX-Methode in der Immunofluoreszenzmikroskopie können DSB in einem Dosisbereichen von 0,001 Gy bis 5 Gy nachgewiesen werden [ROTHKAMM et LÖBRICH, 2003; KINNER et al., 2008]. Dies gelingt erfolgreich bei exogenen verursachten DSB durch Bestrahlung oder Agenzien und bei endogenen z.B. durch DNA-Umlagerungen entstandenen DSB [BURMA, 2001; CHEN et al., 2000; PETERSEN et al., 2001; MAHADEVIAH et al., 2001]. In weiteren Studien wird berichtet, dass eine Phosphorylierung des Histons H2AX durch die DNA-Proteinkinase in Form und Intensität schwächere Kern-Foci ergeben als eine durch ATM [BURMA et al., 2001; PAUL et al., 2000].

Eine durch UV-Licht oder Replikationsstress verursachte H2AX-Phosphorylierung formt keine eindeutigen Foci. Entstandene Einzelstrangbrüche bewirken eine ATR-Aktivierung

ohne signifikanten γ -H2AX-Foci-Anstieg [KINNER et al., 2008]. Neben γ -H2AX bilden weitere Proteine der DSB-Reparatur nach einer Bestrahlung an der Bruchstelle der DNA IRIF aus. Klar abgrenzbar sind die Proteine MDC1, ATM und 53BP1 [CELLEST et al., 2002; STUCKI, JACKSON, 2004; KITAGAVA et al., 2004; BEKKER-JENSEN et al., 2006].

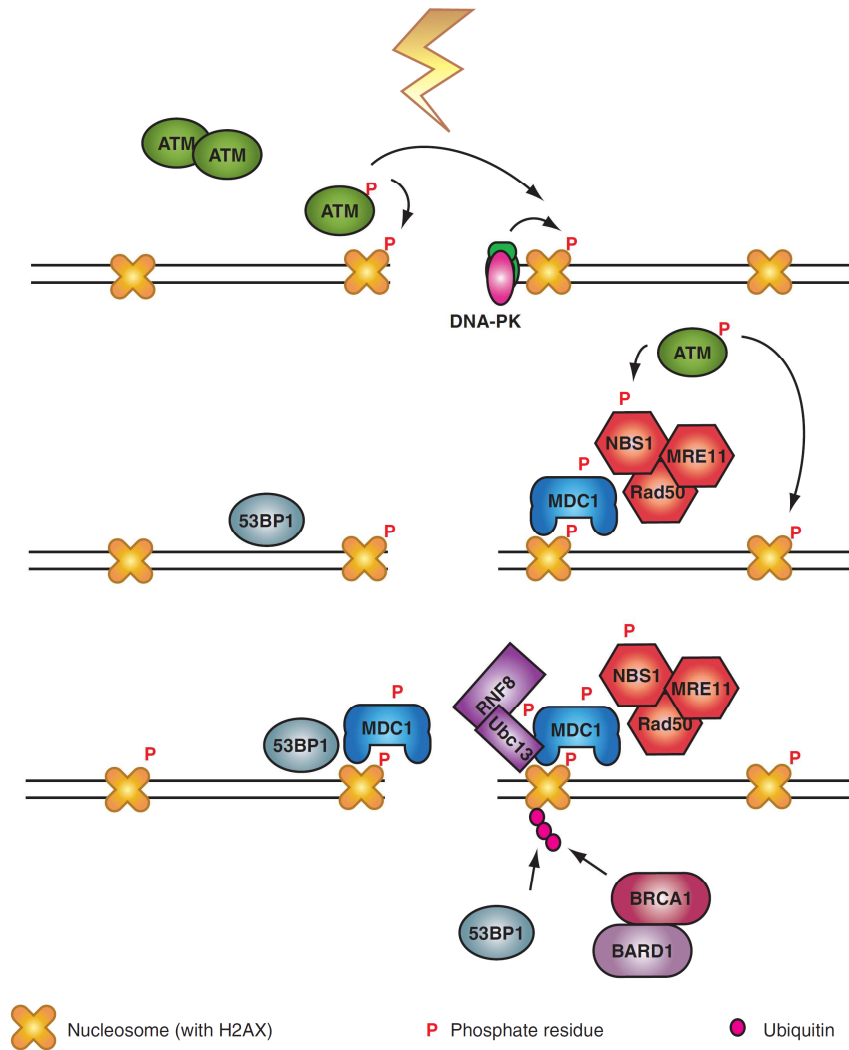


Abbildung 8:

Die Abbildung zeigt den initialen Prozess nach einem DSB. Es kommt zur Aktivierung von γ -H2AX durch die Kinasen ATM oder DNA-PK. Nach der Anlagerung von MDC1 an γ -H2AX bindet der MRN-Komplex aus MRE11, RAD50 und NBS1. Eine Feedbackschleife entsteht durch die gesteigerte ATM-Aktivität mit weiterer H2AX-Phosphorylierung und dem Einbeziehen von 53BP1. Dem folgt die Rekrutierung von RNF8 mit der MDC1-Phosphorylierung. Essentiell für die Bindung von BRCA1/BARD1 ist die Polyubiquitinierung von γ -H2AX [aus KINNER et al., 2008]

2.5.2 ATM-Proteinkinase und MRN-Komplex

In gesunden Säugetierzellen hat das Protein des „ataxia telangiectasia-mutated“-Gen (ATM) eine zentrale Rolle in der Erhaltung der genomischen Stabilität. Neben dem Einfluss auf die Doppelstrangbruchreparatur (Start von NHEJ und homologer Rekombination) wirkt es durch die Phosphorylierung von Effektorproteinen auf Checkpoints des Zellzyklus. Nachgewiesen wurde eine Wirkung mit dem MRN-Komplex auf die Proteine P53, „Structural maintenance of chromosomes-protein 1“ (SMC1), Checkpointkinase 2 (CHK2) und BRCA1 [SHILO 2001; KURZ et al., 2004].

ATM besitzt als eine Serin-Threonin-Proteinkinase, die Fähigkeit der Autophosphorylierung an der Aminosäure Serin-1981. In der Nähe eines Doppelstrangbruches geht das inaktive ATM-Dimer in das aktive Monomer über. Dieser ATM-Aktivierungsprozess ist abhängig vom MRN-Proteinkomplex [ANDEGEKO et al., 2001; BAKKENIST et al., 2003].

Neben der beschriebenen Endonukleaseaktivität bei kovalenten DNA-Protein-Verbindungen [HARTSUIKER et al., 2009] und der DNA-resection an der Bruchstelle [HUERTAS 2010] kann der MRN-Komplex aus den Proteinen MRE11, Rad50 und „Nijmegen Breakage Syndrom-Protein 1“ (NBS1) [D'AMOURS et al., 2002; PERTRINI et al., 2003; VAN DEN BOSCH et al., 2003] durch seine dreidimensionale Struktur an einen DSB binden, die Bruchenden stabilisieren und die ATM-Aktivierung bewirken [MORENO-HERRERO et al., 2005; WILLIAMS et al., 2005]. In diesem Prozess hat eine zentrale Funktion der als Zinkfinger bezeichnete Proteinbereich der MRN-Untereinheit RAD50 [HOPFNER et al., 2002; WILTZIUS et al., 2005]. Durch eine Konformationsänderung bei DNA-Kontakt wird die ATM-Anlagerung an den Komplex ermöglicht. Ein Proteinabschnitt (Aminosäuresequenz FXF/Y-Motiv) der MRN-Untereinheit NBS1 leitet dann ATM zum DNA-Schaden und es kommt zur ATM-Aktivierung [FALCK et al., 2005; FERNANDES et al., 2005].

Bei Zellen mit fehlerhaftem MRN-Komplex besteht eine veränderte regionale Anordnung von ATM am DSB. Hierdurch resultiert eine verminderte ATM-Autophosphorylierung und damit eine gestörte Aktivierung und Regulation der nachgeschalteten Effektorproteinen [CARSON et al., 2003; UZIL et al., 2003; KITAGAWA et al., 2004; LEE et al., 2004; DIFILIPPANTONIO et al., 2005]. Potentiell besteht deshalb ein erhöhtes Risiko einer DSB-Persistenz und die damit verbundenen Folgen [PETRINI et al., 2003; SEDELNIKOVA et al., 2003; SHILOH et al., 2003; VAN DEN BOSCH et al., 2003; KITAGAWA et al., 2004].

Das durch eine ATM-Proteindysfunktion oder einem Fehlen von ATM verursachte komplexe Krankheitsbild besitzt aus historischen Gründen durch das seltene Auftreten des Syndroms

mehrere Bezeichnungen. Neben dem Begriff Ataxia telangiectasia werden Boder-Sedgwick-Syndrom oder Louis-Bar-Syndrom synonym verwendet. Die autosomal-rezessiv vererbte Systemerkrankung wird zu den Phakomatosen und den Chromosomenbruchsyndromen gezählt. Bei über 400 Mutationen des ATM-Gens (Chromosom 11) ist Prävalenz für heterozygote Mutationsträger relativ hoch, für ein homozygotes Auftreten der gleichen Mutation des ATM-Gens sehr gering. Die Inzidenz unter den Neugeborenen von 1: 100.000 bis 1: 200.000 gibt dies wieder [SITZMANN, NEUHÄUSER, 2007].

Nach dem gültigen ICD-Standard der WHO für Deutschland ist das Syndrom definiert als eine zerebelläre Ataxie mit defektem DNA-Reparatursystem (ICD-10: G 11.3). Wie die meisten genetisch bedingten Erkrankungen zeigen sich schon in der Kindheit Symptome. Im Vordergrund stehen neurologische und immunologische Veränderungen [CHUEN, GATTI, 2004; SITZMANN, NEUHÄUSER, 2007]. Es kommt durch die zerebelläre Ataxie zu einer kleinhirnbedingte Gang- und Standunsicherheit und dystonen Bewegungsstörungen. Noch vor dem 10. Lebensjahr sind die meisten Kinder auf einen Rollstuhl angewiesen. Die Atrophie des Kleinhirns im Bereich der Vermis zeigt sich auf zellulärer Ebene in einer Reduktion der Purkinje- und Granulazellen. Pathognomonisch und namensgebend sind weiter die als Teleangiektasien bezeichneten Erweiterungen der Blutgefäße in der Haut. Meist im Gesicht und den Bindehäuten. Die erhöhte Infektanfälligkeit der Kinder ist auf eine verminderte Immunkompetenz durch T- und B-Lymphozytendefekte zurückzuführen. Die Symptome sind interindividuell verschieden stark ausgeprägt. Ein Drittel der AT-Patienten entwickeln im Leben Neoplasien. Kinder und Jugendliche sind vor allem von Lymphomen und Leukämien betroffen. Ältere Patienten haben ein erhöhtes Risiko von Mamma- und kolorektalen Karzinomen [DIEGWEED, SPERLING 2007; SITZMANN, NEUHÄUSER, 2007].

Eine ATM-Defizienz zeichnet sich ebenfalls durch eine erhöhte Empfindlichkeit für die Folgen von ionisierenden Strahlen und DSB-erzeugende Chemikalien aus. Allerdings besteht keine erhöhte Sensibilität für andere DNA-schädigende Noxen. Die gesteigerte Chromosomenbrüchigkeit ist charakteristisch. Vereinzelt kommt es zu Fusionen der Chromosomenenden (Telomerfusionen). Bei bestrahlungsinduzierten DSB kommt es in der S-Phase nicht wie bei Gesunden zu einem Zellzyklus-Stopp, sondern eine radioresistente DNA-Synthese findet statt. Die DSB-Reparatur, insbesondere die HR, und die DNA-Schadenssignalkaskade sind gestört [SWIFT et al, 1991; GATTI et al, 1991; ROTMAN G, SHILOH Y 1998; SANDOVAL et al, 1999; DIEGWEED, SPERLING 2007].

2.5.3 Ataxia telangiectasia-like disorder

Die Ataxia telangiectasia-like disorder (ATLD) ist eine sehr seltene Erkrankung. Klinisch zeigt sie ein dem Louis-Bar-Syndrom vergleichbares Bild, einschließlich der neuronalen Degeneration. Ein Anstieg der Tumorerkrankungen wie bei AT-Patienten wird nicht beobachtet. Auf molekularer Ebene konnte bisher eine hypomorphe Expressierung der MRN-Untereinheit MRE11 nachgewiesen werden. Das exprimierte mutierte Allel des MRE11-Gens ist im Phänotyp schwächer ausgebildet als im Wildtyp. Diese führt zu einer Funktionsstörung von MRE11 und scheinbar gegenregulatorisch zu einer vermehrten Produktion der anderen Bestandteile des MRN-Komplexes [TAYLOR et al., 2004].

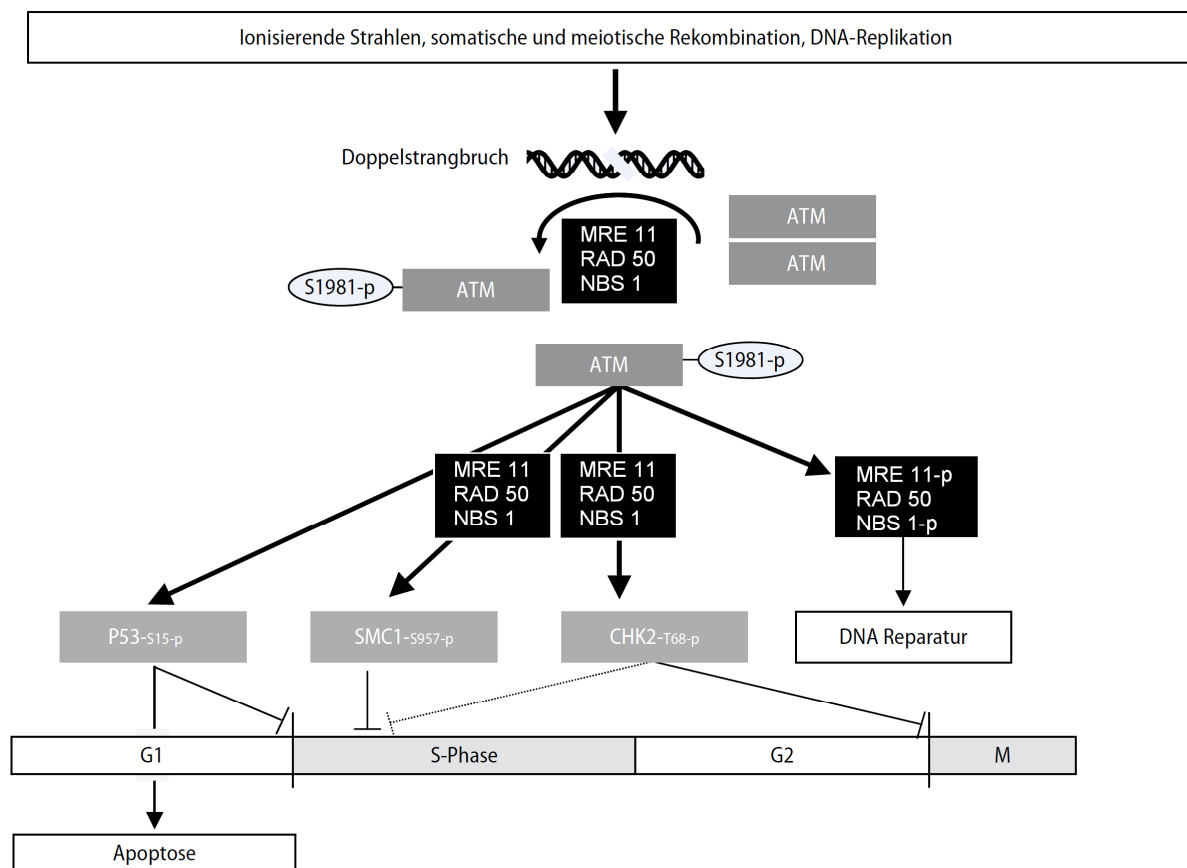


Abbildung 9:

Die Abbildung gibt die zentrale Rolle des MRN-(MRE11/ Rad50/ NBS1)-Proteinkomplexes nach einem DSB wieder. Die Aktivierung der nachfolgenden Protein-Signal-Kaskade durch ATM/ MRN-Phosphorylierung, der Einfluss auf den Zellzyklus und die Checkpoints an den Übergängen der einzelnen Zellzyklusphasen ist zu sehen [Abbildung nach DIEGWEEED, SPERLING, 2007].

2.5.4 DNA-abhängige Proteinkinase

In ihrer Funktion als Enzym ist die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) eine Serin-Threonin-Kinase [LEES-MILLER, 1990]. Sie gehört mit ATM und ATR zu der Proteinfamilie der Phosphatidylinositol-3-Kinase-verwandten Proteine (phosphatidyl inositol-3-like kinase proteins = PILK) [Hartley et al., 1995]. Wie berichtet, nehmen diese Kinasen eine zentrale Stellung in der DSB-Reparatur und der Sicherung der genomischen Stabilität ein [DASIKA et al., 1999]. Die DNA-PK reguliert neben den Aufgaben in der NHEJ, die Effektorproteine „cysteinyl-aspartate specific protease 3“ (Caspase 3), „Checkpoint-Kinase 1“ (CHK1), „Heat shock factor protein 1“ (HSF1), und den Natrumbicarbonat-Transporter NBC1 [Collins et al., 2005]. Zusätzlich scheint die DNA-PK eine Funktion während der DNA-Replikation zu besitzen, denn das Protein kann in dieser Zellphase zusätzlich zum Zellkern auch im Zytoplasma nachgewiesen werden [NILSSON et al., 1999].

Säugetierzellen mit dem Severe Combined Immunodeficiency Disorder (SCID)-Syndrom (ICD10: D 81.1) können eine Funktionsstörung der DNA-PK aufweisen. Es kommt unter anderem zu einer Störung in der V(D)J-Rekombination [LIEBER, 2008; MAHANEY et al., 2009]. Für das autosomal-rezessiv vererbte Syndrom sind eine Vielzahl von genetischen Ursachen bekannt. Es konnten Mutationen in 10 verschiedenen Genen nachgewiesen werden, die das Syndrom unabhängig von einander auslösen können. Spontanmutationen sind häufig. Die Mutation des als Artemis-Gen bezeichnetem DNA-Abschnittes auf Chromosom 11 geht neben einer schweren Immundefizienz mit einer erhöhten Empfindlichkeit für die Folgen von ionisierender Strahlung einher. Dies wird als radiationsensitive SCID (RS-SCID) bezeichnet. Etwa 10 % der DSB in humanen Fibroblasten-Zelllinien werden von der Nuklease Artemis abhängig repariert [BUCKLEY RH 2004; RIBALLO et al., 2004].

Weltweit erkrankt ein Neugeborenes von 50.000 bis 100.000 an dem Syndrom [HUANG, MANTON 2004]. Die Säuglinge fallen in den ersten Lebensmonaten durch vermehrte Infekte auf. Begründet ist dies in einer Störung der humoralen und zellulären Immunantwort. Es sind neben den B-Lymphozyten und den natürlichen Killerzellen, vor allem die T-Lymphozyten betroffen [KALMAN et al., 2004; ROBERTS et al., 2007]. Diese sind entweder defekt oder fehlen ganz. Die betroffenen Kinder leiden an bakteriellen Infektionen wie Pneumonien oder Otitis media, Candidosen und Diarrhöen. Daneben werden die Kinder auffällig durch Entwicklungs- und Wachstumsstörungen. Das schwerwiegende SCID-Syndrom führt ohne Therapie meist innerhalb eines Jahres zum Tod des Säuglings.

Die symptomatische Therapie besteht in der Minimierung des Infektionsrisikos durch Isolation und antiinfektive Prophylaxe. Die Betroffenen leben unter sterilen Bedingungen. SCID wurde durch David Vetter (1971-1984) als „bubble boy disease“ bekannt. Kausal kann die Erkrankung nur durch eine allogene Knochenmark-Stammzell-Transplantation geheilt werden. Jedoch kann es zu Folgeerkrankungen durch die intensive Behandlung kommen. Unter anderem durch die Chemotherapie zur Abtötung des ursprünglichen und kranken Knochenmarks. Im Versuchstadium befinden sich Therapieansätze der Gentherapie [BUCKLEY RH 2004; SITZMANN, 2007].

2.6 Ziele der Arbeit

Bei den Patienten in der Radioonkologie werden eine Vielzahl von Bestrahlungsreaktionen gesehen. Neben den aktuell objektivierbaren Faktoren aus Therapieschema (Tages- und Gesamtdosis, Fraktionierung und Anzahl der Bestrahlungen, Kombination mit einer Chemotherapie) und dem Zielgebiet (bestrahltes Organ, angrenzendes und durchstrahltes Gewebe), gibt es interindividuelle Unterschiede in der Ausprägung der Symptome und dem zeitlichem Auftreten einer Bestrahlungsreaktion bei den einzelnen Patienten.

Genetische determinierte Unterschiede in der DNA-Reparatur, insbesondere bei den biologisch bedeutsamen DNA-Doppelstrangbrüchen sind anzunehmen. Da ebenfalls eine Differenz in der Bestrahlungstoleranz der einzelnen Organe zu beobachten ist, könnte eine gewebespezifische DSB-Reparatur angenommen werden.

Die Phosphorylierung der Histone H2AX gilt als Anhaltspunkt für einen stattgefunden DSB. Durch den Nachweis dieser IRIF können Unterschiede in der DSB-Reparatur belegt werden [LÖBRICH et al. 2005].

Vor diesem Hintergrund wurden Mäuse mit einer unterschiedlichen, genetisch definierten Strahlenempfindlichkeit und DSB-Reparatur nach einer Bestrahlung mit der γ -H2AX-IRIF-Methode untersucht. Die verwendeten Strahlendosen lagen in dem im klinischen Alltag gebräuchlichen Dosisbereich von 0,1 Gy bis 2 Gy. Durch Tiere mit einer natürlichen Strahlensensibilität (Mausstamm C57BL/6) wurde die DSB-Induktion ermittelt. Eine vergleichende Analyse der DSB-Reparaturverläufe wurde bei reparaturprofizienten (C57BL/6) und reparaturdefizienten (BALB/c-, AT- und SCID) Mausstämmen durchgeführt. Ausgewertet wurde das strahlenempfindliche Organ Niere.

Die vorgelegte Arbeit versucht einen Beitrag zu folgenden Fragen zu leisten:

1. Ist es möglich, einen Schaden durch klinisch relevante Strahlendosen in dem Normalgewebe Niere nachzuweisen und zu quantifizieren?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Dosis und den quantitativ messbaren DSB?
3. Ist es möglich, die spezifische DSB-Reparaturkapazität von Mäusen mit definierten Reparaturdefekten bei klinisch relevanten Dosen zu bestimmen?
4. Wie ist der zeitliche Verlauf einer DSB-Reparatur in den ersten 48 Stunden nach einer Bestrahlung? Gibt es Unterschiede bei den Mausstämmen?
5. Wie unterscheidet sich die Reparaturkapazität der untersuchten Niere von denen anderer Organe? Gibt es eine gewebespezifische Reparatur?

3 Material und Methoden

3.1 Mausstämme

In den Versuchen der vorgelegten Arbeit wurden Mausstämme mit genetisch definierten Unterschieden in der DSB-Reparatur eingesetzt. Der verwendete Mausstamm C57 black 6 (C57BL/6) ist einer der am häufigsten in der Forschung als Modellorganismus für menschliche Erkrankungen genutztes Versuchstier. Sein Genom war weltweit das zweite vollständig sequenzierte einer Säugetierspezies [WATERSTON et al., 2002]. Die Zuchtlinie gehört der Taxonomie nach zu den Hausmäusen (*Mus musculus*). Sie ist leicht zu züchten und zeichnet sich durch eine Robustheit aus. Aufgrund seiner natürlichen Strahlentoleranz diente dieser Mausstamm als Modell für eine funktionierende DSB-Reparatur und damit als Kontrollgruppe. Verglichen wurde dieser Stamm mit Mäusen mit einer anerkannten DSB-Reparatureinschränkung.

Die strahlenempfindlichsten Tiere in den Versuchsreihen waren die Mäuse mit dem SCID-Syndrom. Dieser Mausstamm wird in der Grundlagenforschung zum Immunsystem, zu Krebs- und Säugetierkrankungen verwendet. Durch die oben beschriebene Mutation (siehe Kapitel 2.5.4) besteht neben einem schweren Defekt im Immunsystem eine gestörte DSB-Reparatur.

Die Mäuse vom Typ Ataxia telangiectasia besitzen homozygot das mutierte ATM-Gen. Wie beim Menschen besteht eine Prädisposition für maligne Erkrankungen und eine erhöhte Sensibilität für ionisierende Strahlung. Ursächlich wird die zentrale ATM-Rolle in den einzelnen Reparaturwegen angenommen. Bei in Zellkultur genommenen Fibroblasten mit dem mutierten ATM-Protein konnte nicht nur ein Defizit eines Zellzykluscheckpoints, sondern auch ein DSB-Reparaturdefekt als Ursache für die Strahlensensibilität bestimmt werden [KÜHNE et al., 2004].

Der vierte verwendete Mausstamm ist BALB/c. Es ist ein seit 1920 in Tierversuchen erfolgreich eingesetzter durch Inzucht erhaltender Mausstamm. Er findet Verwendung in der Krebs- und immunologischen Forschung. Die Albinomäuse entwickeln gehäuft bösartige Erkrankungen wie Lungen- und Nierenkarzinome. Die Ausbildung von Neoplasmen kann durch exogene Einflüsse stimuliert werden. Neben Giftstoffen kann dies durch ionisierende Strahlung geschehen [Mouse Genome Informatics].

Aufgrund der genetischen determinierten Eigenschaften der Versuchstiere mussten diese unter besonderen Bedingungen gehalten werden. Zur Minimierung des Infektionsrisikos erfolgt die Zucht in apathogen Räumen mit gefilterter und gesonderter Luftzufuhr, Luftfeuchtigkeit bei 55 % (+/- 10%), Raumtemperatur von 22 °C (+/- 2 °C), einem Tage-Nachtrhythmus von 12 h zu 12 h und 4 bis 5 Tieren pro Käfig.

Die Mausstämme C57BL/6 (Genotyp: Wildtyp, C57BL/6NCrl), BALB/c (BALB/c, AnNCrl) und SCID (CB17/Icr-Prkdc, scid/Crl) wurden von der Firma Charles River Wiga Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die homozygoten AT-Mäuse (129S6/SvEvTac-A-T-tm1Awb-/J, homozygot rezessiv atm/-) von der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, Main, USA) importiert.

Für die Versuche wurden weibliche und männliche Tiere im Lebensalter von 12 Wochen verwendet. Vor der Versuchsdurchführung wurde den Tieren eine Woche Zeit zur Eingewöhnung gegeben.

Tabelle 4:

Anzahl der je Versuch verwendeten Mäuse pro Mausstamm. Zeitpunkt der Gewebeprobenentnahme nach Bestrahlung:

Versuch	Maustamm	Anzahl	Dosis (Gy)	Zeitpunkt (h)
DSB-Reparaturkinetik	C57BL/6	20	2	0,5, 2,5, 5, 24, 48
		4	0	Kontrolle
	BALB/c	15	2	0,5, 2,5, 5, 24, 48
		3	0	Kontrolle
	AT	8	2	0,5, 2,5, 5, 24, 48
		2	0	Kontrolle
	SCID	15	2	0,5, 2,5, 5, 24, 48
		3	0	Kontrolle
DSB-Induktion	C57BL/6	9	0,1/ 0,5/ 1	0,1
		3	0	0,1
	SCID	3	0,1/ 0,5/ 1	0,1
		1	0	0,1

3.2 Versuche

Für eine homogene Dosisverteilung wurden alle Mäuse einer Ganzkörperbestrahlung unterzogen. Der Bestrahlungsplan wurde mit dem ADAC-Pinnacle-System der Firma ADAC Laboratories (Milpitas, Kalifornien, USA) für dreidimensionale Bestrahlungsplanung erstellt. Die Dosisverteilungsanalyse ergab eine 95% Verteilung der Isodosen auf das gesamte Tier. Als Quelle für die ionisierende Strahlung diente ein Linearbeschleuniger (Modell MDX der Firma Siemens).

Die Versuchstiere wurden in Vollnarkose bestrahlt. Die Narkose erfolgte durch eine biologisch titrierte Allgemeinanästhesie über eine intraperitoneale Applikation von 1 ml einer 10 ml Lösung aus Rompun ® 2%ig (Wirkstoff: Xylazin) und 0,75 ml Ketamin (1 Ampulle: 500 mg Ketamin/ 10 ml Trägerlösung) auf 10 ml mit NaCl 0,9% aufgefüllt. Diese Form der Anästhesie wurde in letaler Dosis auch während der Organentnahme zur Gewebeprobengewinnung verwendet.

Während der Bestrahlung wurden die Mäuse in speziell angefertigten Plastikzylindern (Durchmesser von 20 cm und Höhe von 5 cm, Materialstärke von 1,5 cm) untergebracht. Durch die Gewebeäquivalenz des Plastikmaterials konnte eine akzeptable Dosisuniformität erreicht werden.

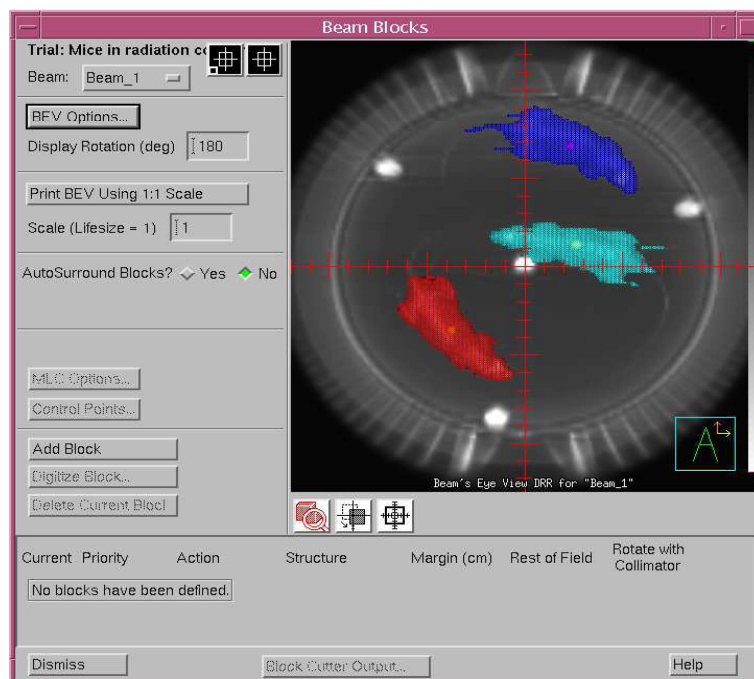


Abbildung 10:

Teil 1 des Bestrahlungsplans der Versuche für die Ganzkörperbestrahlung der Mäuse.

Für die Untersuchung der DSB-Induktion wurden Mäuse der Stämme C57 und SCID bestrahlt. Die Strahlendosis betrug je Maus einmalig 0,1 Gy, 0,5 Gy oder 1 Gy. Nach einem Intervall von 10 min wurden die Organe der Tiere asserviert.

Zur Gewinnung der DSB-Reparaturkinetiken wurden die Tiere der vier Mausstämmen mit je 2 Gy bestrahlt. Zu den Zeitpunkten 30 min, 2,5 h, 5 h, 24 h und 48 h nach der Bestrahlung wurden die Organe entnommen. Pro Zeitpunkt wurden zwei Tiere vom AT-Stamm (bei 30 min und 2,5 h ein Tier) und drei Tiere von den Mausstämmen C57BL/6, BALB/c, SCID ausgewertet.

Die unbestrahlten Mäuse der Kontrollgruppen wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten. Sie durchliefen den Experimentaufbau ohne Bestrahlung, den Tierschutzbestimmungen entsprechend, ohne die belastende Allgemeinanästhesie. Durch sie wurde die Strahlenbelastung durch die natürliche Radioaktivität der Umgebung bestimmt. Mit diesen Werten konnte der Schaden der definierten Strahlendosen durch den Beschleuniger ermittelt und die Plausibilität der Versuchsergebnisse sichergestellt werden.

Alle Versuche wurden entsprechend den internationalen Leitlinien der „Institutional Animal Care and Use Guidelines“ durchgeführt. Das Protokoll der Versuche wurde von dem Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz (Saarbrücken, Saarland) über die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes geprüft und genehmigt.

Tabelle 5:

Bestrahlungsparameter:

Strahlungsenergie:	6 MeV durch Photonen
Dosisleistung:	2,0 Gy/ min
Bestrahlungszeit:	entsprechend der gewünschten Dosis
Quellen-Haut-Abstand (Source-skin-distance = SSD):	99 cm
Größe der Bestrahlungsfläche:	30 cm x 30 cm

Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in murinem Nierengewebe

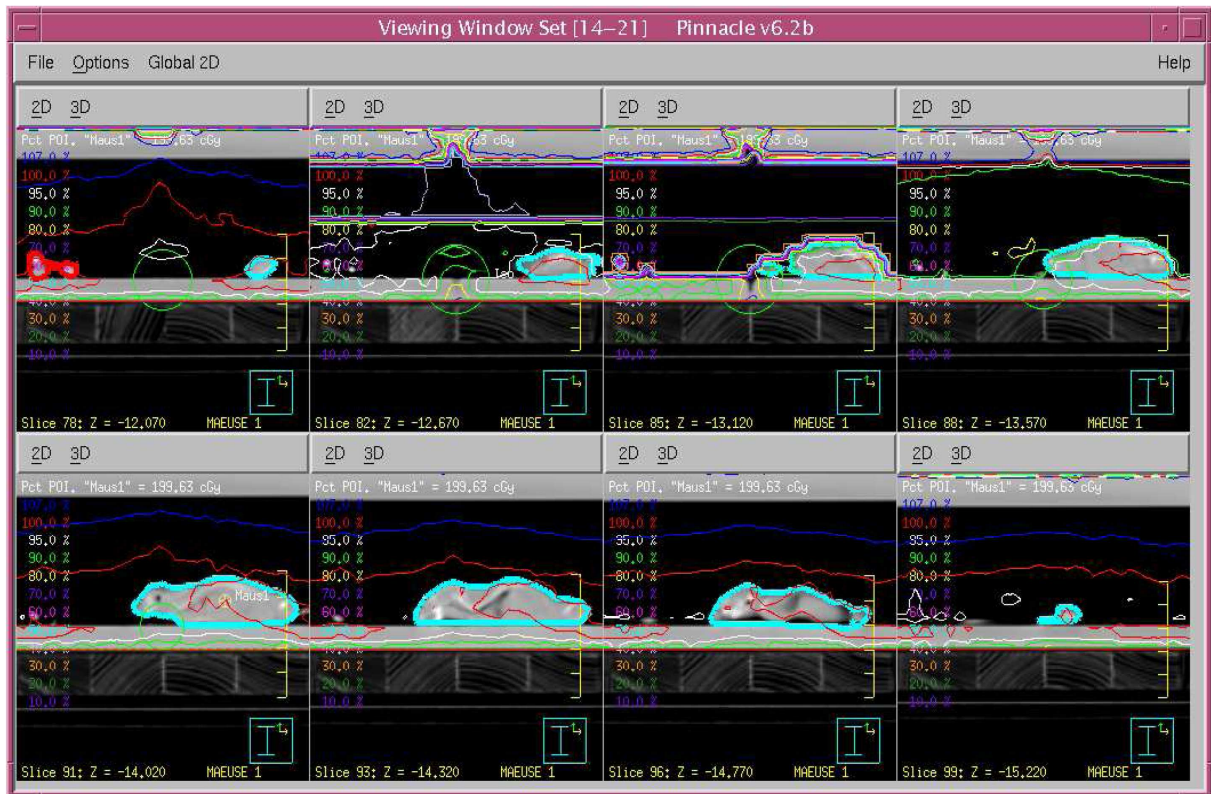


Abbildung 11:

Teil 2 des Bestrahlungsplans der Versuche: 95 % der Isodosen verteilen sich auf den Körper der Maus bei einer Bestrahlung mit 2 Gy.

3.3 Gewebeprobengewinnung

Im Prozess der Gewebegewinnung wurde zuerst Blut aus dem linken Herzventrikel per Punktion entnommen. Die weiteren Organe wurden im Anschluss asserviert. Es erfolgte für Gehirn, Lunge, Milz, Niere, Dünndarm, Herz und Hoden eine Fixierung in neutralgepufferter 4% Formalinlösung bei Raumtemperatur über Nacht. Der Zuschnitt und die Einbettung wurden am Folgetag durchgeführt. Vor der Einbettung in Paraffin wurden die Gewebeproben durch eine Verdünnungsreihe in aufsteigender Konzentration aus Ethanol in Wasser und dann aus Dimethylbenzol entwässert. Die Niere wurde im Ganzen eingebettet. Zur Analyse der Organgewebe wurden die Gewebeschnitte in einer Schichtdicke von 4 μm angefertigt.

3.3.1 Immunhistologische Färbung von γ -H2AX-IRIF

Der Färbung vorgeschaltet war die Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte in zwei Bädern aus Dimethylbenzol über 10 min und Bädern aus Ethanol in Wasser mit absteigender Konzentration (100%, 96%, 90%, 80%, 70 %) über 2 min. Abschließend in einem reinen Wasserbad über 1 min.

Für die Antigendemaskierung wurden die Schnitte in einem Bad aus Zitratpuffer (DAKO Retrieval puffer, S#-2031, Glostrup, Dänemark; pH = 6,0) über 60 min bei 96° C erhitzt. Abgeschlossen wurde der Prozess durch ein Bad in einer phosphatgepufferten Salzlösung (phosphate buffered saline; PBS) auf einem Schüttler über 5 min.

Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch ein Bad in 3% Wasserstoffperoxidlösung über 30 min geblockt. Ein Wasserspülbad über 2 min beendete den Prozess.

Den nachfolgenden Färbeschritten waren je drei Spülbäder der Schnitte mit PBS über 10 min zwischengeschaltet. Die unspezifischen Antigenbindungsstellen wurden zuerst geblockt. Dies erfolgte durch die Inkubation der Schnitte mit *normal-Rabbit-Serum* (cat. #642921 ICN, Irvine, Kalifornien, USA) über 60 min bei Raumtemperatur.

In einem Verhältnis von 1:800 in PBS wurde dann der primäre Anti- γ -H2AX-Antikörper (Antiphospho-H2AX an Serin 139; Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA) verdünnt und die Schnitte mit der Antikörperlösung über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4° C inkubiert.

Nach der Beendigung der Inkubation durch drei Waschungen mit PBS über 10 min, erfolgte die Inkubierung der Schnitte mit *Goat-anti-Rabbit-Antikörpern* (Invitrogen, cat. #A11001) in einer Verdünnung mit PBS (1:200) in einer Feuchtkammer über 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend folgte eine Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (ABC complex, Dako, Glostrup, Dänemark) über 30 min bei Raumtemperatur und zwei Spülungen der Schnitte über 10 min mit PBS.

Abgeschlossen wurde die γ -H2AX-Markierung mit einer Diaminobenzidinanfärbung (DAB, Sigma) bis sich eine braune Farbe zeigte. Die Reaktion wurde dann mit einem PBS-Bad gestoppt. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hematoxylin für 45 s.

Nach dem Abspülen der nicht gebundenen Farbstoffe von den Schnitten unter fließendem Wasser, erfolgte die Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholverdünnungsreihe. Abschließend wurden die wasserfreien Schnitte mit dem Einschlussharz Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) konserviert.

3.3.2 Immunfluoreszenz-Gewebefärbung von γ -H2AX-IRIF

Analog zur γ -H2AX-Immunhistologischen Färbung wurden im ersten Schritt die paraffinierten Gewebeschnitte entwachst. Beginnend mit zwei Dimethylbenzol-Bädern über 10 min, einer Rehydrierung in Bädern mit einer absteigenden Ethanol-Wasser-Verdünnungsreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%) über 2 min und reinem Wasser über 1 min. Für die Wiederherstellung der Antigenbindungsstellen wurden die Schnitte in einem Bad aus Zitratpuffer (DAKO Retrieval puffer, S#-2031, Glostrup, Dänemark; pH = 6,0) über 60 min bei 96° C erhitzt. Danach folgte ein Bad in PBS auf einem Schüttler über 5 min.

Wie bei der γ -H2AX-Immunhistologischen Färbung waren den nachfolgenden Färbeschritten je drei Spülbäder der Schnitte mit PBS über 10 min zwischengeschaltet.

Im nächsten Schritt wurde für die Blockung der unspezifischen Bindungsstellen die Schnitte über 60 min bei Raumtemperatur mit *normal-Goat-Serum* (cat. #642921, ICN, Irvine, Kalifornien, USA) inkubiert.

Über Nacht bei 4° C in einer Feuchtkammer wirkte dann der primäre monoklonale Maus-Antikörper gegen γ -H2AX (Antiphospho-H2AX an Serin 139; Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA) im Verhältnis 1: 1600 in PBS auf die Schnitte ein.

Am nächsten Tag erfolgt die Inkubation mit dem Fluoreszenzantikörper. Genutzt wurde der biotinylierten *Goat-anti-Mouse-IgG-Antikörper* vom Typ Alexa Fluor 488-konjugiert (cat. #A11001, Invitrogen). Absorptionsmaximum bei 495 nm und Emmissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 519 nm. Dies geschah in der Verdünnung 1: 200 in PBS und über 60 min bei Raumtemperatur in einer lichtgeschützten Feuchtkammer.

Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgt mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindol) bei 4° C über Nacht im Dunkeln. Absorptionsmaximum bei 358 nm und Emmissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 461 nm. Abgeschlossen wurde die Fluoreszenzfärbung der Gewebsschnitte durch den Fixierungsprozess im Einschlussharz Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland).

3.3.3 γ -H2AX-IRIF Analyse

Die Gewebeschnitte wurden mit dem Mikroskop „E600 DIC/ epi-fluorescence“ der Firma Nikon ausgewertet. Das Mikroskop war mit einer „charge-compled device“ (CCD)-Sensor-Kamera und einer Akquisitions-Software für PC ausgestattet.

Die Untersuchung der Gewebeschnitte mit der γ -H2AX-Immunhistologischen Färbung erfolgt per Durchlichtmikroskopie. Eine Differenzierung der γ -H2AX-IRIF wurde in einer Vergrößerung am Okular von 12,5fach und den Objektiven von 60facher und 100facher Vergrößerung durchgeführt. Zur Auflösungssteigerung wurde mit Immersionsöl gearbeitet.

Für die Quantifizierung der γ -H2AX-IRIF wurde das Verfahren der Epifluoreszenzmikroskopie genutzt und die γ -H2AX-immunfluoreszenzgefärbten Schnitte ausgewertet. Als monochromatische Lichtquelle diente eine Quecksilberdampfampe. In den Vergrößerungen von 750fach und 1250fach wurden die einzelnen γ -H2AX-IRIF mit dem Auge gezählt. Bei einer Wellenlänge um die 519 nm erscheinen diese zyangrün. Als echter DSB wurde nur ein IRIF gewertet, der sich bei einer Wellenlänge um die 461 nm in dem umschlossenen Bereich der mit DAPI bläulich gegengefärbten Zellkernen bzw. der DNA/ RNA befand.

Aufgrund der Zellstruktur wurden im Nierengewebe vor allem IRIF in den Zellkernen des Tubulussystems gewertet. Diese sind rundlich und lassen sich über mehrere Ebenen in den Gewebsschnitten verfolgen. Die einzelnen IRIF sind gut von einander zu differenzieren. In kleineren Zellen war es nicht möglich, zwei IRIF von einander abzugrenzen.

Für eine statistisch fundierte Aussage wurden in den Gewebeschnitten der Niere mindestens 100 Zellen, bzw. 100 IRIF bei geringer IRIF-Anzahl gezählt. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der ausgewerteten Zellen im Gewebeschnitt geachtet. Die gewonnene Anzahl wurde zu den ausgewerteten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Von diesen so erhaltenen Daten wurden zu den einzelnen Zeitpunkten nach der Bestrahlung die in den Kontrollen bestimmten Werte der natürlichen Hintergrundstrahlung subtrahiert.

4 Ergebnisse

Mit den verwendeten antikörperbasierten Färbemethoden war es möglich γ -H2AX-IRIF in den untersuchten Nierengewebeschnitten nachzuweisen. In dem komplexen Organsystem Niere konnte die Induktion und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach einer Bestrahlung beobachtet werden. Es gelang, die Methode als ein quantitatives und qualitatives Untersuchungsinstrument im Bereich klinisch relevanter Dosen zu etablieren. Mit der verwendeten γ -H2AX-Immunohistochemie war es möglich die IRIF und damit die Doppelstrangbrüche mit der sie umgebenden mikroskopischen Anatomie qualitativ zu beobachten. In den angelegten Dauerpräparaten war eine genaue Identifizierung der einzelnen Zelltypen möglich. Für die Quantifizierung der γ -H2AX-IRIF wurde die lichtempfindliche γ -H2AX- Immunfluoreszenz-Gewebefärbung genutzt.

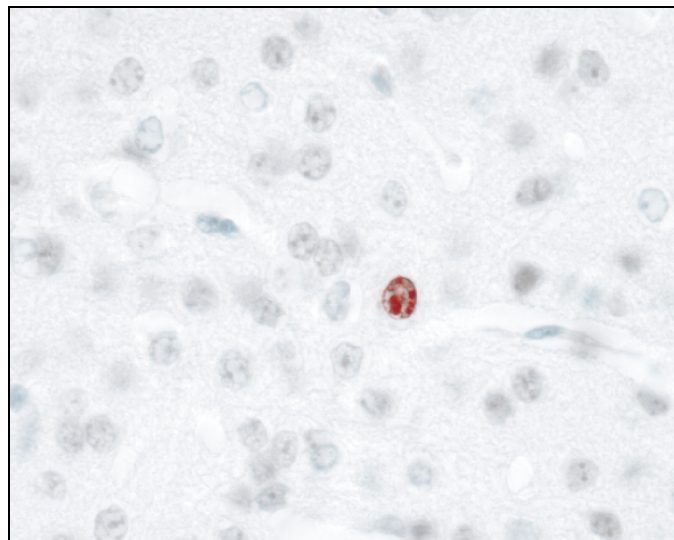


Abbildung 12 :

Immunhistologische γ H2AX-Färbung der Niere des Mausstamms C57BL/6 (Original-Vergrößerung 750fach): In den Gewebsschnitten in der Durchlichtmikroskopie ist der histologische Aufbau der Niere klar zu erkennen. Tubulusgewebe ist von Gefäßendothel und Erythrozyten gut zu differenzieren. Das unbestrahlte Normalgewebe zeigt fast keine γ H2AX-IRIF. Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy sind γ H2AX-IRIF erkennbar als bräunliche Granula in den Zellkernen. 30 min nach Bestrahlung findet man, wie hier abgebildet, in fast jedem Kern γ H2AX-IRIF.

4.1 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere

In den Versuchen zur DSB-Induktion wurden Mäuse vom C57BL6- und SCID-Stamm einmalig mit 0,1 Gy, 0,5 Gy oder 1 Gy bestrahlt. Die Auswertung der γ -H2AX-IRIF erfolgte zum Zeitpunkt 10 min nach Bestrahlung und wurde durch das Zählen der IRIF in der γ -H2AX-Immunofluoreszenz-Gewebefärbung durchgeführt.

Es zeigt sich bei dem Mausstamm C57BL/6 ein lineares Verhältnis von nachgewiesenen γ -H2AX-IRIF zu steigender Dosis. Bei 0,1 Gy wurden pro Zelle im Durchschnitt 0,74 IRIF (+/- 0,06), bei 0,5 Gy 3,90 IRIF (+/- 0,1) und bei 1 Gy 7,94 IRIF (+/- 0,02) gesehen.

Die gefundene Dosiskorrelation bei SCID-Mäusen ist nicht abgebildet. Die Anzahl der analysierten Tiere war zu gering. Die Tendenz zu einem linearen Verhältnis von Bestrahlungsdosis (0,1 Gy: 1,50 IRIF, 0,5 Gy: 7,60 IRIF und 1 Gy: 15,54 IRIF im Durchschnitt pro Zelle) zu nachgewiesenen Schaden war auf einem höherem Niveau gegeben.

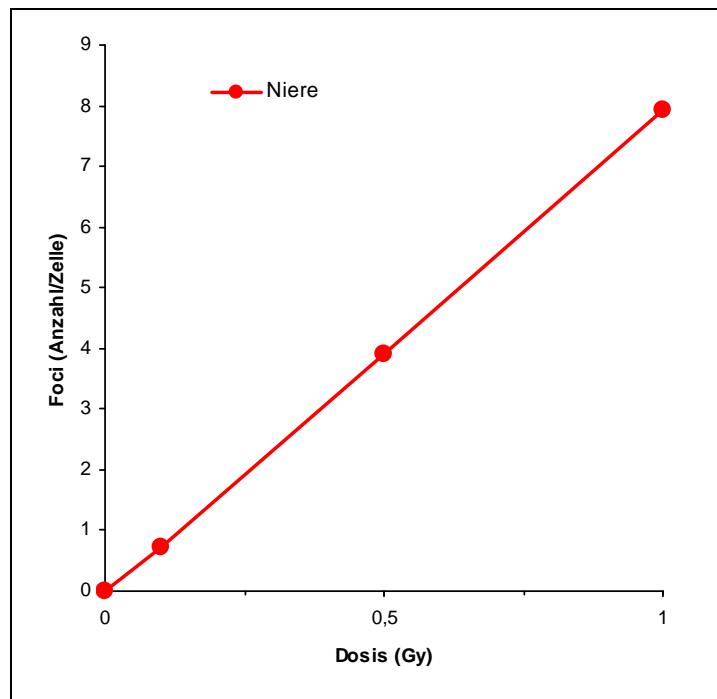
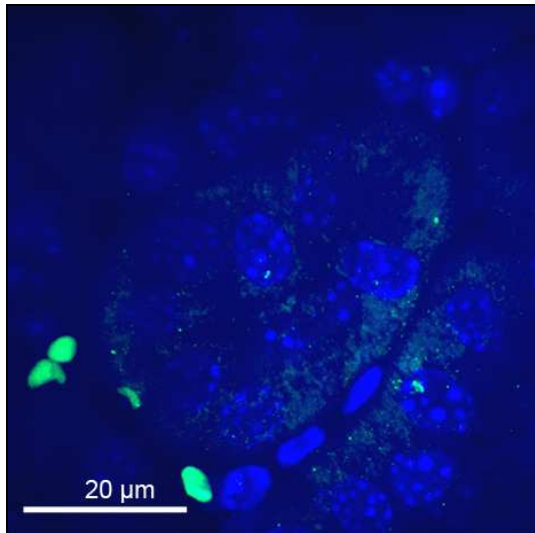
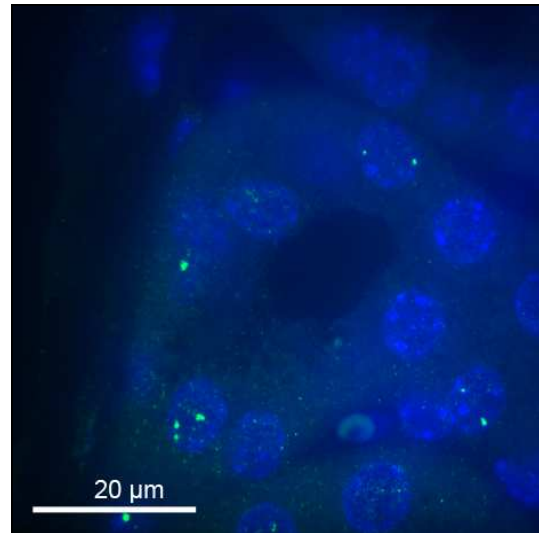


Abbildung 13:

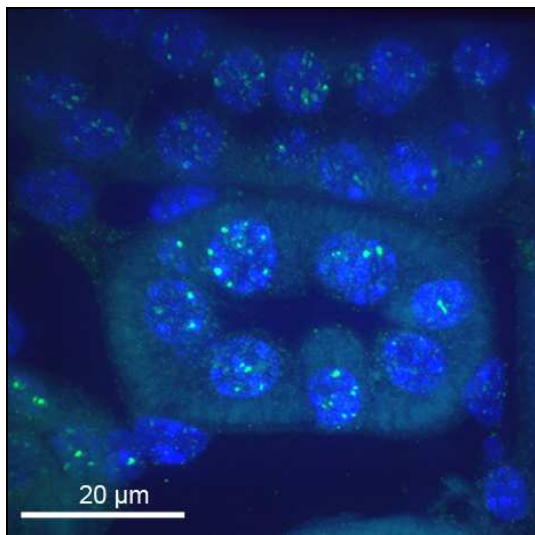
Induktion von DSB der Niere bei C57-Mäusen.



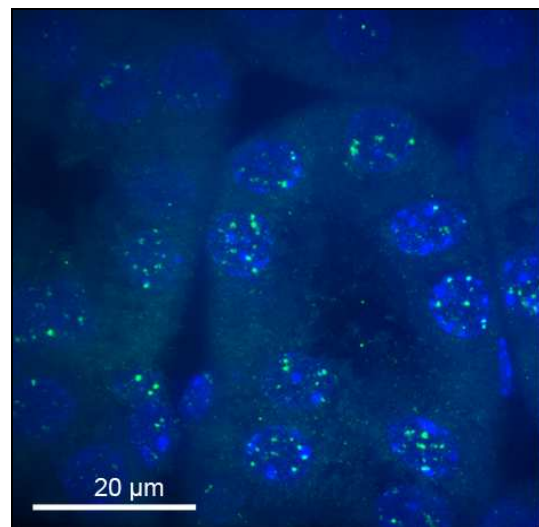
(14a) ohne Bestrahlung.



(14b) nach einer Bestrahlung mit 0,1 Gy.



(14c) nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy.



(14d) nach einer Bestrahlung mit 1 Gy.

Abbildungen 14:

Induktion von DSB der Niere bei C57-Mäusen in γ H2AX-Immunofluoreszenz Gewebefärbung in Kombination mit DAPI-Fluoreszenzfärbung von DNA/ RNA (in Überlagerungstechnik; Originalvergrößerung 1250fach; γ H2AX-IRIF sind hellgrün, DNA/ RNA hellblau). Zu sehen sind Schnitte (14a) ohne und nach einer Bestrahlung mit (14b) 0,1 Gy, (14c) 0,5 Gy und (14d) 1 Gy zum Zeitpunkt 10 min nach Bestrahlung.

4.2 DSB-Reperatur in der Niere

Zur Untersuchung der DSB-Reperatur in der Mausniere wurden die γ -H2AX-IRIF zu den Zeitpunkten 30 min, 2,5 h, 5 h, 24 h und 48 h nach einer Bestrahlung mit 2 Gy ausgewertet. Das Maximum der IRIF war bei den untersuchten Mausstämmen nach 30 min zu finden. Eine weitere Gemeinsamkeit aller Mausstämme war der verzeichnete Rückgang der IRIF im Beobachtungszeitrum.

Die reperaturprofizienten C57BL/6-Mäuse zeigten im Vergleich die geringsten IRIF-Zahlen. Nach einer halben Stunde betrug im Durchschnitt das Maximum 11,16 IRIF (+/- 0,2) pro Zelle. Nach 2,5 h 7,19 IRIF (+/- 0,1), nach 5 h 4,21 IRIF (+/- 0,1) und nach 24 h 1,10 IRIF (+/- 0,04) pro Zelle. Die IRIF-Anzahl 48 h nach Bestrahlung betrug 0,67 IRIF (+/- 0,04) pro Zelle. Im Gegensatz dazu hatten die Mäusen des SCID-Stamms bei den nachgewiesenen γ -H2AX-IRIF zu allen untersuchten Zeitpunkten die höchsten Werte. Nach 30 min war das Durchschnittsmaximum der IRIF 18,16 (+/- 0,18) pro Zelle. Des Weiteren hoben sie sich auch im Reparaturverlauf deutlich von denen der anderen Mausstämme ab. Nach 2,5 h 12,14 IRIF (+/- 0,16), nach 5 h 9,3 IRIF (+/- 0,04) und nach 24 h 7,27 IRIF (+/- 0,02) pro Zelle. Die IRIF-Anzahl 48 h nach Bestrahlung betrug 5,27 IRIF (+/- 0,03) pro Zelle. Im Beobachtungszeitraum erreichten sie damit nicht mehr den Ausgangswert der unbestrahlten Mäuse 0,03 IRIF (+/- 0,002) pro Zelle.

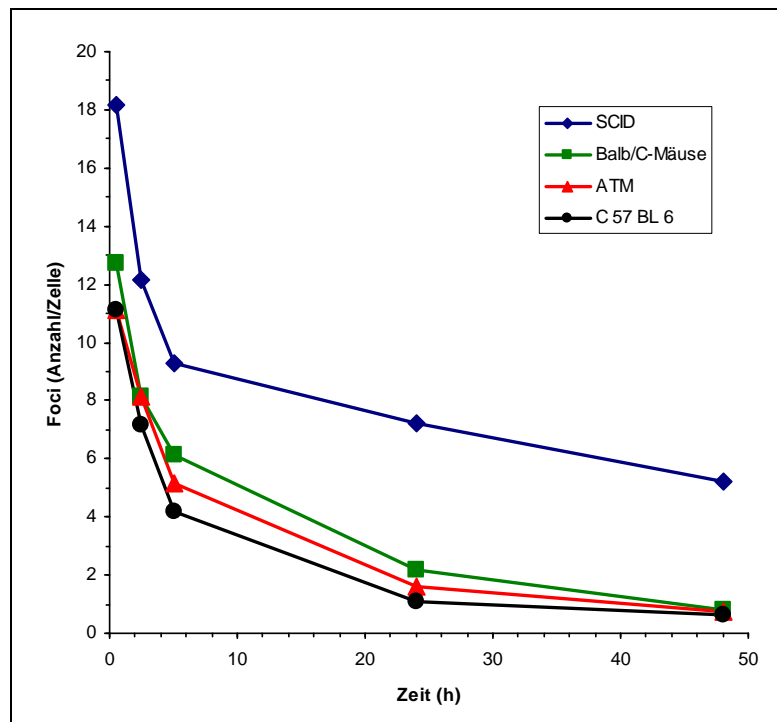
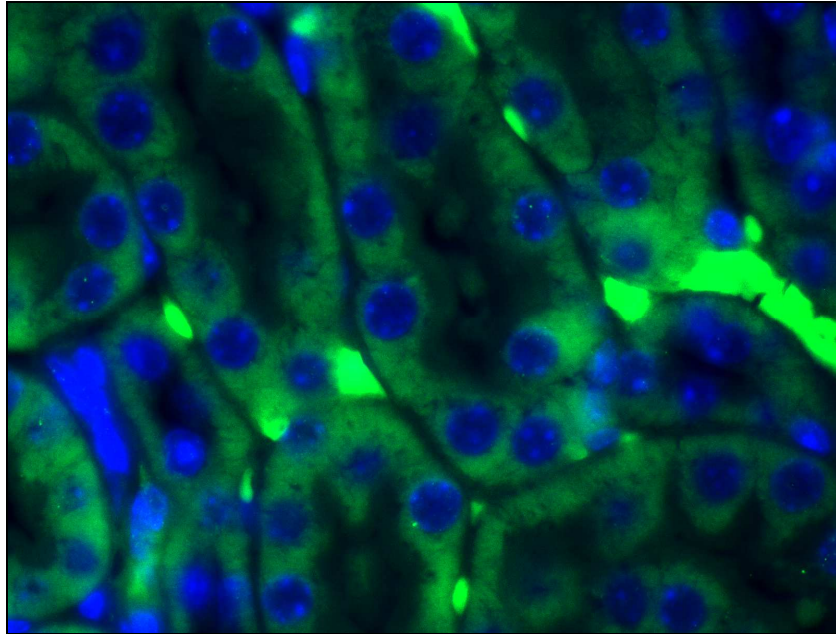


Abbildung 15:

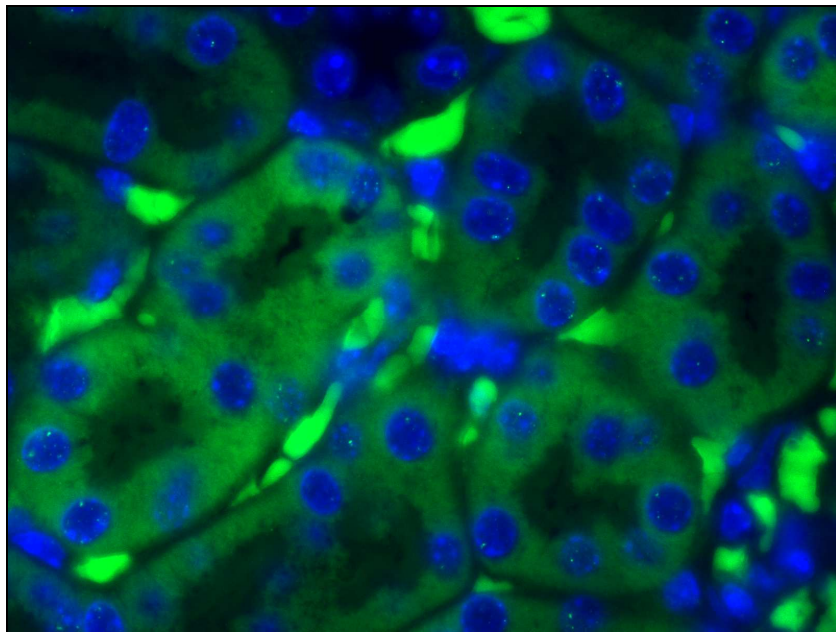
Reparaturkinetik der unterschiedlichen Mausstämme nach einer Bestrahlung mit 2 Gy.

Der Primärschaden des Mausstamms BALB/c an DSB lag 30 min nach der Bestrahlung bei IRIF 12,73 (+/- 0,08) pro Zelle. Im Verlauf des Beobachtungszeitraums nach 2,5 h bei 8,19 IRIF (+/- 0,09), nach 5 h bei 6,15 IRIF (+/- 0,11) und nach 24 h bei 2,19 IRIF (+/- 0,06) pro Zelle. Nach 48 h konnten 0,84 IRIF (+/- 0,04) pro Zelle gezählt werden.

Bei dem vierten untersuchten Mausstamm ATM konnten nicht alle Zeitpunkte nach einer Bestrahlung mit 2 Gy mehrfach untersucht werden. Jedoch zeigte sich in dem Beobachtungszeitraum der Versuche eine den anderen Mausstämmen vergleichbare Entwicklung der IRIF. Es wurden nach 30 min 11,89 IRIF, 2,5 h 9,225 IRIF, nach 5 h 7,31 IRIF (+/- 0,1), nach 24 h 4,08 IRIF (+/- 0,08) und nach 48 h 2,91 IRIF (+/- 0,07) pro Zelle bestimmt.



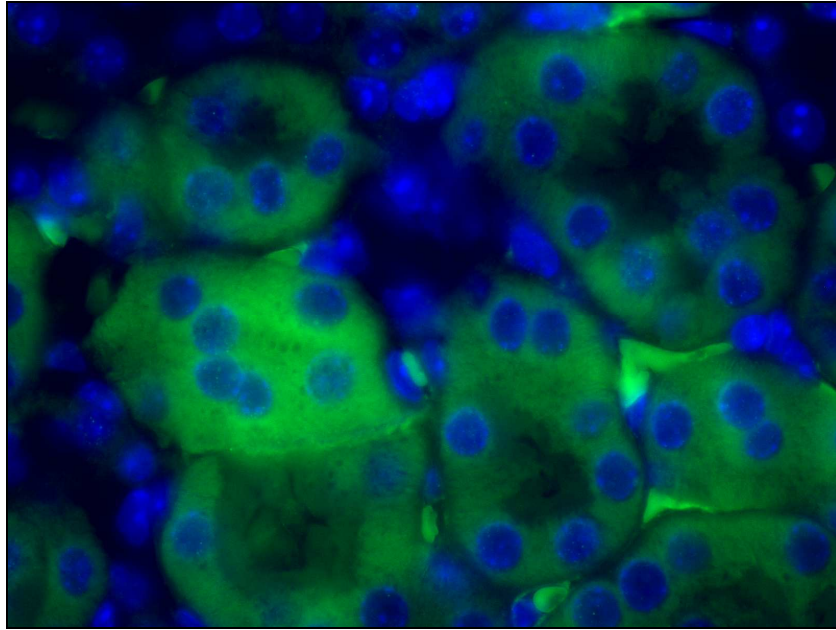
(16a) ohne Bestrahlung.



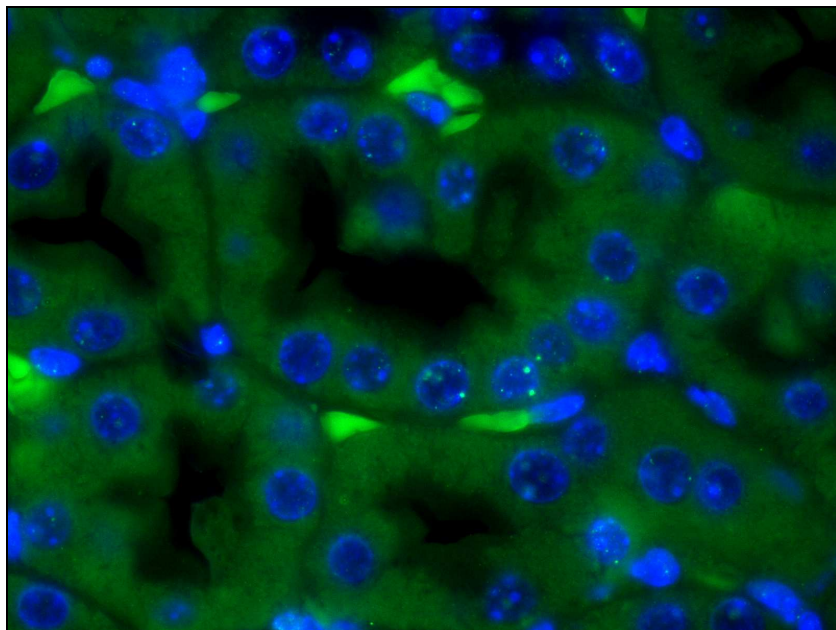
(16b) 24 h nach Bestrahlung.

Abbildungen 16:

γ H2AX-Immunofluoreszenz Gewebefärbung in Kombination mit DAPI-Fluoreszenzfärbung der DNA/ RNA in der Niere von SCID-Mäusen (in Überlagerungstechnik; Original-Vergrößerung 1250fach). Zu sehen sind Schnitte (16a) ohne und (16b) 24 h nach einer Bestrahlung mit 2 Gy.



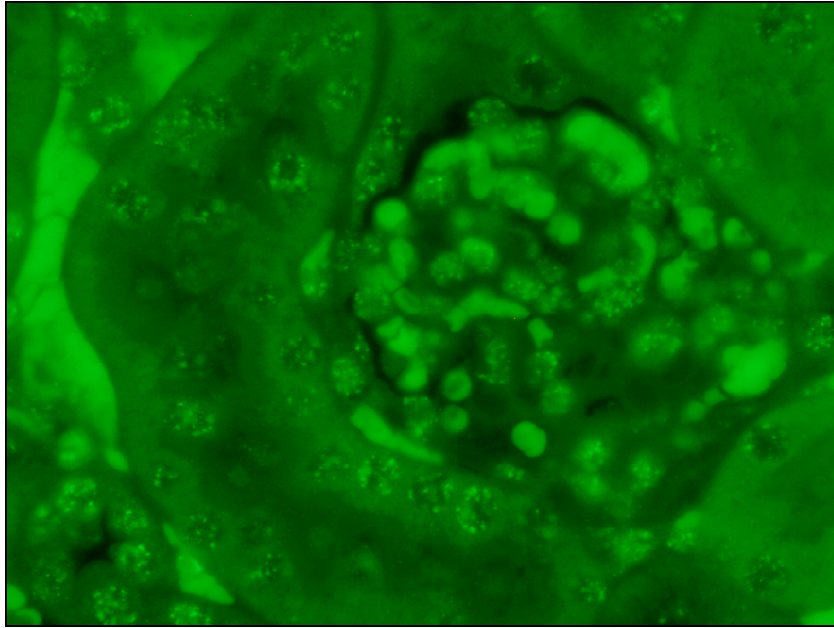
(17a) ohne Bestrahlung.



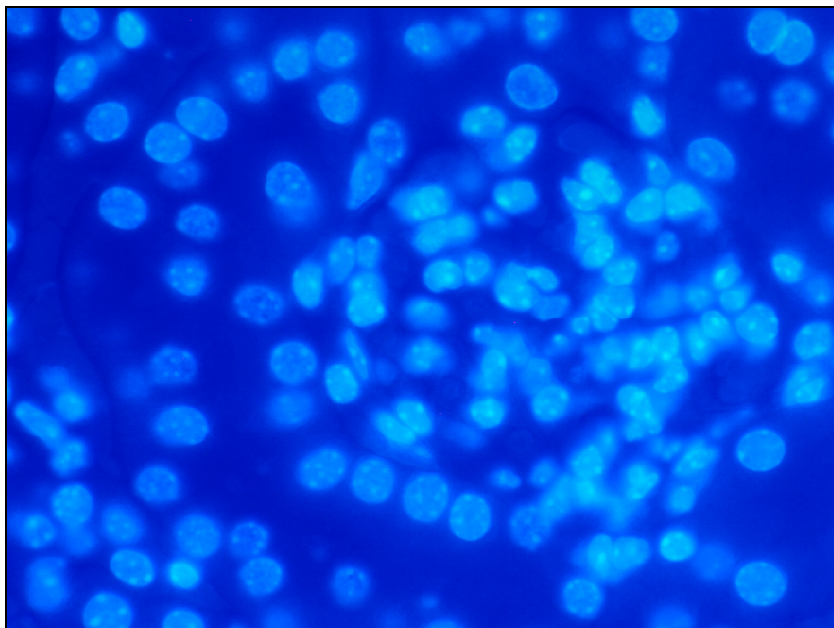
(17b) 24 h nach Bestrahlung.

Abbildungen 17:

γ H2AX-Immunofluoreszenz Gewebefärbung in Kombination mit DAPI-Fluoreszenzfärbung der DNA/ RNA in der Niere von ATM-Mäusen (in Überlagerungstechnik; Original-Vergrößerung 1250fach). Zu sehen sind Schnitte (17a) ohne und (17b) 24 h nach einer Bestrahlung mit 2 Gy.



(18a) γ H2AX-Immunofluoreszenz Gewebefärbung bei 519 nm.



(18b) DAPI-Fluoreszenzgewebefärbung bei 461 nm.

Abbildungen 18:

Gewebeschnitt der Niere einer ATM-Maus von Tubulusepithel und Glomerulus mit Erythrozyten zum Zeitpunkt 30 min nach einer Bestrahlung mit 2 Gy (Originalvergrößerung 1250fach). (18a) γ H2AX-Immunofluoreszenz Gewebefärbung bei 519 nm. Unterschiedliche Größe der Zellkerne und mangelnde Abgrenzbarkeit der Zellkernen im Kapillarepithel. Fehlgebundene Sekundärantikörper. (18b) 4', 6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) - Fluoreszenzgewebefärbung bei 461 nm. Die DNA/RNA ist hellblau gefärbt.

5 Diskussion

Für die vorgelegte Arbeit wurden die Induktion und der Reparaturverlauf von DSB bei klinisch relevanten Einzeldosen ionisierender Strahlung untersucht. Ziel war es, genetisch definierte Unterschiede der Strahlempfindlichkeit in einem Normalgewebe zu bestimmen. Als „in vivo“-Modell dienten vier Mausstämme mit bekannter Profizienz und Defizienz in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Nach einer Bestrahlung wurden die Nieren der Mäuse mit der γ -H2AX-IRIF-Methode analysiert.

5.1 Beobachtungen zur Methodik

Bei der Planung der Versuche war es vorgesehen gewesen die Auswertung der Versuche in einer γ -H2AX-immunhistologischen Gewebefärbung durchzuführen. Die Vorteile der einfacheren Färbemethode, der lichtbeständigeren und histologisch eindeutigeren Dauerpräparate konnten jedoch aufgrund der fehlenden Quantifizierbarkeit der γ -H2AX-IRIF nicht genutzt werden.

Für die quantitative Analyse der γ -H2AX-IRIF gelang es eine Gewebefärbung auf Basis der Immunfluoreszenz zu etablieren. Hier konnten die einzelnen IRIF in den Zellkernen sicher von einander getrennt werden. Bei dieser Methode nachteilig war, neben der reduzierten anatomischen Auflösung, das Ausbleichen der Präparate durch einen äußeren Lichteinfall und das Auswerten mit dem Fluoreszenzmikroskop.

In dem Prozess der Etablierung wurden unterschiedliche „antigen-retrieval“- Agenzien und verschiedene Mischverhältnisse von Antikörpern ausgetestet bis näherungsweise 100% der Zellen in der Niere sich positiv färbten. Eine eindeutige Auswertung war in dem Dosisbereich von 0,1 Gy bis 2,0 Gy und in dem Zeitraum von 10 min bis 48 h nach Bestrahlung möglich. Das Optimum konnte bei einer einmaligen Bestrahlung mit der Dosis von 2 Gy nach 30 min erreicht werden. Zu Zeitpunkten unter 10 min waren die IRIF nicht immer eindeutig zu erkennen und eine optimale Asservierung aller Mausorgane nicht möglich. Aus den Vorversuchen hatte sich ebenfalls ergeben, dass ein repräsentativer Vergleich der DSB-Reparatur bei den gewählten Mausstämmen nur bei einer Dosis von 2 Gy und einem Beobachtungszeitraumes von 48 h gegeben ist. Beispielsweise waren bei einer geringeren Strahlendosis bei dem Maustyp C57/BL6 nach 48 h fast keine vermehrte IRIF-Anzahl im Vergleich zu unbestrahlten Tieren zu finden. Bei höheren Dosen waren die IRIF bei den bekannt DSB-reparaturdefizienten Mausstämmen zu den frühen Zeitpunkten aufgrund der hohen Anzahl nicht immer eindeutig zu trennen. Ferner zeigte sich in den Vorversuchen zu

welchen Zeitpunkten es eine aussagekräftige Dynamik in der IRIF-Anzahl zu sehen ist. So wurde auf eine Analyse der Zeitpunkte 12 h und 36 h nach der Bestrahlung verzichtet.

Einschränkungen in der IRIF-Auswertung in der Niere ergaben sich durch die Besonderheiten der histologischen Struktur. Durch ihre Funktion unterscheiden sich die verschiedenen Zelltypen der Niere stark in Form und Größe. Im Vergleich von Zellen des Tubulussystems mit denen des Nierenkörperchens, fallen besonders die bestehenden Unterschiede in der Größe der Zellkerne und der Kern-Plasma-Relation auf. Deshalb war beim Mikroskopieren eine sichere visuelle Trennung der Kerne meist nur in den Zellen der Tubulussystems gegeben. Für das Erstellen einer reproduzierbaren quantitativen Analyse wurde aus den oben genannten Gründen die Auswertung im Allgemeinen auf das gleichmäßig verteilte Tubulusepithel begrenzt. Plattenepithelien bzw. Urothel wurde bei hoher IRIF-Anzahl im Gewebe ausgeschlossen. In die Wertung einbezogen wurde ein Focus nur, wenn er sich eindeutig im DAPI-gegegenfärbten Zellkern befand.

Von weiteren Epiphänomenen ist zu berichten: Bei einem zufälligen Ungleichgewicht in der Färbung der Schnitte kam es vor, dass sich beim Mikroskopieren der Eindruck eines „Sternenhimmels“ durch fehlgebundenen Fluoreszenzantikörper präsentierte. So war die optische Diskriminierung der einzelnen IRIF nicht sicher durchzuführen. Ebenfalls kritisch war die Analyse von Schnitten, bei denen sich keine homogene Färbung aller Zellen einer Zellart zeigte. Bei guter Färbung war ein IRIF durch mehrere Schichten eines Schnittes zu verfolgen und seine dreidimensionale Struktur klar zu erkennen. Im Verlauf des beobachteten Reparaturprozesses nach einer Bestrahlung verdichteten sich die erst wolzig scheinenden IRIF, wurden dann kleiner, bis sie schließlich ganz verblassten. Bei den genannten Abweichungen wurde ein IRIF nicht gewertet bzw. ein „fehlgefärbter“ Schnitt verworfen.

Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass eine Ruhephase nach Abschluss der Immunfluoreszenz-Gewebefärbung von 24 h die Schnitte reifen ließ und die Analyse der Gewebeproben verbesserte. Im Ansatz deutlich wurde der erwartete Unterschied in der IRIF-Struktur von Gewebeschnitten der Tiere mit ATM-Defizienz. Durch das Enzym DNA-PKcs erzeugte γ -H2AX-IRIF waren kleiner und schwächer ausgeprägt [PAUL et al., 2000; BURMA et al., 2001].

5.2 Diskussion der Versuchsergebnisse

Mit früher geläufigen Methoden der DNA-Analyse ist es nicht möglich, den Schaden an seinem Entstehungsort im Zellkern darzustellen. Die Zellen und Gewebe müssen aus ihrem natürlichen Verband herausgelöst und zerstört werden. Mit dem Verfahren der Pulsfeldgelelektrophorese kann erst nach einer Aufbereitung und der Auftrennung der DNA-Fragmente der Masse nach der DNA-Schaden untersucht werden. Bei geringeren Energiedosen als 5 Gy sind die DNA-Fragmente nach der Auftrennung nicht eindeutig [CHU et al, 1986]. Die Chromosomenanalyse auf Genomveränderungen mit der Fluoreszenz-, „in situ“-Hybridisierung (FISH) erfolgt auch mit denaturierter DNA. Sie arbeitet mit definierten DNA-Sonden und kann so spezifische Genomveränderungen bekannter DNA-Sequenzen nachweisen. Eine gleichzeitige Quantifizierung aller strahlungsbedingter DNA-Doppelstrangbrüche ist nicht möglich [COLUMNA et al, 2006].

Mit der für diese Arbeit verwendete Gewebefärbung für γ -H2AX-IRIF können Doppelstrangbrüche „in vivo“ nachgewiesen werden. Es gelang eine Quantifizierung des Schadenausmaßes bei klinisch relevanten Einzeldosen ionisierender Strahlung. Zwar ist das Verfahren durch den Nachweis von phosphorylierten Histonen indirekt, jedoch kann im physiologischen Gewebeaufbau die Entstehung und der zeitliche Reparaturablauf von DSB beobachtet werden.

Durch die Wahl der Organkonservierung in einer Formaldehydlösung und der Paraffineinbettung war es möglich, die Ergebnisse, trotz der Verwendung einer lichtsensiblen und damit instabilen Immunfluoreszenzfärbung, zu reproduzieren. Der denaturierende Effekt dieser Methode war während der Analysen nicht bedeutsam. Veränderte Zellen an den Rändern der Schnittpräparate wurden nicht ausgewertet.

Der repräsentative Nachweis von bestrahlungsinduzierten DSB wurde durch den gewählten Versuchsaufbau gewährleistet. Dafür war es notwendig, andere Ursachen für γ -H2AX-Ansammlungen (γ -H2AX-Foci) im Zellkern auszuschließen. Durch die Auswertung von γ -H2AX-IRIF im Dauergewebe Niere konnte die Anzahl vieler physiologischer Foci anderer Ursachen reduziert werden. Zu beachten waren endogene DSB in Geweben mit einer erhöhten meiotischen und mitotischen Aktivität. Beispielhaft sind hier Hodengewebe [HAMER et al., 2003; MAHADEVAIAH et al., 2001] und Tumorzellen [WARTERS et al, 2005; MAHRHOFER et al., 2006; YU et al., 2006] zu nennen. Ebenfalls in Zellen mit somatischer Rekombination, wie den Zellen des Lymphsystem mit der V(D)J-Rekombination, treten vermehrt echte DSB auf [YIN et al, 2009]. Des Weiteren kann es im Prozess der Apoptose, der DNA-Fragmentierung zu einer H2AX-Phosphorylierung kommen [MUKHERJEE et al., 2006].

Durch die Auswertung von unbestrahlten Kontrolltieren der einzelnen Maustämme und dem zu einander in das Verhältnis setzen mit den bestrahlten Tiere wurde der Einfluss zum Versuchszeitpunkt unbekannter DSB-erzeugender Agenzien auf die Versuchsergebnisse reduziert. Die bei den unbestrahlten Tieren bestimmten γ -H2AX-Werte war sehr gering und bei allen Mäusen in etwa gleich hoch. Der Ursprung der dennoch gefundenen γ -H2AX-Foci liegt am ehesten in der natürlichen Hintergrundstrahlung. Somit haben die für die bestrahlten Tiere bestimmten IRIF-Werte ihren Ursprung in dem durch den Beschleuniger verursachten Schaden.

Bei der Bewertung der Versuchsergebnisse ist es wichtig, die Dynamik des zellulären Prozesses der γ -H2AX-IRIF-Induktion zu berücksichtigen [KINNER et al., 2008; BEKKER-JENSEN S, MAILAND N, 2010]. Aus diesem Grund hinterfragen manche Autoren, ob die IRIF-Werte zu den Zeitpunkten unter einer Stunde realen DSB entsprechen oder nur Ausdruck der initiierten metabolischen Veränderung sind. Da jedoch die Werte in den Frühphasen nach Bestrahlung bei den einzelnen Mausstämmen konstant waren und für jeden Mausstamm spezifisch hoch waren, können diese dennoch als Vergleichsparameter für die DSB-Reparaturkapazität genutzt werden. Auch in dem Versuchsteil DSB-Induktion war es nicht Ziel absolute Werte zu gewinnen, sondern den nachgewiesenen Schaden und dessen Verhältnis zur Dosis zu ermitteln. Dies gelang und war nachweislich zu reproduzieren.

Die Aussagekraft der Versuchsergebnisse wurde trotz der teilweisen Beschränkung auf Tubulusepithelzellen in der Auswertung durch die hohe Anzahl der untersuchten Zellen und ihrer Verteilung im Schnittpräparat gewährleistet. Die gewonnen Daten aus dem Versuchsaufbau DSB-Dosiskorrelation bestätigen das strahlenbiologische Modell der stochastischen Wirkung ionisierender Strahlung. Es konnte ein lineares Verhältnis zwischen Dosis und verursachtem Schaden im Mausgewebe Niere nachgewiesen werden. Neben den fundierten Werten für C57/BL6-Mäuse bestätigen dies die als Stichprobe zu bezeichnenden Daten der reparaturdefizienten SCID-Mäuse.

In dem Versuchsaufbau der DSB-Reparaturkinetik gelang es bei den Mausstämmen die Unterschiede in der DSB-Entstehung durch ionisierende Bestrahlung nachzuweisen. Auch konnte der Reparaturverlauf und die Unterschiede der Mausstämmen beobachtet werden. Im verwendeten Mausmodell zeigten die bekannt strahlensensiblen SCID-Mäuse im Vergleich mit dem, mit natürlicher Strahlenresistenz ausgestatteten, Mausstamm C57BL/6 durchgehend höhere IRIF-Werte. Der deutlich langsame Reparaturverlauf war gut zu sehen. Das Ausgangsniveau wurde im Beobachtungszeitraum nicht erreicht.

Des Weiteren gelang es, den geringen Unterschied in der Strahlensensibilität zwischen den Mausstämmen C57BL/6 und BALB/c nachzuweisen. Dessen Ursache eine im Vergleich beim letztgenannten Maustyp nur eine hypomorphe Expression des nicht-homologen Endjonings ist [OKAYASU et al., 2000; MORI et al., 2001].

Die Ergebnisse für den Mausstamm ATM sind nicht zu allen Zeitpunkten repräsentativ, da in den Versuchen zu den einzelnen Zeitpunkten nicht ausreichend ATM-Mäuse untersucht werden konnten. Im Vergleich zu C57/BL6 fällt auch bei ihnen der erhöhte Primärschaden auf. Aufgrund des Rückgangs der IRIF ist, wenn auch im Vergleich verzögert, eine Reparatur anzunehmen.

In der Zusammenschau gelang es in den Versuchen der Arbeit im Dauergewebe Mausniere bei klinisch relevanten Einzeldosen repräsentativ die genetisch definierten Unterschiede in der Strahlensensibilität und der DSB-Reparatur der Mausstämmen nachzuweisen und ihren Verlauf zu beobachten. Es konnte auch deutlich gemacht werden, dass der beobachtete Schaden in einem linearen Verhältnis zu der auslösenden Dosis steht und es damit keine Schwellendosis für einen DSB in der Niere gibt.

5.3 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Mausgeweben

Die für die Mausniere gewonnenen IRIF-Werte der Stämme C57BL/6, BALB/c, SCID und ATM gleichen im Grundsatz denen, die für andere solide Gewebe und Organe durch die Arbeitsgruppe Frau Prof. Rube [RÜBE C E et al., 2008] gefunden wurden. Auch ähnelt die DSB-Reparaturkinetik der Niere in Ihrem Verlauf der von Blutlymphozyten [KÜHNE et al., 2004].

Die Organe eines Mausstammes zeigen einen ähnlich hohen primären Schaden und einen vergleichbaren Reparaturablauf. Dies stützt die These, dass alle Zellen eines Organismus eine grundlegend gleiche, genetisch determinierte Empfindlichkeit für DSB durch ionisierende Strahlung bzw. eine vergleichbare DSB-Reparaturkapazität besitzen. Eine spezifische Reparaturkapazität der einzelnen Normalgewebe scheint es nicht zu geben. Da Reparaturkapazität der soliden Gewebe vergleichbar mit denen der peripheren Blutzellen ist, könnte sich hier eine Methode der biologischen Dosimetrie ergeben.

Dass in den durchgeführten Experimenten die bekannte Schwäche des ATM-Stamms in der DSB-Reparatur beim Organ Niere nicht zu allen Zeitpunkten nachzuweisen war, ist möglicherweise auf einen Mangel in der Färbetechnik, der Auswertung oder die geringe Zahl der ausgewerteten Tiere pro Zeitpunkt zurückzuführen.

Bei dem Vergleich aller Mausgewebe fällt auf, dass am Ende des Beobachtungszeitraums bei den reparaturprofizienten Mäusen C57/BL6 nur sehr wenige DSB in Form von γ -H2AX-IRIF nachzuweisen waren. Wenn der DSB als der biologische bedeutsamste DNA-Schaden anzusehen ist, hätten dies, bei den spät Symptome zeigenden Organen wie Niere oder Herz und dem deutlichen primären Schaden, mehr sein können. Da bei der strahlenempfindlichen Niere keine im Vergleich zu anderen Organen spezifisch erhöhten DSB-Werte gefunden wurden, kann angenommen werden, dass sich die bekannte organspezifische Strahlenempfindlichkeit aus der DSB-Reparatur nachgeschalteten oder beeinflussten Prozessen ergibt. Zu diesen nach Überschreiten der Toleranzdosen die Normalgewebstoxizität auslösenden nachfolgenden Prozessen gehört wahrscheinlich die histopathologisch und immunhistologisch beschriebene chronische Entzündung in den Geweben auf zellulärer Ebene [SCHERER et al, 1991; OKUNIEFF P et al., 2005]. Die Unterschiede scheinen in den einzelnen Geweben auch durch genetische Polymorphismen und die dadurch bestimmte Reaktion auf oxidativen Stress und Entzündungen mit beeinflusst zu werden [POPANDA O et al., 2009].

5.4 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

Es gibt nur eine geringe Anzahl von Studien, die IRIF von DSB in soliden Dauergeweben mit Hilfe eines Tiermodells untersuchen. Meist werden Gewebekulturen verwendet. Dort konnte gezeigt werden, dass γ -H2AX-IRIF sich in den Versuchen vergleichbar ausbilden wie 53BP1-IRIF [MARKOVÁ et al., 2007]. In einer neueren Studie über die DSB-Reparatur in spermatogonalen Stammzellen bestätigte die Gleichwertigkeit der IRIF von γ -H2AX und 53BP1 [RÜBE C E et al., 2011]. Zwar unterscheiden sich in der letztgenannten Studie die γ -H2AX-IRIF der spermatogonalen Stammzellen von denen im Normalgewebe Niere, jedoch sind die dort angegebenen Werte für 53BP1-IRIF für Normalgewebe vergleichbar mit denen in dieser Studie bestimmten Werte für die Niere.

In einer anderen Studie zu dermalemau Mausemewebe wurden die genetisch determinierte DSB-Reparaturkapazität und der Reparaturverlauf von DSB in einem Beobachtungszeitraum von sieben Tagen untersucht. Unter anderem zeigten sich dort nach einer Bestrahlung mit 2 Gy in Gewebeprouen der Haut von den Mausstämmen SCID und BALB/c zu den Zeitpunkten 30 min und 24 h γ -H2AX-IRIF-Werte, die mit der Niere vergleichbar sind [BHOGAL et al., 2010].

Ausgangspunkt für die durchgeführten Versuche dieser Arbeit waren die in der Strahlentherapie beobachteten klassischen, interindividuell verschiedenen Empfindlichkeiten für ionisierende Strahlung [SCHERER et al., 1991; STÖVER, FEYER, 2010]. In dem definierten Rahmen aus Dosis und genetischer Disposition in der DSB-Reparatur konnte diese prospektive Arbeit im Mausmodell reproduzierbar aufzeigen, dass die H2AX-IRIF-Methode in der biologischen Dosimetrie verwendet werden kann. Dieses gilt insbesondere für die frühen Phasen nach einer Belastung mit geringen Strahlendosen. Zur Untersuchung der sich anschließenden Prozesse bei spät reagierenden Organen ist die Methode aktuell alleine nicht geeignet. Die Sensibilität der γ -H2AX-IRIF-Methode als Verfahren der biologischen Dosimetrie wurde in Studien zu unterschiedlichen diagnostischen Maßnahmen (CT und Angiographie) [LÖBRICH M et al. 2005; KUEFNER MA et al., 2009] und therapeutischen Maßnahmen (Radiojodtherapie) [LASSMANN M et al, 2010] gezeigt.

Weiter konnte in der Arbeit dargelegt werden, dass ionisierende Strahlung auch in geringer Dosis DNA-Schäden in Form von DSB verursacht. Der klassische Begriff Schwellendosis hingegen beschreibt nur, ab wann ein klinisch sichtbarer Schaden auftritt. Deshalb ist die Indikation für eine strahlenbelastende Untersuchungen oder eine Strahlentherapie eng zu stellen und je nach Patient individuell anzupassen. Die Primärprävention steht an erster Stelle, denn von einer effektiven DSB-Reparatur kann nicht immer ausgegangen werden.

6 Quellen

Abraham RT. (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15:2177–2196.

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F B, Klaus Starke. (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 10. Auflage.

Allen C, Kurimasa A, Brenneman MA, Chen DJ, Nickoloff JA. (2002) DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3758–3763.

Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Schiloh Y, Rotman G. (2001) Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J.Biol Chem* 276: 38224–38230.

Andressoo JO, Hoeijmakers JH, Mitchell JR. (2006). Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging *Cell. Cycle.* 2006 Dec; 5(24):2886-8. Epub 2006 Dec 15.

Audebert M, Salles B and Calsou P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.*, 279, 55117–55126.

Bakkenist CJ, Kastan MB. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499–506.

Bartek J, Lukas J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 (2007) 238–243.

Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Yan C, Alt F. (2002) Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8173–8178.

Bassing CH, Swat W, Alt FW. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109: S45-S55 hat

Beck-Bornhold HP, Dubben H H, Willers H. (1997). Proliferationsrate und Strahlenempfindlichkeit - Der Irrtum von Bergonié und Tribondeau - Strahlentherapie und Onkologie 173, 335-337.

Becker F, Siemer S, Kamradt J, Zwergel U, Stöckle M. (2009). Wichtige Aspekte der organerhaltenden Nierentumorchirurgie. *Dtsch Arztebl Int*; 106(8): 117–22.

Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J and Lukas J. (2006). Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* 173(2): 195-206.

Bekker-Jensen S, Mailand N. (2010) Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian DNA Repair (Amst). 2010 Dec 10;9(12):1219-28. Epub 2010 Oct 28.

Bhogal N, Kaspler P, Jalali F, Hyrien O, Chen R, Hilla R P and Bristowa R G. (2010). Late Residual c-H2AX Foci In Murine Skin are Dose Responsive and Predict Radiosensitivity In Vivo. *Radiat Res.* 2010 Jan;173(1):1-9.

Boisvert FM, Dery U, Masson JY, Richard S. (2005) Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev* 19: 671–676.

Buckley RH. The multiple causes of human SCID (2004). *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(10):1512-7.

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276, 42462–42467.

Calsou P, Frit P, Humbert O, Muller C, Chen DJ, Salles B. (1999) The DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Activity Regulates DNA End Processing by Means of Ku Entry into DNA. *J Biol Chem* 274: 7848–7856. X

Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD. (2003) The Mre11 complex is required for ATM activation and the G(2)/M checkpoint. *EMBO J* 22: 6610–6620.

Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A. (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5: 675–679.

Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Daniel Camerini-Otero R, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. (2002) Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science* 296: 922–927.

Chan DW, Chen BP, Prithivirajasingh S, Kurimasa A, Story MD, Qin J, Chen DJ. (2002) Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev* 16: 2333–2338.

Chen HT, Bhandoola A, Difilippantonio MJ, Zhu J, Brown MJ, Tai X, Rogakou EP, Brotz TM, Bonner WM, Ried T, Nussenzweig A. (2000) Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* 290: 1962–1964.

Chen MJ, Lin YT, Lieberman HB, Chen G, Lee EY. (2001) ATM-dependent Phosphorylation of Human Rad9 Is Required for Ionizing Radiation-induced Checkpoint Activation. *Biol Chem* 276: 16580–16586.

Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 2003; 193(1-2): 3-34.

Chu G, Vollrath D, Davis RW (1986). Separation of large DNA molecules by contourclamped homogeneous electric fields. *Science* 234, 1582-1585.

Chu G. (1997) Double Strand Break.Repair. *J Biol Chem* 272: 24097–24100.

Chun HH, Gatti RA. (2004) Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair* (Amst) 3: 1187–1196.

Classen M, Diehl V, Kochsiek K. (2003). *Innere Medizin*, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 5. Auflage.

Cohen EP, Lawton CA, Moulder JE (1992). Treatment of radiation nephropathy with captopril, *Radiat. Res.* 132 346 – 350.

Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA, Parker AR. (2005) The life and death of DNA-PK. *Oncogene* 24: 949-961.

Columna EA, Giaccia AJ, Evans JW, Yates BL, Morgan WF. (2006). Analysis of restriction enzyme-induced chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization. *Environmental and Molecular Mutagenesis* Vol. 22, Issue 1, pages 26–33.

Dasika GK, Lin SJ, ZhaoS, Sung P, Tomkinson A, Lee EY. (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18: 7883–7899.

D’Amours D, Jackson SP. (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 317–327.

DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G. (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J* 21: 3192–3200.

Demple B, Harrison L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and Biology. *Annu Rev Biochem* 63: 915–948.

Difilippantonio S, Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Reina San Martin B, Van Laethem F, Yang YP, Petukhova GV, Eckhaus M, Feigenbaum L, Manova K, Kruhlak M, Camerini-Otero RD, Sharan S, Nussenzweig M, Nussenzweig A. (2005) Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat Cell Biol* 7: 675–685.

Digweed M, Sperling K. (2004) Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3: 1207–1217.

Digweed M, Sperling K. (2007) DNA-Reparaturdefekte und Krebs - Lernen von Lymphomen. *MedGen* 19:191–196.

Dörr W, Herrmann T. (2006) Ionisierende Strahlung. Ursprung, Wirkung, Nutzen, Risiko, *Wiss. Zeitung TU Dresden* 55 Heft 3-4, 85-91.

Douglas P, Sapkota GP, Morrice N, Yu Y, Goodarzi AA, Merkle D, Meek K, Alessi DR, Lees-Miller SP. (2002). Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase *Biochem. J* 368: 243–251.

Durocher D, Jackson SP. (2001) DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* 13: 225–231.

El-Andaloussi N, Valovka T, Toueille M, Steinacher R, Focke F, Gehrig P, Covic M, Hassa PO, Schar P, Hubscher U, Hottiger MO. (2006) Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Mol Cell* 22: 51–62.

Falck J, Coates J, Jackson SP. (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434: 605–611.

Folkerts KH. (2010) Strahlenschutz: Physikalische und strahlenbiologische Grundlagen; Dosimetrie. *Grundkursstrahlenschutz für Ärzte.* PSD Saarbrücken.

Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3: 959–967.

Fernandes N, Sun Y, Chen S, Paul P, Shaw RJ, Cantley LC, Price BD. (2005) DNA damage-induced association of ATM with its target proteins requires a protein interaction domain in the N terminus of ATM. *J Biol Chem* 280: 15158–15164.

Frankenberg-Schwager M, Gebauer A, Koppe C, Wolf H, Pralle E, Frankenberg D. (2009). Single-strand annealing, conservative homologous recombination, nonhomologous DNA end joining, and the cell cycle-dependent repair of DNA double-strand breaks induced by sparsely or densely ionizing radiation. *Radiat Res.* 2009 Mar;171(3):265-73..

Furuta T, Takemura H, Liao Z-Y, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM, Pommier Y. (2003) Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278: 20303-20312.

Gatti RA, Boder E, Vinters HV, Sparkes RS, Norman A, Lange K. (1991) Ataxia-telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. *Medicine (Baltimore).* Mar; 70 (2): 99-117.

Girard PM, Foray N, Stumm M, Waugh A, Riballo E, Maser RS, Phillips WP, Petrini J, Arlett CF, Jeggo PA. (2000) Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome Cells Is Attributable to a Repair Defect and not Cell Cycle Checkpoint Defects1. *Cancer Res* 60: 4881–4888.

Goedecke W, Eijpe M, Offenbergh HH, van Aalderen M, Heyting C. (1999) Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* 23: 194–198.

Goodarzi AA, Yu YP, Riballo E, Douglas P, Walker SA, Ye R, Harer C, Marchetti C, Morrice N, Jeggo PA. (2006) DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO Journal* 25: 3880–3889.

Graf N, Reinhard H (2003) Wilms-Tumoren. Diagnostik und Therapie. *Onkologie* 9: 416–433.

Greten H, Rinninger F, Greten T (Hrsg.). (2010) Innere Medizin. Thieme-Verlag, Stuttgart (Gebundene Ausgabe - 6. Oktober 2010).

Hamer G, Roepers-Gajadien HL, van Duyn-Goedhart A, Gademan IS, Kal HB, van Buul PP, Ashley T, de Rooij DG. (2003) Function of DNA-protein kinase catalytic subunit during the early meiotic prophase without Ku70 and Ku86. *Biol Reprod* 68: 717-721.

Hammarsten O, DeFazio LG, Chu G. (2000) Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends. *J Biol Chem* 275: 1541-1550.

Hartsuiker E, Mizuno K, Molnar M, Kohli J, Ohta K, Carr AM. (2009). Ctp1CtIP and Rad32Mre11 nuclease activity are required for Rec12Spo11 removal, but Rec12Spo11 removal is dispensable for other MRN-dependent meiotic functions. *Mol. Cell Biol.* 29, 1671-1681.

Harrisons (2008) Innere Medizin Dietel M, Suttorp N, Zeitz M. (Hrsg.). 17. deutsche Auflage, ABW – Wissenschaftsverlag.

Hartley KO, Gell D, Smith GCM, Zhang H, Divecha N, Connelly MA et al. (1995) DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit: A relative of Phosphatidylinositol 3-Kinase and the Ataxia Telangiectasia gene product. *Cell* 82: 849-856.

Henríquez-Hernández LA, Bordón E, Pinar B, Lloret M, Rodríguez-Gallego C, Lara PC. (2012). Prediction of normal tissue toxicity as part of the individualized treatment with radiotherapy in oncology patients. *Surg Oncol.* 2011 Dec 29. [Epub ahead of print].

Heintz, N. (1991) The regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 1088: 327–339.

Herold G und Mitarbeiter, *Innere Medizin* 2011, im Selbstverlag, Auflage 2010.

Hoeijmakers JH. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature (Lond.)* 411(6835): 366-74.

Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BA, Karcher A, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CT, Carney JP, Petrini JH, Tainer JA. (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418: 562–566.

Horejsi Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J. (2004) Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene* 23: 3122–3127.

Huang H, Manton KG. (2004). Newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID): a review. *Front Biosci.* 2005 May 1;10:1024-39. Review.

Huang J, Dynan WS. (2002) Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res* 30: 667–674.

Huertas P. (2010) DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 Jan;17(1):11-6.

Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA Jr, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD. (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA doublestrand breaks. *Nature* 432: 406–411.

ICD-10-GM Version 2011. Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme. 11. Revision – German Modification. Deutscher Ärzte-Verlag.

Inamdar KV, Pouliot JJ, Zhou T, Lees-Miller SP, Rasouli-Nia A, Povirk LF. (2002) Conversion of Phosphoglycolate to Phosphate Termini on 3'Overhangs of DNA Double Strand Breaks by the Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase hTdp1. *J Biol Chem* 277: 27162–27168.

Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res.* 104(1-4):14-20.

Jackson SP, Bartek J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009 Oct 22;461(7267):1071-8.

Jeggo PA. (1998) DNA breakage and repair. *Adv Genet* 38: 185–218.

Kalman L, Lindegren ML, Kobrynski L, Vogt R, Hannon H, Howard JT, Buckley R. (2004). Mutations in genes required for T-cell development IL7R, CD45, IL2RG, JAK3, RAG1, RAG2, ARTEMIS, and ADA and severe combined immunodeficiency: HuGE review. *Genet Med.* 2004 Jan-Feb;6(1):16-26.

Karran, P. (2000) DNA double-strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 10: 144–150.

Kastan MB, Bartek J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316–323.

Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):247-54.

Kinner A, Wu W, Staudt C, and Iliakis G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36, 5678–5694.

Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB. (2004) Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM/NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* 18: 1423–1438.

Klokov D, MacPhail SM, Banath JP, Byrne JP, Olive PL. (2006) Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays. *Radiother Oncol.* 80:223-229.

Kobayashi J, Antoccia A, Tauchi H, Matsuura S, Komatsu K. (2004) NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst.)* 3: 855–861.

Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M, and Tauchi H. (2008): Current topics in DNA double-strand break repair. *J.Radiat.Res.(Tokyo)*, 49: 93-103.

Krieger H (2007): Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes. Vieweg+Teubner Verlag, 2007, ISBN 978-3-8351-0199-9. S. 323

Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M und Slupphaug G (2000). Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476: 73-77.

Kuefner MA, Grudzinski S, Schwab SA, Wiederseiner M, Heckmann M, Bautz W, Lohrich M, Uder M. (2009) DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures. *Invest Radiol.* 2009 Aug; 44(8):440-6.

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

Kuhlmann U, Walb D, Böhrer J, Luft F u.a. (Hrsg.) (2003/2008) Nephrologie - Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren, 4./5. Auflage Thieme-Verlag.

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

Lassmann M, Hänscheid H, Gassen D, Biko J, Meineke V, Reiners C, Scherthan H. (2010) In vivo formation of gamma-H2AX and 53BP1 DNA repair foci in blood cells after radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *J Nucl Med.* 2010 Aug;51(8):1318-25. Epub.

Lavin MF, Birrell G, Chen P, Kozlov S, Scott S, Gueven N. (2005) ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res* 569: 123–132.

Lee JH, Paull TT. (2004) Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/ Rad50/ Nbs1 complex. *Science* 304: 93–96.

Lee S, Cavallo L, Griffith J. (1997) Human p53 binds holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J Biol Chem* 272: 7532–7539.

Lee Y, McKinnon PJ. (2006) Responding to DNA double strand breaks in the nervous system. *Neuroscience*, DOI:10.1016/J.

Lees-Miller SP, Chen Y.R, Anderson CW. (1990) Human cells contain a DNAactivated protein kinase that phosphorylates Simian Virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. *Mol. Cell. Biol.* 10: 6472-6481.

Lees-Miller SP, Meek K. (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 85: 1161–1173.

Li B, Comai L. (2002) Displacement of DNA-PKcs from DNA ends by the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 30: 3653–3661.

Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 712–720.

Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283:1-5.

Liu Y, Masson JY, Shah R, O'Regan P, West SC. (2004) RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science* 303: 243–246.

Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J. (2006) MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 21: 187–200.

Löbrich M, Jeggo PA (2005) Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair* 4: 749–59.

Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C. (2005) In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *PNAS* 102: 8984–8984.

Löbrich M, Kiefer J. (2006) Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy. *Int J Cancer* 118: 2652-6.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution *Nature* 389: 251–260.

www.Lymphome.de, Kompetenznetz Maligne Lymphome e.V.; Sprecher und V.i.S.d.P. nach §10 Abs.3 MDStV: Prof. Dr. Michael Hallek, Köln.

Ma Y, Lu H, Tippin B, Goodman MF, Shimazaki N, Koiwai O, Hsieh CL, Schwarz K, Lieber MR. (2004) A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell* 16: 701–713

Ma Y, Pannicke U, Lu H, Niewolik D, Schwarz K, Lieber MR. (2005) The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. *J Biol Chem* 280: 33839–33846

Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. (2002) Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. *Cell* 108: 781–794.

Mahrhofer H, Burger S, Oppitz U, Flentje M, Djuzenova CS. (2006) Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64: 573-580.

Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodriguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS. (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27: 271–276.

Mahajan KN, Nick McElhinny SA, Mitchell BS, Ramsden DA. (2002) Association of DNA Polymerase μ (pol μ) with Ku and Ligase IV: Role for pol μ in end-Joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 22: 5194–5202.

Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J.* 2009 Feb 1; 417(3):639-50.

Marková E, Schulz N, Belyaev Y. (2007) Kinetics and dose-response of residual 53BP1/ γ -H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 83, No. 5, May 2007, pp. 319 – 329

Martensson S, Hammarsten O. (2002) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: structural requirements for kinase activation by DNA ends. *J Biol Chem* 277: 3020-3029.

McKinnon PJ. (2004) ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep* 5: 772–776.

Mimitou EP, Symington LS. (2011) DNA end resection-Unraveling the tail. *DNA Repair (Amst)*. 2011 Mar 7;10(3):344-8. Epub 2011 Jan 11.

Mladenov E, Iliakis G. (2011) Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res.* 2011 Feb 15.

Moreno-Herrero F, Jager M, Dekker NH, Kanaar R, Wyman C, Dekker C. (2005) Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* 437: 440–443.

Morgan WF, Corcoran J, Hartmann A, Kaplan MI, Limoli CL, Ponnaiya B. (1998) DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutat Res* 404: 125–128.

Mori N, Matsumoto Y, Okumoto M, Suzuki N, Yamate J. (2001) Variations in Prkdc encoding the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) and susceptibility to radiation-induced apoptosis and lymphomagenesis. *Oncogene* 20: 3609-19.

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

Mouse Genome Informatics. Mouse Genome Database (MGD), Gene Expression Database (GXD), Mouse Tumor Biology (MTB), Gene Ontology (GO), MouseCyc. The Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609 USA. <http://www.informatics.jax.org/>

Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S. (2006). DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*. 2006 May 10; 5(5):575-90.

Murken J., Grimm T., Holinski-Feder E. (Hrsg.) (2006). *Humangenetik (Taschenbuch)* Thieme, Stuttgart; 7. Auflage.

Nilsson, A.; Sirzén, F.; Lewensohn, R.; Wang, N.; Skog, S. (1999) Cell cycle-dependent regulation of the DNA-dependent protein kinase. *Cell Prolif.* 32: 239-248

Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA. (2000) Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 20: 2996–3003.

Nowak E, Etienne O, Millet P, Lages CS, Mathieu C, Mouthon MA, Boussin FD. (2006) Radiation-induced H2AX phosphorylation and neural precursor apoptosis in the developing brain of mice. *Radiat Res* 165: 155-64.

O’Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, Hirsch B, Gennery A, Palmer SE, Seidel J, Gatti RA, Varon R, Oettinger MA, Neitzel H, Jeggo PA, Concannon P. (2001) DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell* 8: 1175–1185.

O’Driscoll M, Jeggo PA. (2006) The role of double-strand break repair: insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7: 45–54.

Okayasu R, Suetomi K, Yu Y, Silver A, Bedford Joel S., Roger Cox, Robert L. Ullrich. (2000) A Deficiency in DNA Repair and DNA-PKcs Expression in the Radiosensitive BALB/c Mouse. *Cancer research* 60: 4342-4345.

Olive PL. (1998) The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res* 150: S42–51.

Olive PL. (2004) Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol* 75: 355-373.

Olive PL, Banath JP. (2004) Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 331-5.

Orii KE, Lee Y, Kondo N, McKinnon PJ. (2006) Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 10017–10022.

Okunieff P, Cornelison T, Mester M, Liu W, Ding I, Chen Y, Zhang H, Williams JP, Finkelstein J. (2005) Mechanism and modification of gastrointestinal soft tissue response to radiation: role of growth factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 May 1;62(1):273-8.

Paques F and Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 349–404.

Park EJ, Chan DW, Park JH, Oettinger MA, Kwon J. (2003) DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Res* 31: 6819-6827.

Paul TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M and Bonner WM (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10, 886–895.

Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, Venkitaraman AR. (2002) Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51 -BRCA2 complex. *Nature* 420: 287–293.

Perkins EJ, Nair A, Cowley DO, Van Dyke T, Chang Y, Ramsden DA. (2002) Sensing of intermediates in V(D)J recombination by ATM. *Genes Dev* 16: 159–164.

Perrault R, Wang H, Wang M, Rosidi B and Iliakis G (2004) Backup pathways of NHEJ are suppressed by DNA-PK. *J. Cell. Biochem.*, 92, 781–794.

Petersen S, Casellas R, Reina-San-Martin B, Chen HT, Difilippantonio MJ, Wilson PC, Hanitsch L, Celeste A, Muramatsu M, Pilch DR, Redon C, Ried T, et al (2001) AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* 414: 660–665.

Petrini JH, Stracker TH. (2003) The cellular response to DNA doublestrand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* 13: 458–462.

Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*. 2000; 15(4): 289-302.

Pierce AJ, Jasin M. (2001) NHEJ deficiency and disease. *Mol Cell* 8: 1160–1161.

Pluth JM, Fried LM, Kirchgessner CU. (2001) Severe combined immunodeficient cells expressing mutant hRAD54 exhibit a marked DNA double-strand break repair and error-prone chromosome repair defect. *Cancer Res* 61: 2649–2655.

Pötter R, Dieckmann K, (2006) Kapitel 51 - Strahlentherapie in Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J (Hrsg.) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. 2006, XXV.

Poinsignon C, de Chasseval R, Soubeyrand S, Moshous D, Fischer A, Hache RJ, de Villartay JP. (2004) Phosphorylation of Artemis following irradiation-induced DNA damage. *Eur J Immunol* 34: 3146–3155.

Popanda O, Marquardt JU, Chang-Claude J, Schmezer P. (2009). Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation. *Mutat Res*. 2009 Jul 10;667(1-2):58-69. Epub 2008 Nov 5.

Pruss D, Hayes JJ, Wolffe AP. (1995) Nucleosomal anatomy--where are the histones? *BioEssays* 17: 161–170

Quarmby S, Kumar P, Kumar S. (1999) Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. *Int J Cancer*. 1999 Jul 30; 82 (3):385-95.

Qvarnström OF, Simonsson M, Johansson KA, Nyman J, Turesson I. (2004) DNA doublestrand break quantification in skin biopsies. *Radiother Oncol* 72: 311-7.

Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. (2002) *Curr Opin Genet Dev* 12: 162–169.

Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA. (2009) gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res.* 2009;43(8):1171-1178.

Reinartz G, Koch P, Berdel WE, Normann Willich N (2006). Strahlentherapie primärer gastrointestinaler Non-Hodgkin-Lymphome. *Dtsch Arztebl* 2006; 103(44):A 2940–6.

Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith G, Recio J-M, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson S, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M. (2004) A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis and Proteins Locating to gamma-H2AX Foci *Mol Cell* 16: 715-724.

Richardson C, Jasin M. (2000) Coupled Homologous and Nonhomologous Repair of a Double-Strand Break Preserves Genomic Integrity in Mammalian Cells *Mol Cell Biol* 20: 9068–9075.

Riede UN, Schäfer HE, Werner M (Hrsg). (1994), *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 5. Auflage, Thieme Verlag.

Roberts JL, Lauritsen JP, Cooney M, Parrott RE, Sajaroff EO, Win CM, Keller MD, Carpenter JH, Carabana J, Krangel MS, Sarzotti M, Zhong XP, Wiest DL, Buckley RH. (2007). T-B+NK+ severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood.* 2007 Apr 15;109(8):3198-206. Epub 2006 Dec 14.

Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-916.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858-5868.

Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID. (1999) The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest* 17: 56-72.

Rosidi B, Wang M, Wu W, Sharma A, Wang H and Iliakis G (2008) Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.*, 36, 1610–1623.

Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23: 5706–5715.

Rothkamm K, Löbrich M. (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5057–5062.

Rotman G, Shiloh Y. (1998) ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet.* 1998; 7 (10):1555-63.

Rouse J, Jackson SP. (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297: 547–551.

Rübe CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rübe C. (2008) 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 Oct 15; 14 (20): 654.

Rübe CE, Zhang S, Miebach N, Fricke A, Rübe C. (2011) Protecting the heritable genome: DNA damage response mechanisms in spermatogonial stem cells. *DNA Repair (Amst).* 2011 Feb 7; 10(2):159-68. Epub 2010 Nov 30.

Saintigny Y, Delacote F, Vares G, Petitot F, Lambert S, Averbek D, Lopez BS. (2001) Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J* 20: 3861–3870.

Sandoval N, Platzer M, Rosenthal A, Dörk T, Bendix R, Skawarn b, Stuhmann M, Wegner R-D, Sperling K, Banin S, Shiloh Y, Baumer A, Bernthaler U, Sennefelder H, Brohm M, Weber BHF, Schindler D. (1999) Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia-telangiectasia families. *Hum Mol Genet.* 8(1):69-79.

Scherer E, Streffer C, Trott KR (Hrsg) (1991) *Radiopathology on Organs and Tissues.* Springer-Verlag, Berlin.

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

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

Shiloh Y. (1998) Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet.* 31:635-62.

Shiloh Y. (2001) ATM and ATR: Networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin GENET Dev* 11: 71-77.

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

Shrivastav M, De Haro LP and Nickoloff JA. (2008) Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 18, 134–147.

Sitzmann F C (Hrsg), Neuropädiatrie: Neuhäuser G, Immunologie: Zielen S, Bauer C-P. (2007), *Duale Reihe – Pädiatrie*, Thieme, Stuttgart; 3. Auflage.

Smith GCM, Jackson SP. (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13: 916–934.

Smith GC, Cary RB, Lakin ND, Hann BC, Teo SH, Chen DJ, Jackson SP. (1999) Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proc. Natl Acad Sci USA* 96: 11134–11139.

Smith J, Riballo E, Kysela B, Baldeyron C, Manolis K, Masson C, Lieber MR, Papadopoulo D, Jeggo PA. (2003) Impact of DNA ligase IV on the fidelity of end joining in human cells. *Nucleic Acids Research* 31: 2157-2167.

Stiff T, O’Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX following exposure to ionising radiation. *Cancer Res* 64: 2390–2396.

Stöver I, Feyer P. (2010) *Praxismanual Strahlentherapie*, Springer Berlin Heidelberg; 1. Auflage.

Stracker TH, Theunissen JW, Morales M, Petrini JH. (2004) The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst.)* 3: 845–854.

Stucki M, Jackson SP. (2004) MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair (Amst)* 3: 953–957.

Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123: 1213–1226.

Suh D, Wilson III DM, Povirk LF. (1997) 3’-Phosphodiesterase activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends *Nucleic Acids Res* 25:2495–2500.

Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL. (1991) Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med.* 1991 Dec 26; 325(26):1831-6.

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

Taneja N, Davis M, Choy JS, Beckett MA, Singh R, Kron SJ, Weichselbaum RR. (2004) Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J Biol Chem* 279:2273-80.

Taylor AM, Groom A, Byrd PJ. (2004) Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD): its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)* 3: 1219–1225.

Thacker J, Zdzienicka MZ. (2004) The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 3: 1081–1090.

Thatcher TH, Gorovsky MA. (1994) Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res* 22: 174–179.

Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22: 5612–5621.

Van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. (2003) The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep* 4: 844–849.

Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2: 196–206.

Wang H, Rosidi B, Perrault R, Wang M, Zhang L, Windhofer F and Iliakis G (2005) DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res.*, 65, 4020–4030.

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

Warters RL, Adamson PJ, Pond CD, Leachman SA. (2005) Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone H2AX foci. *J Invest Dermatol* 124: 807-817.

Waterston RH, Lindblad-Toh K et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002 Dec 5;420 (6915):520-62.

West MHP, Bonner WM. (1980) Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* 19: 3238–3245.

West SC. (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 435–445.

Williams RS, Tainer JA. (2005) A nanomachine for making ends meet:MRN is a flexing scaffold for the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 19: 724–726.

Wiltzius JJ, Hohl M, Fleming JC, Petrini JH. (2005) The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* 12: 403–407.

Windhofer F, Wu W, Wang M, Singh SK, Saha J, Rosidi B and Iliakis G. (2007) Marked dependence on growth state of backup pathways of NHEJ. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 68, 1462–1470.

Wyman C, Ristic D, Kanaar R. (2004) Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 3: 827–833.

Yannone SM, Roy S, Chan DW, Murphy MB, Huang S, Campisi J, Chen DJ. (2001) Werner Syndrome Protein Is Regulated and Phosphorylated by DNA-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 276: 38242–38248.

Yeo TC, Xia D, Hassouneh S, Yang XO, Sabath DE, Sperling K, Gatti RA, Concannon P, Willerford DM. (2000) V(D)J rearrangement in Nijmegen breakage syndrome. *Mol Immunol* 37: 1131–1139.

Yin B, Savic V, Juntilla MM, Bredemeyer AL, Yang-Iott KS, Helmink BA, Koretzky GA, Sleckman BP, Bassing CH (2009). Histone H2AX stabilizes broken DNA strands to suppress chromosome breaks and translocations during V(D)J recombination *J Exp Med.* 2009 Nov 23;206(12):2.

You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P. (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* 25: 5363–5379.

Yu T, MacPhail SH, Banath JP, Klovov D, Olive PL. (2006) Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair (Amst)* 5: 935-946.

Zafar F, Seidler SB, Kronenberg A, Schild D and Wiese C. (2010). Homologous Recombination Contributes to the Repair of DNA Double-Strand Breaks Induced by High-Energy Iron Ions. *RADIATION RESEARCH* 173, 27–39.

Zawaski JA, Gaber MW, Sabek OM, Wilson CM, Duntsch CD, Merchant TE. (2011) Effects of Irradiation on Brain Vasculature Using an In Situ Tumor Model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011 Dec 22.

Zhang X, Succi J, Feng Z, Prithivirajasingh S, Story MD, Legerski RJ. (2004) Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G2/M DNA damage checkpoint response. *Mol Cell Biol* 24: 9207–9220

Zhong Q, Boyer TG, Chen PL, Lee WH. (2002) Deficient Nonhomologous End-Joining Activity in Cell-free Extracts from Brca1-null Fibroblasts. *Cancer Res* 62: 3966–3970.

7 Danksagungen

Mein Dank gilt dem Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Homburg (Saar) Herrn Univ. Prof. Dr. Christian Rube und der Leiterin des Labors für molekulare Radioonkologie des Universitätsklinikums Homburg (Saar) Frau Prof. Dr. Claudia E. Rube für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der materiellen Voraussetzungen und für die Hilfestellung bei der Auswertung und Darstellung der Daten. Bedanken möchte ich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Rube, insbesondere bei Herrn Dr. Martin Kühne und Frau Daniela Ludwig für die persönliche Unterstützung. Des Weiteren bei den Kollegen Egil Hafstad Gleditsch und Efstathios Papadopolus.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Michael Ehrhardt, Herrn Felix Kellenter B.A. und meinen Eltern Herrn Dipl.-Betriebswirt Hans Jürgen Seifert und Frau Dipl.-Betriebswirtin Hannelore Mäueler.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

- Christoph Edzard Seifert,
- Geburtsdatum: 29. Juli 1978,
- Geburtsort: Köln.

Ausbildung:

- Seit April 2010 Arzt in Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin,
- 2009 Approbation als Arzt,
- 2002 bis 2009 Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes,
- 2002 Grundwehrdienst, Personalamt der Bundeswehr,
- 1999 Allgemeine Hochschulreife, Georg-Büchner-Gymnasium, Köln.