

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes  
Homburg/Saar

---

**Elektronenmikroskopischer Nachweis von DNA-Reparaturfaktoren  
des Nicht-Homologen End-Joining im Kontext des Chromatins**

---

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Theoretischen Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2012

Vorgelegt von Yvonne Lorat  
Geboren am 30. 12. 1974 in Schwetzingen

**Elektronenmikroskopischer Nachweis von DNA-Reparaturfaktoren  
des Nicht-Homologen End-Joining im Kontext des Chromatins**

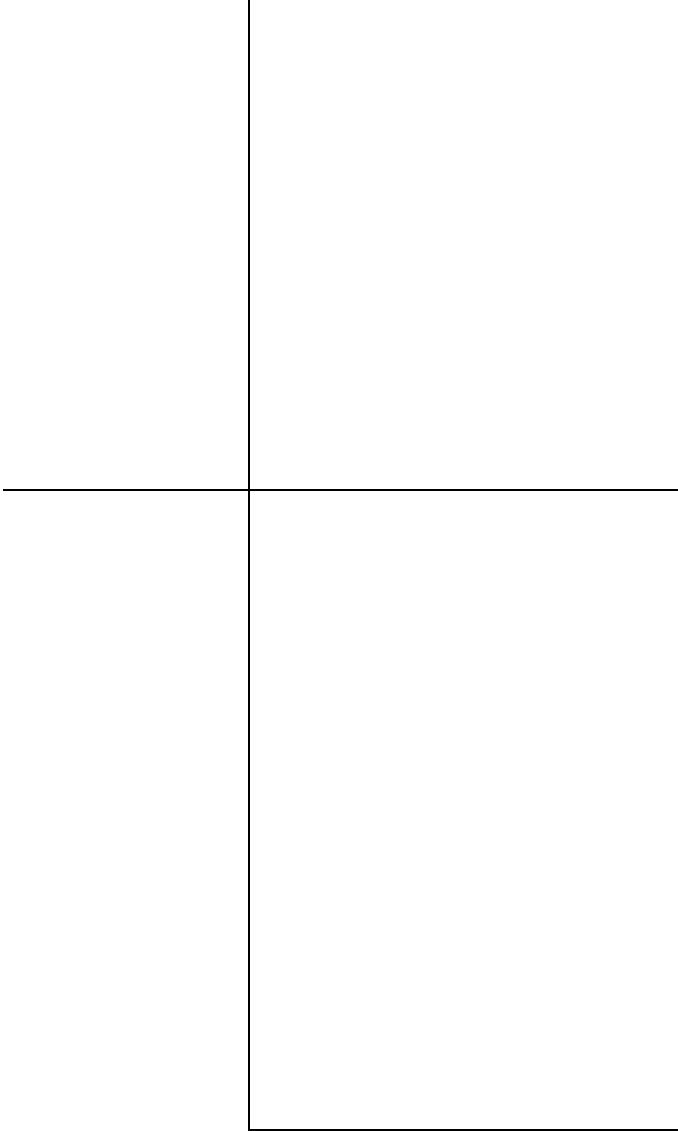
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Labor für Molekulare Radioonkologie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Theoretischen Medizin

Vorgelegt von: **Yvonne Lorat**

Betreuerin: **Prof. Dr. med. Claudia E. Rube**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Claudia E. Rube für die Überlassung des spannenden Themas, für die Freiräume bei der Durchführung dieser Arbeit, für die stetige Diskussionsbereitschaft sowie die Unterstützung und Förderung.



Was keiner wagt, das sollt ihr wagen  
Was keiner sagt, das sagt heraus  
Was keiner denkt, sollt ihr befragen  
Was keiner anfängt, das führt aus

---

[Walter Flex, 1887-1917]

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung/Summary</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1. Ionisierende Strahlung und deren physikalische Eigenschaften	3
2.1.1. Linearer Energietransfer . . . . .	4
2.1.2. Dosis und relative biologische Wirksamkeit . . . . .	4
2.1.3. Direkte und indirekte Strahleneffekte im biologischen System . . . . .	5
2.2. Mechanismen der DNA-Reparatur	7
2.2.1. Organisation von DNA und Chromatin innerhalb des Zellkerns. . . . .	7
2.2.2. Strahleninduzierte Schäden an der DNA . . . . .	8
2.2.3. Zelluläre Schadensantwort auf DNA-Läsionen . . . . .	9
2.2.3.1. Signaltransduktionskaskade . . . . .	9
2.2.3.2. Reparatur von DNA-Schäden . . . . .	11
2.3. Methoden zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen	14
2.3.1. Pulsfeldgelelektrophorese . . . . .	14
2.3.2. Immunfluoreszenzmikroskopie . . . . .	15
2.3.3. Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	16
2.3.3.1. Aufbau und Signalerzeugung . . . . .	16
2.3.3.2. Bildgebung und Kontrastentstehung . . . . .	18
2.3.3.3. Immunogold . . . . .	19
<b>3. Fragestellungen</b>	<b>20</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
4.1. Material und Geräte	21
4.1.1. Chemikalien und Reagenzien . . . . .	21
4.1.2. Lösungen und Puffer . . . . .	21
4.1.3. Antikörper . . . . .	22
4.1.4. Verbrauchsmaterialien . . . . .	22
4.1.5. Geräte . . . . .	22
4.2. Methoden	24
4.2.1. Übersicht der durchgeführten Experimente . . . . .	24
4.2.2. Bestrahlung von Mäusen . . . . .	25
4.2.3. Entnahme der Gewebe . . . . .	27
4.2.4. Immunfluoreszenzmikroskopie . . . . .	27
4.2.4.1. Fixation von Geweben . . . . .	27
4.2.4.2. Paraffineinbettung und Sektionierung . . . . .	29
4.2.4.3. Entfernung des Paraffins und Rehydrierung der Gewebeschnitte . . . . .	29
4.2.4.4. Markierung von Reparaturfaktoren mittels IFM. . . . .	29
4.2.4.5. Lichtmikroskopischer Nachweis unterschiedlicher Reparaturfaktoren . . . . .	30
4.2.5. Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	30
4.2.5.1. Chemische Fixation von Geweben . . . . .	31
4.2.5.2. Einbettung in LR-Gold-Acrylharz . . . . .	32

4.2.5.3. Beschichtung von Nickelgrids mit Formvar oder Pioloform . . .	33
4.2.5.4. Sektionierung der Präparate mittels Ultramikrotom . . . . .	34
4.2.5.5. Markierung von Reparaturfaktoren mittels Immunogold . . . . .	35
4.2.5.6. Kontrastierung der Präparate . . . . .	36
4.2.5.7. TEM-Analyse Immunogold-markierter Reparaturfaktoren . . .	37
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>38</b>
5.1. Foci-Analyse zur Untersuchung von 53BP1 mittels Immunfluoreszenz- mikroskopie . . . . .	38
4.1.1. Überprüfung auf Kollokalisierung von 53BP1 mit $\gamma$ H2AX oder MDC1 . . .	39
4.1.2. Untersuchung zur dosisabhängigen Induktion von DSBs durch nume- rische Erfassung der 53BP1-Foci . . . . .	40
4.1.3. Bestimmung der DSB-Reparaturkinetik anhand der 53BP1-Foci- Abnahme . . . . .	41
5.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von DSB-Reparaturfaktoren	42
5.2.1. Untersuchung von Reparaturproteinen, die im Umfeld strahleninduzier- ter DSBs akkumulieren . . . . .	42
5.2.1.1. Nachweis von 53BP1 im Kontext der Chromatinstruktur . . . . .	42
5.2.1.2. Bestimmung der 53BP1-Induktion durch quantitative Erfassung von Clustern und Einzelbeads . . . . .	43
5.2.1.3. Bestimmung der 53BP1-Reparaturkinetik anhand der Abnah- me von Clustern und Einzelbeads über die Zeit . . . . .	45
5.2.1.4. Kollokalisierung von p53BP1 mit $\gamma$ H2AX oder MDC1 . . . . .	47
5.2.1.5. Untersuchung von Chromatinmodifikationen und deren Kolo- kalisierung mit p53BP1 . . . . .	48
5.2.2. Untersuchung von Reparaturproteinen, die im Umfeld strahleninduzier- ter DSBs keine lichtmikroskopisch sichtbaren Foci bilden . . . . .	49
5.2.2.1. Nachweis von pKu70 als zentrales Protein des NHEJ . . . . .	49
5.2.2.2. Erfassung der pKu70-Reparaturkinetik in eu- und heterochro- matischen Regionen . . . . .	50
5.2.2.3. Analyse der zeitabhängigen Beadverteilung in pKu70-Clustern unter Berücksichtigung der Chromatinstruktur . . . . .	53
5.2.2.4. Kollokalisierung von pKu70 und p53BP1 im Kontext des Chromatin . . . . .	56
5.2.2.5. Heterochromatische Akkumulation von 53BP1-Großclustern	59
<b>6. Diskussion</b>	<b>61</b>
6.1. Methodenabhängige Visualisierungsunterschiede und deren Einfluss auf den Nachweis von Foci-bildenden Reparaturfaktoren . . . . .	61
6.2. H3K9me3 als Marker für heterochromatische Domänen . . . . .	63
6.3. Chromatinstrukturabhängige Kinetiken . . . . .	63
6.4. pKu70 als DSB-Marker . . . . .	65
6.5. pKu70-Cluster mit $\geq 6$ Beads . . . . .	66
6.6. 53BP1-Großcluster als Hinweis auf einen veränderten Chromatinstatus . . . .	66
<b>7. Ausblick</b>	<b>67</b>
<b>8. Verzeichnisse</b>	<b>68</b>
8.1. Literatur . . . . .	68

8.2. Abbildungen .....	77
8.3. Tabellen .....	79
8.4. Abkürzungen .....	80
<b>9. Veröffentlichungen</b>	<b>82</b>
<b>10. Anhang</b>	<b>83</b>
<b>11. Danksagung</b>	<b>85</b>

## 1. Zusammenfassung

Das Erkennen und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) erfolgt im Kontext der übergeordneten Chromatinstruktur. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine elektronenmikroskopische Nachweismethode etabliert, um goldmarkierte DSB-Reparaturproteine in unterschiedlichen Chromatindomänen der intakten Zellkernarchitektur bestrahlter Mausegewebe nachzuweisen. Die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) eröffnet die Möglichkeit, Kernkomponenten der DNA-Reparaturmechanismen in subzellulärer Auflösung zu detektieren und deren molekulare Interaktionen mit spezifischen Histonmodifikationen zu visualisieren. Durch die Markierung von phosphoryliertem Ku70, welches direkt an die DNA-Bruchenden und in Vorbereitung auf die Religation bindet, ermöglicht diese TEM-Methode, die Formation und Reparatur der DSBs vergleichend in euchromatischen und heterochromatischen Bereichen zu untersuchen. Während DNA-Schäden im Euchromatin ohne jegliche Verzögerung detektiert und repariert werden, scheint der Verpackungsgrad des Heterochromatins das Prozessieren der DSBs zu verzögern, woraus eine langsamere Reparaturkinetik resultiert. Darüber hinaus erfolgt die Akkumulation von  $\gamma$ H2AX, MDC1 und 53BP1 ausschließlich an DSBs im Heterochromatin (charakterisiert durch die Histonmodifikation H3K9me3), jedoch nicht in euchromatischen Domänen, vermutlich aufgrund einer Beteiligung an der lokalen Chromatinkondensation, welche die Zugänglichkeit der heterochromatischer DNA erhöht.

Diese TEM-Methode ermöglicht neue Einblicke in die Dynamik der DNA-Reparaturprozesse, welche entscheidend auf der Chromatinstruktur im Umfeld des Bruches beruhen.



## Summary

The recognition and repair of DNA double-strand breaks (DSBs) occurs in the context of highly structured chromatin. In this thesis a transmission electron microscopy (TEM) approach was established to localize gold-labeled DSB repair components in different chromatin environments within the intact nuclear architecture of cells in irradiated mouse tissues. The ultra-high resolution of TEM offers the intriguing possibility of detecting core components of the DNA repair machinery at the single-molecule level and visualizing their molecular interactions with specific histone modifications. By labeling phosphorylated Ku70, which binds directly to broken DNA ends in preparation for rejoining, this TEM approach can monitor formation and repair of DSBs in euchromatic versus heterochromatic regions. While DNA lesions in euchromatin are detected and rejoined without any delay, DNA packaging in heterochromatin appears to retard DSB-processing, leading to slower repair kinetics. Of significance, the assembly of  $\gamma$ H2AX, MDC1 and 53BP1 occurs exclusively at DSBs in heterochromatic (characterized by H3K9me3), but not euchromatic domains, suggesting involvement in localized chromatin decondensation (which increases heterochromatic DNA accessibility).

Collectively, this TEM approach provides fascinating insights into the dynamic events of the DSB repair process that depend decisively upon the chromatin structure around the break.

## 2. Einleitung

Die wichtigste Funktion der Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA) einer Zelle ist die fehlerfreie Erhaltung und Weitergabe der genetischen Informationen. Hierzu muss der etwa 2 m lange DNA-Faden einer menschlichen Zelle effizient und zugleich reversibel verpackt werden. Dies geschieht mit Hilfe von spezialisierten Proteinen (Histonen), um die die DNA gewunden wird (Nukleosomen). Hierdurch entstehen weitere, aufeinander folgende Windungen und Schleifen, woraus letztendlich übergeordnete Chromatinstrukturen resultieren. Dennoch bleibt die DNA, beispielsweise durch spezifische Histonmodifikationen, für Proteine zugänglich, wodurch Replikation, Transkription und auch die Reparatur von Läsionen ermöglicht werden.

Das Überleben der Zelle ist von der Integrität ihrer DNA abhängig. Diese unterliegt permanent Einwirkungen durch eine Vielzahl von intrazellulären Stoffwechselprozessen und exogenen Noxen, die alle molekulare Schäden induzieren können. Beispielsweise entstehen im Rahmen einer Tumorthherapie durch die Exposition mit ionisierenden Strahlen sowohl direkte (durch Ionisationsereignisse) als auch indirekte (durch freie Radikale) DNA-Läsionen. Diese können bei erfolgreicher Behandlung den Tumor zerstören, erfordern aber im gesunden Gewebe zum Überleben der Zellen eine möglichst fehlerfreie Reparatur. Werden die DNA-Schäden nicht oder falsch repariert, kann dies genetische oder genomische Instabilität, Veränderungen in der zellulären Funktion oder den Zelltod zur Folge haben.

### 2.1. Ionisierende Strahlung und deren physikalische Eigenschaften

Unter Strahlung wird ein Energietransfer ohne vermittelndes Medium verstanden. Ist hierbei die transportierte Energie ausreichend um aus elektrisch neutralen Atomen und Molekülen positiv und negativ geladene Teilchen zu erzeugen (Ionisation), wird von ionisierender Strahlung (*ionic radiation*, IR) gesprochen. Eine Klassifizierung der IR erfolgt aufgrund ihrer Bestandteile, Quelle und Wirkung.

Elektromagnetische Strahlung, bestehend aus Photonen, transportiert ausschließlich Energie und wird abhängig von der Wellenlänge und der Erzeugungsart in Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung unterteilt. Im Gegensatz dazu transportiert Teilchenstrahlung aus Masse und Ladung neben Energie zusätzlich Materie. Ihre Einteilung erfolgt anhand der Teilchen, aus denen sie besteht, beispielsweise  $\alpha$ -Strahlung (aus  $\alpha$ -Teilchen),  $\beta$ -Strahlung (aus Elektronen oder Positronen), Ionen- und Neutronenstrahlung.

Wenn energiereiche Strahlung Materie durchdringt, wird kinetische Energie (bei Teilchen) oder Quantenenergie (bei Wellen) auf Elektronen übertragen. Hierdurch können sich diese aus den Atomhüllen lösen, chemische Bindungen zerstören und umfangreiche Schadensereignisse in der bestrahlten Materie induzieren. Die Zusammenhänge zwischen den physikalischen Eigenschaften ionisierender Strahlung und deren Auswirkungen auf biologische

Systeme sind sehr vielfältig. Aus diesem Grund sind Kenntnisse über die Wirkungsmechanismen eine wichtige Voraussetzung, um diese Auswirkungen auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene zu verstehen.

### 2.1.1. Linearer Energietransfer

Die Dosisleistung (Dosis pro Zeit) ionisierender Strahlung wird innerhalb der Materie um den Betrag reduziert, der infolge von Wechselwirkungen absorbiert wird. In Abhängigkeit der räumlichen Entfernung und Verteilung dieser Ionisationsereignisse wird zwischen locker und dicht ionisierender Strahlung unterschieden. Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlen (Photonen) induzieren entlang ihrer Wegstrecke gleichmäßig verteilte Ionisationsereignisse, die weit voneinander entfernt sind, und werden deshalb der locker ionisierenden Strahlung zugeordnet.

Elektronen, Protonen,  $\alpha$ -Teilchen, schnelle Neutronen und Schwerionen (Kernteilchen), die entlang ihrer Bahnsuren viele Ionisationen innerhalb eines geringen Abstands erzeugen, werden zur Gruppe der dicht ionisierenden Strahlung zusammengefasst.

Der Lineare Energietransfer (LET) beschreibt, wie viel Energie pro Wegstrecke entlang der Bahn eines Teilchens abgegeben wird; er ist abhängig von der Ordnungszahl der durchstrahlten Materie:

$$LET = \frac{dE}{ds} = \frac{\text{lokal absorbierte Energie} \left[ \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right]}{\text{durchlaufene Wegstrecke} \left[ \mu\text{m} \right]}$$

Als ein indirektes Maß für die Zahl der Ionisationen pro Strecke verändert sich der LET, bedingt durch seine Abhängigkeit von der Energie und Geschwindigkeit der Teilchen, mit deren Eindringtiefe. Ein langsames Teilchen mit hoher Ladung besitzt daher einen wesentlich höheren LET als ein schnelles Teilchen mit geringer Ladung. Hierbei geben Hoch-LET-Ionen beim Durchqueren des Gewebes ihre Energie schnell ab, während Niedrig-LET-Ionen bis zum nächsten Ionisationsereignis tiefer in die Materie bzw. das Gewebe eindringen.

Unberücksichtigt durch den LET bleibt jedoch der nicht lokal wirkende Energieverlust eines Teilchens, beispielsweise die räumliche Verteilung der durch Sekundärelektronen deponierten Energiedispositionen entlang der Teilchenspur oder die im Umfeld energiereicher Elektronen induzierten Ionenspuren ( $\delta$ -Strahlen). Die hierbei übertragenen Energien und deren Verteilung tragen einen großen Anteil zur lokalen Wirkung bei.

### 2.1.2. Dosis und relative biologische Wirksamkeit

Zur Beurteilung der Strahlenwirkung auf biologisches Material ist somit nicht allein die Zahl der Ionisationsereignisse entlang einer Wegstrecke innerhalb eines Mikrovolumens, sondern auch die globale Energiedeposition (Dosis) von Bedeutung. Diese Kombination stellt letztendlich ein Maß für die zu erwartende biologische Wirkung dar. Die Dosis ist als absorbierte Energie pro Masse definiert und wird in der Einheit Gray [Gy] angegeben (Rossi H, 1998):

$$D [Gy] = \frac{E}{m} \left[ \frac{J}{kg} \right]$$

Eine Anwendung dieser Formel erfolgt bei Bestrahlung mit Photonen und homogener Energieverteilung. Für eine Teilchenbestrahlung ergibt sich die mittlere Dosis hingegen aus dem LET, der Flächenbelegung (Fluenz  $F = \text{Teilchen pro } \mu\text{m}^2$ ) und der Dichte  $\rho$  des Zielvolumens:

$$D [Gy] = 1,602 \cdot 10^{-9} \cdot LET \left[ \frac{keV}{\mu m} \right] \cdot F \left[ \frac{1}{\mu m^2} \right] \cdot \frac{1}{\rho} \left[ \frac{\mu m^3}{g} \right]$$

Die Dosisabhängigkeit (Äquivalenzdosis) wird von der verwendeten Strahlenart und dem damit verbundenen biologischen Effekt, der durch die unterschiedliche Beschaffenheit des Gewebes, der zeitlichen Dosisleistung, der örtlichen Dosisverteilung und der Ionisationsdichte der Strahlung beeinflusst wird, mitbestimmt. Zum Vergleich verschiedener Strahlenarten, die in biologischen Systemen bei gleicher Dosis unterschiedliche Effekte verursachen können, dient die relative biologische Wirksamkeit (RBW). Diese beschreibt das Verhältnis einer Bezugsstrahlendosis  $D_{Ref}$ , meistens 250 kV Röntgenstrahlung, zu der Dosis einer vergleichenden Strahlung  $D_{Test}$ , die zur Auslösung eines adäquaten Effektes führt:

$$RBW = \frac{D_{Ref}}{D_{Test}}$$

So besitzt beispielsweise die Dosis von 1 Gy  $\alpha$ -Teilchen durch den höheren LET eine etwa zwanzigfach höhere biologische Wirksamkeit als 1 Gy Röntgenstrahlung (Kiefer J, 2003; Hall EJ, 2006).

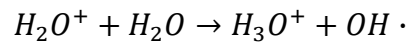
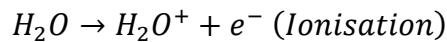
### 2.1.3. Direkte und indirekte Strahleneffekte im biologischen System

Neben Schäden an Proteinen und RNA, die von Zellen durch Translation und Transkription kompensiert werden, wurde die DNA bereits früh als Substrat erkannt (Munro TR, 1970), das durch ionisierende Strahlung direkt und indirekt beeinflusst werden kann.

Die direkte Wirkung wird von hochenergetischen Teilchen hervorgerufen. Hierbei wird Energie an die Hüllenelektronen der DNA-Moleküle übertragen, wodurch Sekundärelektronen freigesetzt werden können, aus deren Wirkung letztendlich direkte chemische Veränderungen an der DNA, beispielsweise Einzel- und Doppelstrangbrüche durch das Aufbrechen kovalenter Bindungen im Rückgrat der DNA, resultieren (Abbildung 1).

Indirekte Wirkungen werden überwiegend durch locker ionisierende Photonenstrahlungen mit niedrigem LET verursacht. Aufgrund fehlender elektrischer Ladung entstehen keine Wechselwirkungen mit den elektromagnetischen Feldern der DNA-Molekül-Hüllenelektronen. Stattdessen wird die Energie der Photonen durch Kollisionen auf Elektronen benachbarter Wassermoleküle übertragen. Diese können dann freigesetzt werden und durch die resultierende Ionisation von Wasser (Radiolyse) entstehen freie Radikale. So kann durch Abstraktion eines Elektrons ein ionisches, instabiles und hochreaktives  $\text{H}_2\text{O}^+$ -Radikal erzeugt

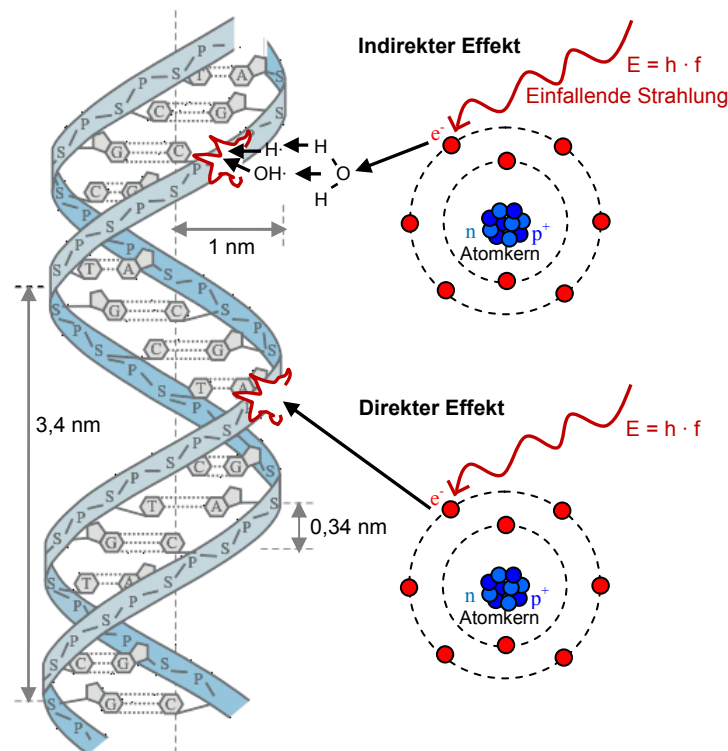
werden, das mit einem weiteren Wassermolekül zu einem Hydroniumion und einem Hydroxylradikal reagiert:



Durch ionisierende Strahlung kann auch eine Homolyse von Wassermolekülen erfolgen, wodurch ebenfalls Hydroxylradikale freigesetzt werden:



Die Hydroxylradikale besitzen durch ihre hohe Reaktivität eine nur geringe Reichweite und diffundieren maximal über eine Länge von zwei Moleküldurchmessern (Marnett LJ, 2000). Durch Ionisation in der DNA-Hydrathülle entstandene OH•-Radikale erreichen jedoch die wenige Nanometer entfernte DNA und induzieren hierdurch einen Großteil der biologisch bedeutsamen Schäden (Goodhead DT, 1994) (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1: Die indirekte und direkte Wirkung ionisierender Strahlung auf DNA.**

Bei ionisierender Strahlung mit hohem LET überwiegt der direkte, bei locker ionisierender Strahlung der indirekte Effekt. Direkte Strahlenwirkung ionisiert durch ein Sekundärelektron direkt Moleküle der DNA während bei der indirekten Wirkung ein durch Teilchenabsorption freigesetztes Sekundärelektron mit einem Wassermolekül reagiert (Radiolyse von Wasser). Das hierbei freigesetzte Hydroxylradikal (OH•) verursacht den DNA-Schaden S = Ribose, P = Phosphat, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, E = Energie, f = Frequenz, h = Plancksches Wirkungsquantum (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Hall EJ, 2006, Seite 11).

Hydroxylradikale verursachen bevorzugt Schäden an der C5=C6 - Doppelbindung von Pyrimidinen (Cadet J, 1998). Die hierdurch entstehenden Pyrimidinradikale reagieren mit Sauerstoff, was zur Entstehung von gesättigten Ringstrukturen (Thyminglykol) führen kann (Ward, 1988; Cadet J, 1998).

Reagieren die Hydroxylradikale hingegen mit der Purinbase Guanin, führt dies zur Entstehung von 8-Oxoguanin und seiner isomeren Form 8-Hydroxyguanin (Cadet J, 1999), wodurch eine Bindung mit Adenin und die Entstehung von Transversionsmutationen ermöglicht wird (Cheng KC, 1992). Zyklieren deren Purin-Reste (Cyclodeoxyguanosin oder -adenin), so führt dies zu einer räumlichen Verzerrung der DNA-Doppelhelix (Teoule R, 1987; Dizdaroglu M, 1987; von Sonntag C, 1987).

Vermutlich werden an den C4'-Positionen der Desoxyribose, überwiegend durch OH• und unter Verlust eines Protons, Desoxyribose-Radikale gebildet (Breen AP, 1995). Entstandene Schäden am Zuckerphosphat-Rückgrat auf beiden Strängen der DNA und in einem Bereich von etwa 10 bp sind besonders schwerwiegend. Eine Religation dieser Doppelstrangbrüche ist durch fehlende Phosphate oder OH-Gruppen am 3'-Ende sowie das Vorhandensein von Phosphoglycolate oder Phosphatverlust am 5'-Ende nicht möglich (von Sonntag C, 1987). Veränderungen an den Bruchenden, beispielsweise der Verlust von Basen oder überhängende Einzelstrangenden, erfordern eine umfassende Prozessierung bevor die Reparatur der DNA erfolgen kann (Kaufmann GW, 2001; Hall EJ, 2006; Friedberg EC, 2006).

## **2.2. Mechanismen der DNA-Reparatur**

Jeder DNA-Schaden induziert eine zelluläre Schadensantwort, deren Mechanismen die vorhandene Läsion erkennt, wenn möglich repariert und hierbei die Integrität und Funktionalität der DNA wiederherstellt.

### **2.2.1. Organisation von DNA und Chromatin innerhalb des Zellkerns**

In den Zellkernen von Eukaryoten formt die DNA durch ihre Assoziation mit Histonproteinen Ketten aus Nukleosomen, welche dort in übergeordneten Strukturen als Chromatin eng verpackt vorliegen. Die Nukleosomen bilden mit einer Größe von 100 kDa die kleinsten Unterheiten des Chromatins (Luger K, 1997; Kornberg RD, 1999). Um das zentrale Histon-Oktamer, bestehend aus den Core-Histonen mit zwei H2A-H2B Dimeren und einem H3-H4 Tetramer (Lugner K, 1997), sind in 1,7 linksgängigen superhelikalen Windungen 146 Basenpaare (bp) der DNA gewickelt (Kornberg RD, 1974; Noll M, 1974). Die globulären Domänen der Core-Histone dienen der Vermittlung von Histoninteraktionen innerhalb des Oktamers und sie interagieren mit den beiden Windungen der nukleosomalen DNA. Die einzelnen Nukleosomen werden durch Linker-DNA (10 bis 60 bp) zu einer perlenschnurartigen Struktur, der 10 nm-Fiber, miteinander verbunden. Diese Fiber wird mit 6 Nukleosomen pro Windung und durch die Bindung eines H1-Linker-Histons als 30 nm-Fiber oder helikale Solenoidstruktur stabilisiert (Hansen JC, 2002; Redon C, 2002; Thoma F, 1979; Woodcock CL, 1984). Diese Fasern sind letztendlich mit der Kernlamina assoziiert, so dass in weiteren Verdichtungsschritten über die 60 bis 80 nm-Fiber, die 100 bis 130 nm-Fiber und die 400 nm-Chromatide das Chromosom gebildet werden kann (Belmont AS, 1994). Diese stark

verdichtete Verpackung kommt jedoch nur in der Metaphase des Zellzyklus vor, wenn das genetische Material auf die Tochterzellen übertragen werden muss. Die so kondensierten, im Mikroskop sichtbaren Chromosomen werden deshalb oft auch Metaphase-Chromosomen genannt.

Diese Kompaktierung des eukaryotischen Genoms ermöglicht nicht nur die Unterbringung im begrenzten Raum des Zellkerns, sondern auch die Kontrolle aller DNA-vermittelten Prozesse innerhalb des Nukleus (Peterson CL, 2004): Gentranskription und Replikation sowie die durch DNA-Läsionen induzierte zelluläre Schadensantwort (Foser ER, 2005; Altaf M, 2007). Der Zugang für Replikations- und Transkriptionsproteine zur Basensequenz und die Fähigkeit von Reparaturfaktoren, DNA-Läsionen zu erkennen und diese zu beheben, wird durch spezifische Histonmodifikationen moduliert, da diese den Kondensationsgrad des Chromatins entscheidend beeinflussen. Modifikationen werden durch Histonmodifikationen, ATP-abhängige Chromatinumformungen oder durch den Austausch von Histonvarianten in der Chromatinfaser erreicht (Berger SL, 2002; Lydall D, 2005; Saha A, 2006). Von besonderer Bedeutung sind dabei posttranslationale Histonmodifikationen, wie Acetylierungen und Methylierungen, Phosphorylierungen sowie die Ubiquitinierung (Peterson CL, 2004). Durch diese Modifikationen wird die Ladung spezifischer Aminosäurereste verändert, wodurch Interaktionen zwischen den Histonen selbst sowie zwischen Histonen und der DNA beeinflusst werden können. Darüber hinaus können spezifische Histonmodifikationen als Signal zum Binden verschiedener DNA-Reparaturfaktoren fungieren. Hierbei besitzt die Phosphorylierung eine elementare Bedeutung, da sie der Zelle das Vorhandensein von DNA-Läsionen signalisiert und so die Rekrutierung der benötigten, spezifischen Reparaturfaktoren gesteuert wird (Altaf M, 2007). Insbesondere die Phosphorylierung des Serins 139 am C-terminalen Bereich der Histonvariante H2AX, dann  $\gamma$ H2AX genannt, spielt im Rahmen der DNA-Schadensantwort eine herausragende Rolle (Rogakou EP, 1998, 1999; Pilch DR, 2003).

### **2.2.2. Strahleninduzierte Schäden an der DNA**

Die DNA stellt, als Träger der genetischen Information, die kritische Struktur für Strahlenschäden dar. Berechnungen zufolge verursacht 1 Gy Röntgenstrahlung pro Zellkern 1000 bis 2000 Basenschäden, 600 bis 1000 Einzelstrangbrüche (ESB) und 16 bis 40 Doppelstrangbrüche (DSB) (Ward JF, 1988). Die in hoher Anzahl induzierten ESBs und Basenverluste werden sehr schnell repariert und haben kaum Einfluss auf das Überleben der Zelle (Ward JF, 1995). Hingegen sind DSBs sowie komplexe Schäden am aufwendigsten zu reparieren oder sogar irreparabel. Nicht oder fehlerhaft reparierten DNA-Schäden führen zu genomischer Instabilität, was Transformationen oder den Zelltod zur Folge haben kann. Die in dieser Arbeit verwendete Photonenstrahlung wird der locker ionisierenden Strahlung zugeordnet. Durch den niedrigen LET werden über indirekte Strahlenwirkung und die damit verbundene Radiolyse des Wassers überwiegend Hydroxylradikale erzeugt. Diese reagieren

mit der Desoxyribose, den Pyrimidinen oder Purinen der DNA und erzeugen typische Schadensmuster (Kapitel 2.1.3).

Durch die Kombination von direkter und indirekter Strahlenwirkung innerhalb einer einzelnen Ionisationsspur und die hierbei räumlich nah deponierte Energie können die gehäuft freigesetzten Hydroxylradikale, aufgrund ihrer geringen Reichweite im Bereich von etwa 20 bp, zahlreiche Schäden (*locally multiply damage site*, LMDS) induzieren (Hall EJ, 2006). Hierbei werden auch DSBs gebildet, indem sich innerhalb dieser LMDS mehrere ESBs in räumlicher Nähe an gegenüberliegenden DNA-Strängen ( $\leq 10$  bp voneinander entfernt) befinden (Friedland W, 1999). Diese Läsionen besitzen einen entscheidenden Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zelle (Chu G, 1997; Kanaar R, 1998), auf deren chromosomale Stabilität (Myung K, 2003) oder Mutagenität (Zhang Y, 2006). Bereits ein DSB kann durch die Inaktivierung eines wichtigen Genprodukts zum Zelltod führen (Jackson SP, 2002).

### **2.2.3. Zelluläre Schadensantwort auf DNA-Läsionen**

Die exakte Transmission genetischer Informationen von einer Zelle an ihre Folgegeneration ist essentiell für das Überleben des Organismus. Hierfür ist eine fehlerfreie DNA-Replikation und Chromosomenverteilung ebenso unerlässlich wie die Fähigkeit, spontane und programmierte DNA-Schäden zu reparieren und die Anzahl vererbbarer Mutationen zu minimieren. Aus diesen Gründen besitzen eukaryotische Zellen komplexe Mechanismen, um die Integrität der DNA zu überprüfen und die Reparatur von DNA-Läsionen zu koordinieren (Jackson SP, 2002; Bassing CH, 2004). In ihrer Gesamtheit werden diese Mechanismen als DNA-Schadensantwort bezeichnet.

#### **2.2.3.1. Signaltransduktionskaskade**

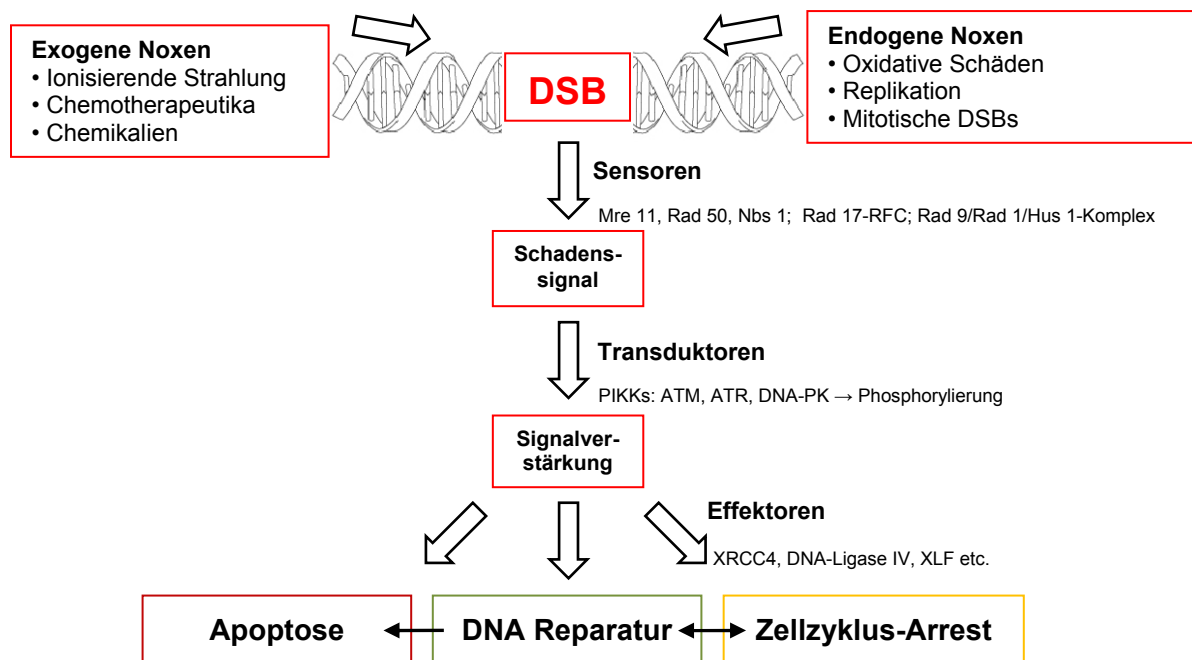
Durch ein primäres Signal wird die DNA-Schadensantwort von Sensorproteinen initiiert und das Schadenssignal durch Phosphorylierungsreaktionen über Transduktorproteine zu den Effektorproteinen weitergeleitet (Abbildung 2). Hierbei besteht das primäre Signal entweder aus dem DNA-Schaden selbst oder aus den Chromatinveränderungen, die durch den Schaden induziert werden. Die Effektoren, zu denen Zellzyklusinhibitoren und Reparaturfaktoren zählen, führen die von den Transduktoren verstärkten und übermittelten Schadenssignale aus. Wird auf diese Weise der Zellzyklus arretiert und somit der Eintritt einer geschädigten Zelle in die nächste Zellzyklusphase verhindert, bleibt genügend Zeit um auch schwere Schäden wie DSBs zu beheben.

Die Arretierung im Zellzyklus erfolgt am Übergang zwischen G1- und S-Phase (G1/S-Checkpoint), innerhalb der S-Phase (Intra-S-Checkpoint), am Übergang von der G2-Phase in die Mitose (G2/M-Checkpoint), sowie innerhalb der Mitose (Intra-M-Checkpoint). Ist die genetische Integrität einer Zelle jedoch gefährdet oder ein Schaden irreparabel, wird durch



Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose) die Zelle eliminiert (Lowndes NF, 2000; Zhou BBS, 2000; Khanna KK, 2001; Shiloh Y, 2003).

Über die Identität der Sensor- und Transduktorproteine sowie deren hierarchische Anordnung innerhalb der Signaltransduktionskaskaden wird kontrovers diskutiert. Der MRN-Komplex, bestehend aus Mre11 (*meiotic recombination protein 11*), Rad50 und Nbs1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*), der Rad17-RFC (*replication factor C*)-Komplex sowie der Rad9-Rad1-Hus1-Komplex werden in Betracht gezogen, als Sensor zu fungieren (Iliakis G, 2003; Petrini JH, 2003; Paull TT, 2005; Niida H, 2006; Lavin MF, 2007).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort**

Exogene und endogene Einflüsse induzieren DNA-Läsionen, unter ihnen DSBs als schwerwiegendste Schäden, die von Sensorproteinen erkannt werden. Das Schadenssignal wird über eine Signalkaskade an Transduktorproteine weitergeleitet, was zu einer Verstärkung des Signals und der spezifischen Aktivierung von nachgeschalteten Effektorproteinen führt. Je nach Zellzyklusphase oder Schwere des DNA-Schadens wird auf diese Weise der Zellzyklus-Arrest mit anschließender Reparatur eingeleitet oder die Zelle durch Apoptose aus dem Zellverband eliminiert. (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Khanna KK, 2001).

Drei zur Familie der Phosphatidyl-inositol-3 Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKKs) gehörende Serin-/Proteinkinasen sind weiter von zentraler Bedeutung: ATM (*ataxia telangiectasia mutated protein*), ATR (*ATM and Rad3-related protein*) und DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). Sie übersetzen, durch die Phosphorylierung unterschiedlicher Schlüsselproteine, das DNA-Schadenssignal der Sensorproteine in biochemische Modifikationen und leiten hierdurch das initiale Signal an die Effektorproteine weiter. Eine der ersten Kinasen, die aktiviert wird, ist ATM (Zhou BBS, 2000). Sie gilt als zentrale Kinase der DNA-Schadensantwort in Säugetieren (Shiloh Y, 2003; Uziel T, 2003) und ist für die unmittelbare und schnelle Phase der DNA-Schadensantwort von Bedeutung, während ATR erst zu einem späteren Zeitpunkt die Phosphorylierung von Schlüsselproteinen initiiert (Shiloh Y, 2003).

### 2.2.3.2. Reparatur von DNA-Schäden

Zellen nutzen unterschiedliche Reparaturwege um DNA-Läsionen zu beheben: Homologe Rekombination (HR), Nicht-Homologes End-Joining (NHEJ), Reparatur von fehlerhaften Basenpaarungen (*mismatch repair*) sowie Nukleotid- und Basenexzisionsreparatur (Sancar A, 2004, Ataian A, 2006).

Im Vergleich zu ESBs, bei denen nur in einem der beiden Doppelhelixstränge ein Kontinuitätsverlust auftritt, ist die Reparatur von DSBs weitaus komplexer, da ein möglicher Verlust der komplementären Sequenz beider DNA-Stränge die Wiederherstellung der ursprünglichen genetischen Information erschwert. Ebenfalls kann eine räumliche Separation der beiden freigesetzten DNA-Bruchenden zusätzlich die Reparatur beeinträchtigen. Werden DSBs nicht oder fehlerhaft repariert, können hierdurch direkte oder verzögerte chromosomale Veränderungen, beispielsweise Translokationen, Inversionen oder Deletionen, letztendlich zur Entstehung von Tumoren führen (Hoeijmakers JH, 2001; Van Gent DC, 2001; Khanna KK, 2001).

ESBs und Basenschäden werden effizient durch Exzisionsreparatur entfernt. Hierbei werden strukturelle Veränderungen der DNA durch Nukleotidexzisionsreparatur behoben und modifizierte oder fehlende Basen durch die Basenexzisionsreparatur korrigiert (Ataian Y, 2006; Hoeijmakers JH, 2001).

Insbesondere DSBs haben gravierende Auswirkungen auf die Chromatinstruktur und vermutlich sind Modifikationen des Chromatins an der Schadenssignalgebung beteiligt. Durch die Dekondensation im Umfeld eines DSBs werden vorher unzugängliche Histone freigelegt, wodurch diese für unterschiedliche Interaktionspartner besser erreichbar sind. Beispielsweise kann am Histon H3 an der Position Lys9 eine Methylierung erfolgen (Sanders SL, 2004), wodurch die Affinität des Mediatorproteins 53BP1 (*p53 binding protein1*) gegenüber H3 *in vitro* erhöht wird (Huygen Y, 2004).

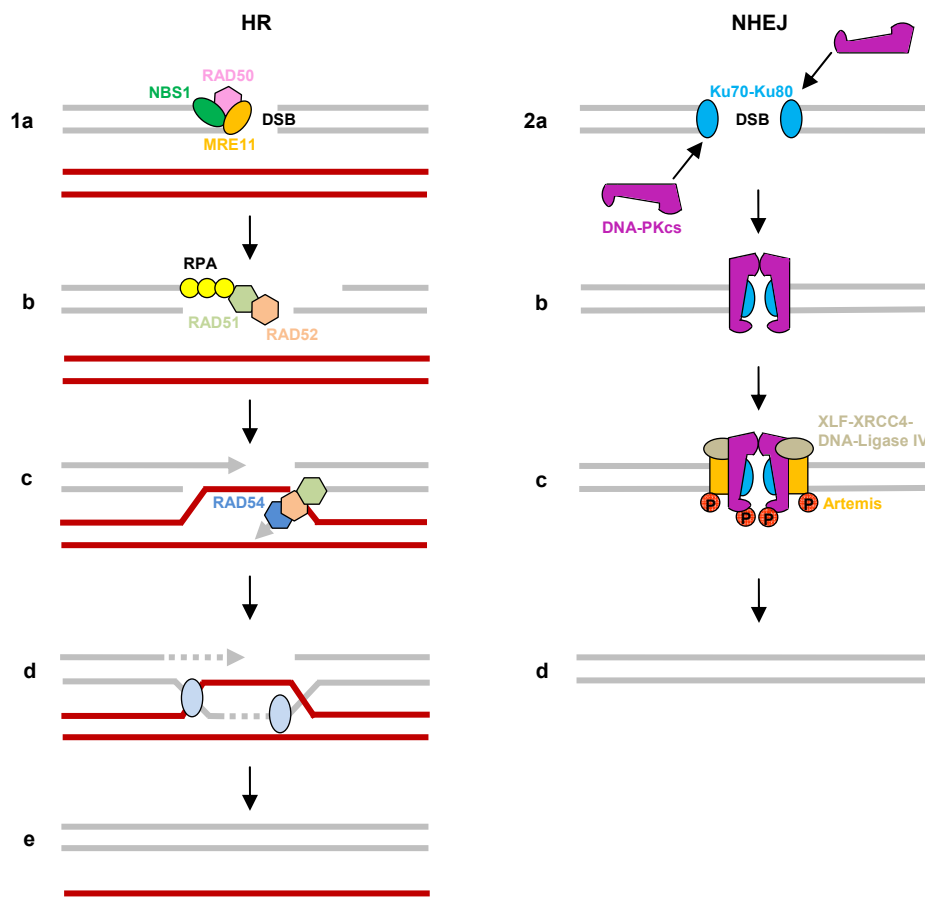
Ist ein DSB reparabel, existieren in eukaryotischen Zellen zwei Hauptwege, diesen zu reparieren: die auf die späte S- und G2-Phase beschränkte Homologe Rekombination und das Nicht-Homologe End-Joining, welches während des gesamten Zellzyklus möglich ist (Haber JE, 2000; Khanna KK, 2001).

#### Homologe Rekombination (HR)

Die HR ermöglicht durch einen Abgleich mit dem intakten und sequenzhomologen Bereich des Schwesterchromatids eine präzise und weitgehend fehlerfreie Reparatur des DSBs. Da diese homologen Bereiche in unmittelbarer Nähe des Bruches liegen müssen, kann die HR in höheren Eukaryoten nur in der S- und G2-Phase des Zellzyklus stattfinden (Burma S, 2006).

Nach Auftreten eines DSBs wird dieser durch ein Sensorprotein, den Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex (MRN-Komplex), erkannt. Zunächst vermittelt der MRN-Komplex die nukleolytische

Prozessierung der Bruchenden, wodurch einzelsträngige 3'-Überhänge entstehen. Durch die 3'-5'-Exo- und Endonukleaseaktivität von Mre11 wird eine Beteiligung des MRN-Komplexes an diesem Prozess vermutet, jedoch sind durch eine fehlende 5'-3'-Exonukleaseaktivität weitere Faktoren für die Resektion notwendig (Paull TT, 1998; Trujillo KM, 1998).



**Abbildung 3: Homologe Rekombination (HR) und Nicht-Homologes End-Joining (NHEJ).**

DSBs werden in höheren Eukaryoten durch HR (1) oder NHEJ (2) repariert.

1 a) Der MRN-Komplex, bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1, erkennt den DSB und bindet an die Bruchenden. b) Durch ATM werden die Bruchenden resektiert, wodurch überhängende 3'-Enden entstehen. Diese werden vom einzelstrangbindenden Protein RPA erkannt und geschützt. BRCA2 rekrutiert Rad51 und Rad52, unter Entstehung eines Nukleoproteinfilaments, auf die Einzelstränge. c) Rad51 und Rad52 sind an der Invasion des Einzelstranges in die homologe Sequenz beteiligt. d) Die DNA-Synthese erfolgt, ausgehend von dem invasivem Ende der beschädigten DNA, unter Bildung einer *Holliday junction*. e) Nach erfolgter DNA-Synthese und Ligation eventuell vorhandener Lücken werden die DNA-Stränge entweder unter Zuordnung der ursprünglichen Enden voneinander gelöst oder endonukleolytisch gespalten, wobei durch *crossing over* ein DNA-Austausch erfolgen kann.

2 a) Nach der Erkennung eines DSBs bindet das Ku70/Ku80-Heterodimer und rekrutiert die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PK<sub>cs</sub>). b) Das DNA-PK-Holoenzym schützt die Enden des DSBs und hält sie in räumlicher Nähe. c) DNA-PK<sub>cs</sub> und Artemis werden phosphoryliert und der Ligationkomplex, bestehend aus XRCC4, Ligase IV und XLF (Cernunnos) rekrutiert. d) Nach der Ligation dissoziieren die DNA-Reparaturfaktoren. (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Downs JA, 2007).

Aufgrund seiner ATPase-Aktivität wird Rad50 eine Beteiligung an der Dekondensation der DNA zugeordnet (Paull TT, 1999), während Nbs1 durch Interaktionen mit ATM vermutlich als Bindeglied zur Einleitung der DNA-Signaltransduktionskaskade fungiert. An die einzelsträngigen 3'-Überhänge bindet das Replikationsprotein A (RPA) und schützt diese vor möglichen

Schädigungen. Anschließend ersetzt die Rekombinase Rad51 das RPA an den einzelsträngigen Überhängen durch BRCA1 und BRCA2 (*breast cancer susceptibility gene 1/2*) und bildet ein Nukleoproteinfilament (Song B, 2000; Ting NS, 2004; Yang H, 2002). Durch die Rad52-Epistasisgruppe und Rad54 erfolgt ein ATP-abhängige Suche der homologen Sequenz und die anschließende Stranginvasion in den DNA-Doppelstrang des unbeschädigten Schwesterchromatids (Baumann P, 1996; Gupta RC, 1997). Durch die Invasion in die homologe Sequenz wird eine D-Schleife gebildet, die theoretisch auch eine Komplementarität zur anderen Seite des DSB besitzt. Hierdurch ist sowohl die Synthese am eingedrungenen Strang sowie am 3'-Ende des nicht-invasiven Stranges unter Bildung von Holliday-Intermediaten (X-förmige Strukturen, *holliday junction*) möglich. Im weiteren Reparaturprozess wandert die Kreuzungsstelle (*branch migration*), bis letztendlich die Trennung der überkreuzten Strukturen erfolgt (Abbildung 3). Der synthetisierte DNA-Strang wird vom Template gelöst und die Lücken in den DNA-Strängen durch Ligase I verbunden.

### **Nicht-Homologes End-Joining (NHEJ)**

NHEJ ist ein schnell ablaufender DSB-Reparaturprozess, der freie DNA-Enden direkt miteinander verbindet (Paques F, 1999; Lieber MR, 2003). Diese Reparatur verläuft, im Gegensatz zu HR, überwiegend nicht fehlerfrei ab, da die Verknüpfung der Bruchenden meistens zum Verlust einiger Nukleotide (Mikrodeletionen) führt. NHEJ kann in allen Phasen des Zellzyklus durchgeführt werden (Rothkamm K, 2003; Burma S, 2006), jedoch bevorzugt in der G0/G1-Phase (Moore JK, 1996; Takata M, 1998).

Zwei Proteinkomplexe bilden die Kernkomponenten der NHEJ: Die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), bestehend aus den regulatorischen Untereinheiten Ku70, Ku80 und der katalytischen Untereinheit DNA-PK<sub>cs</sub>, sowie dem XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex (Jeggo PA, 1998; Jackson SP, 2002). Nach der DSB-Erkennung bindet das Ku70/Ku80-Heterodimer (Ku-Komplex) selektiv und in Richtung des intakten Stranges an die freien DNA-Enden, bildet eine ringförmige Struktur um die DNA und stabilisiert hierdurch die Bruchenden (Walker JR, 2001). Durch die anschließende Rekrutierung von DNA-PK<sub>cs</sub> wird, gemeinsam mit dem Ku-Komplex, das aktive DNA-PK-Holoenzym gebildet. Dieses überbrückt vermutlich die Bruchlücke, hält die freien DNA-Enden in räumlicher Nähe (De Fazio LG, 2002) und schützt sie vor Degradation durch Nukleasen oder falscher Verknüpfung durch Ligasen (Weterings E, 2003). Bevor jedoch eine Religation durchgeführt werden kann, müssen die DSB-Bruchenden wieder freigelegt werden. Dies erfolgt vermutlich durch Autophosphorylierung zweier, an den komplementären Enden des DSBs gebundenen, DNA-PK-Komplexe (Meek K, 2007) sowie durch die Phosphorylierung von ATM (Chen BP, 2007), wenn bestimmte Voraussetzungen erfüllt sind: eine bereits erfolgte Einleitung der Signaltransduktionskaskade, die Aktivierung der Kinaseaktivität von ATM und die Ausrichtung der Bruchenden, um die trans-Autophosphorylierung von DNA-PK<sub>cs</sub> zu ermöglichen (Abbildung 3).

Anschließend werden die Bruchenden durch eine Konformationsänderung der DNA-PK für weitere Prozessierungsschritte und die Religation freigelegt, sowie unterschiedliche Reparaturfaktoren, unter anderen durch die Nuclease Artemis und den XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex, aktiviert. Dieser Komplex führt letztendlich die Religation aus, vermutlich mit Unterstützung von Cernunnos/XLF (XRCC4 like factor), wobei der Mechanismus noch nicht genau geklärt ist (Buck D, 2006; Ahnesorg P, 2006).

### **2.3. Methoden zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen**

Die Analyse von DSBs an definierten Zeitpunkten ermöglicht es, die Reparaturkapazität von Zellen zu untersuchen. Dies setzt jedoch Methoden voraus, mit denen der Anteil nicht reparierter DSBs spezifisch nachgewiesen werden kann. Gut etabliert und anerkannt ist die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), die Untersuchung von Chromosomenaberrationen, der neutrale Comet-Assay sowie die Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM). Hierbei ist PFGE jedoch nur zum Nachweis von DNA-Fragmenten, die durch sehr hohe Strahlendosen ( $\geq 60$  Gy) entstanden sind, geeignet. IFM stellt hingegen eine sensitive Methode dar, mit der DSBs auch nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen ( $\geq 10$  mGy) nachgewiesen werden können. Beide Nachweismethoden werden im Folgenden kurz erläutert.

#### **2.3.1. Pulsfeldgelelektrophorese**

Die PFGE, eine etablierte Standardmethode (Schwartz DC, 1984), beruht auf dem physikalischen Nachweis der durch Strahlung entstandenen DNA-Fragmente. Durch die größen-spezifische Wanderung im elektrischen Feld während der Elektrophorese können DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 10 Mbp aufgetrennt werden. Während eine herkömmliche Agarosegelelektrophorese mit gleichbleibender Spannung durchgeführt wird, ändert sich bei der PFGE in regelmäßigen zeitlichen Abständen die Orientierung des elektrischen Feldes, wodurch die aufzutrennenden DNA-Fragmente ihre Laufrichtung anpassen müssen. Da dies kleineren Fragmenten schneller gelingt als größeren, verbleibt ihnen eine längere Restzeit für die Wanderung im Gel, was letztendlich zu der größen-spezifischen Separation der Fragmente führt. Ein weiterer Unterschied im Vergleich zur Agarosegelelektrophorese besteht in der Vorbereitung der Proben. Zur Vermeidung einer weiteren, nicht strahlenbedingten Fragmentierung der aufzutrennenden DNA durch Scherkräfte werden die Zellen vor der Elektrophorese in Agaroseblöckchen eingegossen, lysiert und einem Proteinverdau unterzogen. Anschließend verbleibt allein die DNA innerhalb der Blöckchen. Diese werden in die Geltaschen eingesetzt und die DNA durch PFGE aufgetrennt. Die Größe der DNA-Fragmente resultiert aus der zur Induktion applizierten Dosis. Mit steigender Dosis werden zunehmend mehr DSBs induziert, wodurch immer kleinere Fragmente entstehen. Verbleibt den Zellen jedoch nach der Induktion Zeit die DNA-Schäden zu reparieren, vermindert sich auch die Anzahl der DSBs, wodurch die Fragmente mit zunehmender Reparaturzeit wieder größer

werden. Eine quantitative Analyse der vorhandenen DSBs erfolgt durch die Auswertung eines DNA-spezifischen Fluoreszenzsignals im Anschluss an die Färbung des Gels mit Ethidiumbromid oder bei  $^3\text{H}$ - bzw.  $^{14}\text{C}$ -markierten Zellen durch die Messung der Radioaktivität in einzelnen Gelregionen. Hierbei wird das Verhältnis von der im Gel vorhandenen DNA zu der Gesamt-DNA als FAR-Wert (*fraction of radioactivity released*) angegeben. Der Vergleich von diesem Wert mit einer durch unterschiedliche Induktionsdosen erstellten Kalibrierkurve ermöglicht es, die verbleibenden Restschäden zu beurteilen sowie jeder Probe eine Äquivalent-Dosis zuzuordnen. Jedoch müssen für diese Methode zur Reparaturanalyse von DNA-DSBs, wie bereits erwähnt, sehr hohe Strahlungsdosen appliziert werden.

### 2.3.2. Immunfluoreszenzmikroskopie

Diese Methode zur Untersuchung von DSBs beruht auf dem Nachweis von Proteinagglomeraten (DNA-Reparaturfaktoren), die in großer Anzahl und unmittelbarer Umgebung des Bruches rekrutiert werden. Der Nachweis solcher Proteine wird in mehreren Einzelschritten durchgeführt. Zunächst erkennt der Primärantikörper durch seine hohe Affinität spezifisch das Protein und bindet in einer Antigen-Antikörper-Reaktion fest daran. Nach mehreren Waschschritten erfolgt anschließend der spezifische Nachweis des gebundenen Primärantikörpers durch einen Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper. Das Fluorochrom dient als Detektionssystem, welches das Vorhandensein des Sekundärantikörpers durch eine Signalverstärkung (Fluoreszenz) am Ort des Proteins sichtbar macht. Hierbei wird das Fluorochrom durch eine Lichtquelle mit geeigneter Wellenlänge im Mikroskop angeregt, der indirekte Nachweis erfolgt somit visuell durch die fluoreszierenden und fokalen Strukturen, die als Foci (*radiation induced foci*, RIF) bezeichnet werden (Rogakou EP, 1999).

Diese Methode eignet sich ebenfalls zur Mehrfachdarstellung verschiedener Antigene in einem Präparat durch die Verwendung von Primärantikörpern unterschiedlicher Spezifität in Kombination mit Sekundärantikörpern, deren konjugierte Fluorochrome sich anhand der Emissionswellenlänge unterscheiden. Eine Voraussetzung hierfür stellt die technische Ausstattung des Lichtmikroskops mit geeigneten Filtern dar, um die Emissionswellenlängen des Lichtes präzise trennen zu können.

Weit verbreitet ist der IFM-Nachweis der Histonvariante H2AX, die nach dem Auftreten eines DSBs sehr schnell und über mehrere Mbp am Ser139 phosphoryliert ( $\gamma\text{H2AX}$ ) wird. Die Anzahl an  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci korreliert mit der applizierten Dosis und nimmt mit zunehmender Reparaturzeit ab. In vergleichenden Experimenten mit PFGE (Sedelnikova OA, 2002; Rothkamm K, 2003) und neutralem Comet-Assay (Mirzayans R, 2006) konnte die übereinstimmende Abnahme der  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci mit fortschreitender DSB-Reparatur gezeigt werden. Während für die Analyse der DSB-Reparatur mittels PFGE sehr hohe Strahlendosen benötigt werden, ist die Quantifizierung von Foci in Zellkernen nach Applikation niedriger Dosen möglich. Das Chromatin-gebundene  $\gamma\text{H2AX}$  fungiert als Basis für Checkpoint-Proteine und

andere Reparaturfaktoren, beispielsweise 53BP1 und MDC1, welche nach Auftreten eines DSBs in so großer Anzahl an den Bruch rekrutiert werden, dass sie ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar sind. Am NHEJ beteiligte und zentrale Proteine, beispielsweise Ku70, Ku80 oder Ligase IV, bilden keine lichtmikroskopisch sichtbaren Foci, da sie nicht in ausreichend hoher Anzahl am DSB akkumulieren, um ein Fluoreszenzsignal mit nachweisbarer Intensität zu erzeugen. Um diese Reparaturfaktoren visualisieren zu können, ist eine wesentlich höhere Auflösung mit entsprechender Sensitivität erforderlich.

### 2.3.3. Transmissionselektronenmikroskopie

Die Auflösungsgrenze eines konventionellen Mikroskops wird durch die Welleneigenschaften (Interferenz und Beugung) des verwendeten Lichtes bestimmt und ist hierdurch, unter optimalen Bedingungen, auf etwa 200 nm limitiert. Beschrieben wird dies durch die Abbesche Auflösungsgrenze  $d$ :

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

mit der Wellenlänge  $\lambda$ , der Brechzahl  $n$  und dem halben Öffnungswinkel  $\alpha$  des Objektivs. Aus technischen Gründen kann der Wert für  $(n \cdot \sin \alpha)$  im Lichtmikroskop nicht größer als 2 sein, wodurch Bildpunkte, die weniger als die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichtes voneinander entfernt sind, nicht mehr getrennt aufgelöst werden können.

Im Elektronenmikroskop werden durch ein elektrisches Feld beschleunigte Elektronen (Materiewelle), anstatt sichtbaren Lichts, zur Bilderzeugung verwendet. Die Wellenlänge  $\lambda$  von Teilchen wird nach de Broglie definiert

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$$

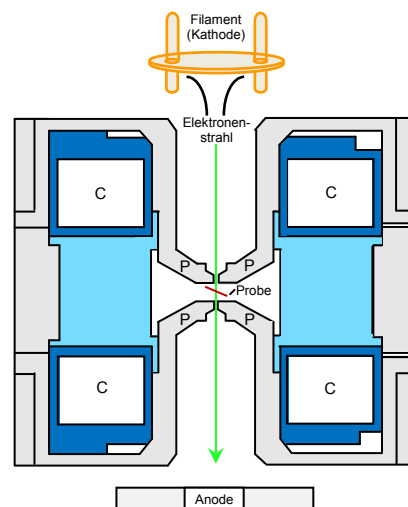
mit dem Planckschen Wirkungsquantum  $h$ , der Masse  $m$  und der Geschwindigkeit  $v$ , wodurch die Wellenlänge der Elektronen einzig von ihrer Geschwindigkeit bzw. Beschleunigungsspannung abhängt. Daher ist es möglich im Elektronenmikroskop bis zu  $10^4$ -fache Wellenlängen im Vergleich zum sichtbaren Licht zu erreichen, woraus eine Auflösungsgrenze von  $\leq 0,1$  nm resultiert, die nun durch präparatbedingte Abbildungsfehler oder durch die verwendeten Bauteile begrenzt wird. Biologische Präparate besitzen, je nach angewandter Präparationsmethode, eine Auflösungsgrenze von etwa 2 nm (Colliex C, 2008).

#### 2.3.3.1. Aufbau und Signalerzeugung

Die Freisetzung der Elektronen aus der Strahlenquelle kann thermisch (Triodensystem), durch Feldemission (field emission gun, FEG) oder als Kombination von beidem erfolgen. Im Triodensystem wird die Strahlerzeugung durch eine Glühkathode (Filament = Emitter, bestehend aus Wolfram,  $\text{LaB}_6$  oder  $\text{CeB}_6$ ), einen Wehneltzylinder (Steuerelektrode) und eine Anode realisiert: ein Heizstrom erhitzt das Filament auf ca.  $2500^\circ\text{C}$ , die aus dem Emitter austretenden Elektronen werden durch ein elektrisches Feld zur Anode hin beschleunigt, bis

der Elektronenstrahl letztendlich dort aus der zentralen Öffnung emittiert wird. Die Glühkathoden unterscheiden sich, je nach verwendetem Material, in der Helligkeit und Kohärenz der erzeugten Strahlung. Beispielsweise besitzt die LaB<sub>6</sub>-Kathode im Vergleich zu einer Kathode aus Wolfram eine bis zu dreißigfache Intensität und verbesserte Kohärenz. Die Feldemissionsquelle besteht aus einer kristallinen Wolframnadel, aus deren Spitze durch ein angelegtes 2 bis 7 kV Extraktionsfeld Elektronen freigesetzt und zur Anode hin beschleunigt werden. Die FEG besitzt gegenüber einer Wolfram-Triodenkathode eine ca. 5000fache Intensität mit entsprechend hoher Kohärenz (Miehe G, 2000).

Im Strahlengang befindet sich neben der Strahlenquelle und dem Beschleunigungssystem ebenfalls der Kondensator mit zwei elektromagnetischen Linsen, die jeweils aus Spulen (C) und Polschuh (P) bestehen (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer elektromagnetischen Linse**

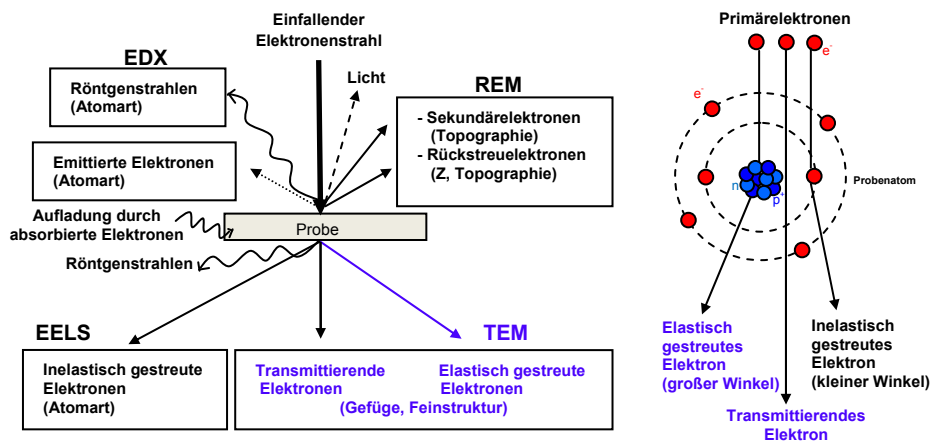
Objektivlinsen im Transmissionselektronenmikroskop sind elektromagnetische Linsen, die aus stromdurchflossenen Spulen (C) und speziell geformten Polschuhen (P) bestehen. Die von der Strahlenquelle ausgehenden divergenten Strahlen werden gebündelt, um eine helle und gleichmäßige Objektbeleuchtung zu ermöglichen. (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Miehe G, 2000)

Der Polschuh (Weicheisen, Fe-Co-Legierungen) erzeugt ein starkes rotationssymmetrisches und inhomogenes magnetisches Feld, welches den von der Strahlenquelle ausgehenden divergenten Elektronenstrahl konvergent bündelt und eine intensive und gleichmäßige Objektbeleuchtung ermöglicht (Williams DB, 1996). Die erste Kondensorlinse bestimmt zunächst den Durchmesser des Elektronenstrahls (spot size) während die zweite Linse die Fokussierung und Intensität des Strahls auf die Probe steuert. Unterhalb des Kondensors befindet sich zusätzlich eine Aperturblende (Kondensorblende), welche die Divergenz des Elektronenstrahls begrenzt (Miehe G, 2000).

In der Objektebene erfolgt letztendlich die Wechselwirkung der Elektronenstrahlung mit dem Objekt (Abbildung 5). Hierbei werden beim Durchdringen der Probe, abhängig von deren Beschaffenheit und Dichte, die Elektronen unterschiedlich stark absorbiert und gestreut. Eine inelastische Streuung erfahren die Elektronen des einfallenden Strahls durch Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Elektronen der Atomhüllen im Präparat, während die



elastische Streuung durch Interaktionen der Elektronen mit den positiv geladenen Atomkernen entsteht.



**Abbildung 5: Signalerzeugung bei Bestrahlung einer Probe mit hochenergetischen Elektronen**

In der Objektebene erfolgt die Wechselwirkung der Elektronenstrahlung mit einer Probe. Am Atomkern elastisch gestreute sowie transmittierende Elektronen werden in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zur Bilderzeugung genutzt.

EDX: Energiedisperse Röntgenspektroskopie (engl. energy dispersive X-ray spectroscopy), EELS: Elektronen-Energieverlustspektroskopie (engl. electron energy loss spectroscopy), REM: Rasterelektronenmikroskop (engl. scanning electron microscope, SEM). (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Miehe G, 2000; Flegler SL, 1995).

Letztere sowie nicht gestreute, transmittierende Elektronen dienen der Bildgebung. Die inelastisch gestreuten Elektronen erfahren einen Energieverlust und somit ebenfalls eine Änderung ihrer Wellenlänge, was letztendlich bei der Brechung an der abbildenden Linse zu chromatischer Aberration führt. Um diesen Abbildungsfehler zu minimieren, müssen die Präparate sehr dünn ( $\leq 90$  nm) geschnitten werden. Zusätzliche Wechselwirkungen mit Gasmolekülen werden verhindert, indem die Analyse der Probe in einer Hochvakuumkammer erfolgt (Plattner H, 1987). Von jedem Probenpunkt ausgehend verlaufen wechselwirkungsbedingt Strahlen in verschiedene Richtungen, die durch das Objektiv wieder in einem Punkt in der Zwischenbildebene gebündelt werden. Die Qualität der Objektivlinse (Öffnungsfehler, sphärische Aberration) ist hierbei von entscheidender Bedeutung für das Auflösungsvermögen. Das finale Bild wird durch die Gesamtheit aller in der Zwischenebene abgebildete Probenpunkte erzeugt, indem es unter erneuter Vergrößerung durch eine Projektivlinse letztendlich in der Endbildebene auf dem Leuchtschirm oder durch Umwandlung in Photonen mittels CCD-Kamera auf dem Monitor abgebildet wird (Miehe G, 2000).

### 2.3.3.2. Bildgebung und Kontrastentstehung

Die Bereiche einer Probe, in denen Elektronen ohne Wechselwirkungen transmittieren können, erscheinen im TEM-Bild hell. Das Maß der elastischen Streuung eines Elektrons ist hingegen proportional von der Atomkerngröße (Ordnungszahl) abhängig, an der die Streuung erfolgt. Aus diesem Grund werden Elektronen, die mit Elementen hoher Ordnungszahl interagieren, mit größerem Winkel abgelenkt und können hierdurch oftmals die Objektivblen-

de nicht passieren. Bedingt durch diese Absorptionen gelangen von den jeweiligen Probenpunkten nur wenige oder keine Elektronen in die Zwischenbildebene, die entsprechenden Stellen bleiben auf dem Leuchtschirm dunkel.

Biologische Proben sind überwiegend aus Elementen niedriger Ordnungszahlen aufgebaut und werden deshalb zur Kontrastverstärkung mit schwermetallhaltigen Substanzen behandelt bevor sie im TEM analysiert werden. Die positiv-geladenen Schwermetallionen lagern sich bevorzugt an negativ geladene zelluläre Feinstrukturen an und streuen dort vermehrt Elektronen mit großer Ablenkung. Helle Bereiche entsprechen einer geringen Schwermetall-dichte im Präparat, während dunkle Areale durch hohe Schwermetalldichte hervorgerufen werden (Lange RH, 1981).

### **2.3.3.3. Immunogold**

Die Immunogold-Markierungstechnik (Louro D, 1984) wird verwendet, um Epitopverteilungen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern transmissionselektronenmikroskopisch zu untersuchen. Hierbei unterscheidet sich die prinzipielle Vorgehensweise kaum von der Proteinmarkierung für die IFM (Kapitel 2.3.2). Zunächst bindet ein Primärantikörper an das nachzuweisende Protein und wird anschließend durch einen Sekundärantikörper detektiert. Dieser ist jedoch nicht wie zuvor bei der IFM beschrieben an ein Fluorochrom gekoppelt, sondern an einen Goldpartikel definierter Größe (kolloidales Gold). Aufgrund der starken Elektronenstreuung an Elementen hoher Ordnungszahl (Kapitel 2.3.3.2) sind Goldpartikel im TEM gut darstellbar und ermöglichen hierdurch, in Kombination mit der Ortsauflösung im nm-Bereich, einen sensitiven Nachweis einzelner Proteine.

### 3. Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) die Visualisierung unterschiedlicher Immunogold-markierter DNA-Reparaturproteine in der intakten Ultrastruktur des Zellkerns etabliert. Aufgrund des erheblich höheren Auflösungsvermögens dieser TEM-Methode sind im Vergleich zur Immunfluoreszenzmikroskopie weitaus präzisere Analysen hinsichtlich der Prozessierung von DNA-Schäden durchführbar. So ist es möglich, die zentralen Reparaturproteine des NHEJ wie beispielsweise das Ku70/Ku80-Heterodimer, welches am Doppelstrangbruch in so geringer Anzahl vorliegt, dass keine fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren Foci ausgebildet werden, nach einer Immunogold-Markierung mit Hilfe der TEM nachzuweisen. Darüber hinaus ermöglicht die TEM aufgrund der unterschiedlichen Elektronenstreuung eine klare Differenzierung zwischen dicht kondensiertem Heterochromatin (elektronenundurchlässig, dunkle Bereiche im Zellkern) und locker gepacktem Euchromatin (helle Bereiche). Durch die Detektion des phosphorylierten Ku70 (pKu70), welches unabhängig von der Chromatinstruktur direkt an die DNA-Bruchenden bindet, kann die Reparatur von Doppelstrangbrüchen sowohl im Euchromatin als auch im Heterochromatin analysiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die zeitliche und räumliche Koordination verschiedener Reparaturproteine zu untersuchen und somit die molekularen Mechanismen der DNA-Schadensantwort in Abhängigkeit von der zellspezifischen Chromatinstruktur zu charakterisieren.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material und Geräte

Die nachfolgenden Kapitel 3.1.1 bis 3.1.5 geben einen Überblick bezüglich der verwendeten Chemikalien und Lösungen sowie der Material- und Geräteausstattung.

#### 4.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Benzil	Plano, Wetzlar, Deutschland
BSA-c <sup>TM</sup> (acetyliertes Rinderserumalbumin)	Aurion, Wageningen, Niederlande
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol abs.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glutaraldehyd (GA)	Science Services, München, Deutschland
LR-Gold Harz	Plano, Wetzlar, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Science Services, München, Deutschland
Pioloform BM18	Plano, Wetzlar, Deutschland
Uranylacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vectashield Eindeckmedium mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Linaris, Westheim-Bethingen, Deutschland
Xylol	Hedinger, Stuttgart, Deutschland
Ziegen-Normalserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

#### 4.1.2. Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Herstellung
Allgemein	
PBS	20 mM Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4
Injektionslösung zum Sedieren der Mäuse	Rompun®, 2% Xylazinhydrochlorid und Ursotamin®, 100 mg/ml Ketaminhydrochlorid im Verhältnis 1:2, 15 µl pro Gramm Körpergewicht der Maus, subkutan injiziert
Für IFM	
Retrieval-Lösung	270 ml destilliertes Wasser und 30 ml 10fach Retrieval-Stammlösung
Ziegen-Normalserum	5% Ziegen-Normalserum in PBS
Für TEM	
Aldehyd-Inaktivierungspuffer	50 mM Glycin in PBS lösen
Befilmungslösung für Grids	1,2% Pioloform (w/v) unter ständigem Rühren langsam in reinem Chloroform lösen
Blockingreagenz	5% BSA, 5% Normalserum, 0.1% Kaltwasser-Fischhautgelatine Alternativ: Blockingreagenz von Aurion, Wagening, NL
Fixierlösung	2,0% Paraformaldehydlösung und 0,05% Glutaraldehydlösung in PBS
Glutaraldehydlösung	50% Glutaraldehyd in destilliertem Wasser lösen (w/w)
Infiltrationslösungen	LR-Gold mit Ethanol im Verhältnis 3:7, 5:5 und 7:3 mischen und bei -20°C aufbewahren
Inkubationspuffer	0,1% BSA-c in PBS, pH 7,4 (mit 1 M HCl)
Methylcellulose	2% Methylcellulose (1g/50 ml) in kaltem, destilliertem

	Wasser lösen und 1 bis 2 Tage im Kühlschrank rühren lassen. Anschließend die Lösung bei 100 000 g bei 4°C für 30 min zentrifugieren und in 2 ml Reaktionsgefäße aufteilen. Bei 4°C lagern
Paraformaldehydlösung	32% Paraformaldehyd in destilliertem Wasser lösen (w/w)
Uranylacetat	2,0%

#### 4.1.3. Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
<b>Primärantikörper</b>	
γH2AX	Bethyl, Montgomery, USA
H3K9me3	Abcam, Cambridge, UK
H3K9ac	Abcam, Cambridge, UK
MDC1	Bethyl, Montgomery, USA
p53BP1	Bethyl, Montgomery, USA
53BP1	Bethyl, Montgomery, USA
pKu70	Abcam, Cambridge, UK
pDNA-PKcs	Novus Biologicals, Colorado, USA
<b>Sekundärantikörper</b>	
Fluoreszenzmarkiert: Alexa Fluor 568 oder 488, goat anti rabbit	Invitrogene, Oregon, USA
Goldmarkiert: 6/10/15 nm Partikelgröße, goat anti rabbit	Aurion, Wageningen, Niederland

#### 4.1.4. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Deckgläser (24 x 50 mm)	IDL, Nidderau, Deutschland
Einwegpipetten, 5/10/25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen, 15/50 ml	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Grid-Aufbewahrungsboxen	Plano, Wetzlar, Deutschland
Grids, Nickel, 2x1mm Schlitz	Plano, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Objektträger-Boxen	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Parafilm	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen weiß/gelb/blau	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß, 0.5/1.5/2.0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rasierklingen	Plano, Wetzlar, Deutschland

#### 4.1.5. Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Beschleuniger, Artiste, MLC 160	Siemens Medical Solutions, Californien, USA
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Clean bench	Heraeus, Hanau, Deutschland
Cryokammer	Klinikinterne Eigenanfertigung
Diamantmesser; 3,5 mm Länge, 45° Winkel	Diatome AG, Biel, Schweiz

---

Eismaschine	Scotsman, Illinois, USA
Elektronenmikroskop, Tecnai Biotwin	FEI, Oregon, USA
Gefrierschrank, - 80°C	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Gefrierschrank, - 20°C	Bosch, Gerlingen, Deutschland
Heizplatte	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Kühlschrank	Bosch, Gerlingen, Deutschland
Lichtmikroskop, Eclipse E600 mit integrierter Kamera DS-Fi1 und den zugehörigen Filtern ND16, ND8 und ND4	Nikon, Tokio, Japan
Mikrowelle	Panasonic, Osaka, Japan
Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Schlittenmikrotom, RM2235	Leica, Wetzlar, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop, Tecnai G <sup>2</sup> Biotwin, Kamera Mega View III	FEI, Oregon, USA
Ultramikrotom, Ultracut S	Leica, Wetzlar, Deutschland
Vortex-Mixer	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland

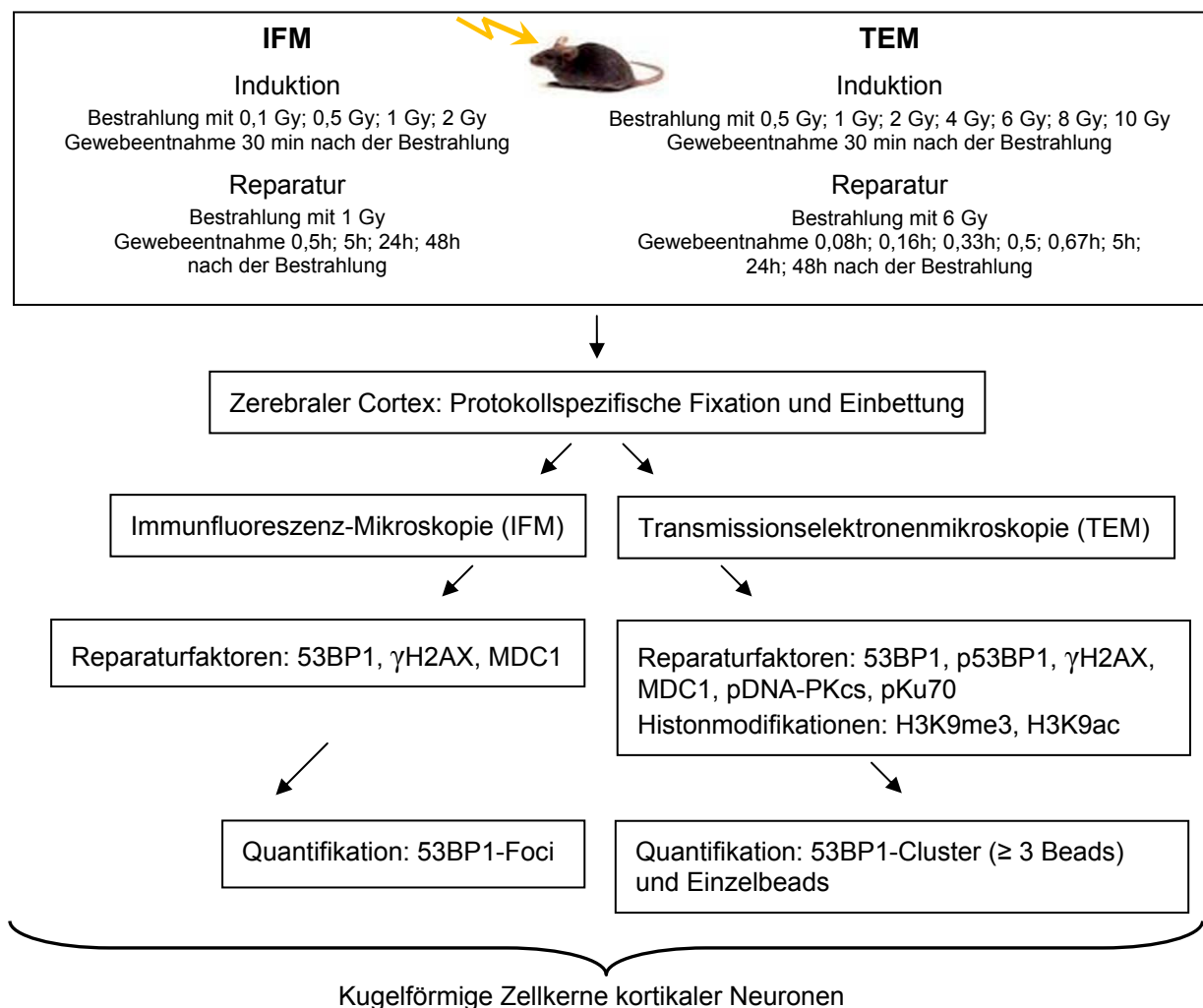
---

## 4.2. Methoden

In vorangegangenen Projekten der Arbeitsgruppe wurde die  $\gamma$ H2AX-Foci-Analyse (IFM) zur Untersuchung der Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen in unterschiedlichen Mausgeweben angewendet. Die in dieser Arbeit durchgeführten und beschriebenen Experimente wurden in den Neuronen des zerebralen Cortex durchgeführt, da die gut erkennbaren Foci in den kugelförmigen Zellkernen eine zuverlässige Quantifizierung ermöglichen.

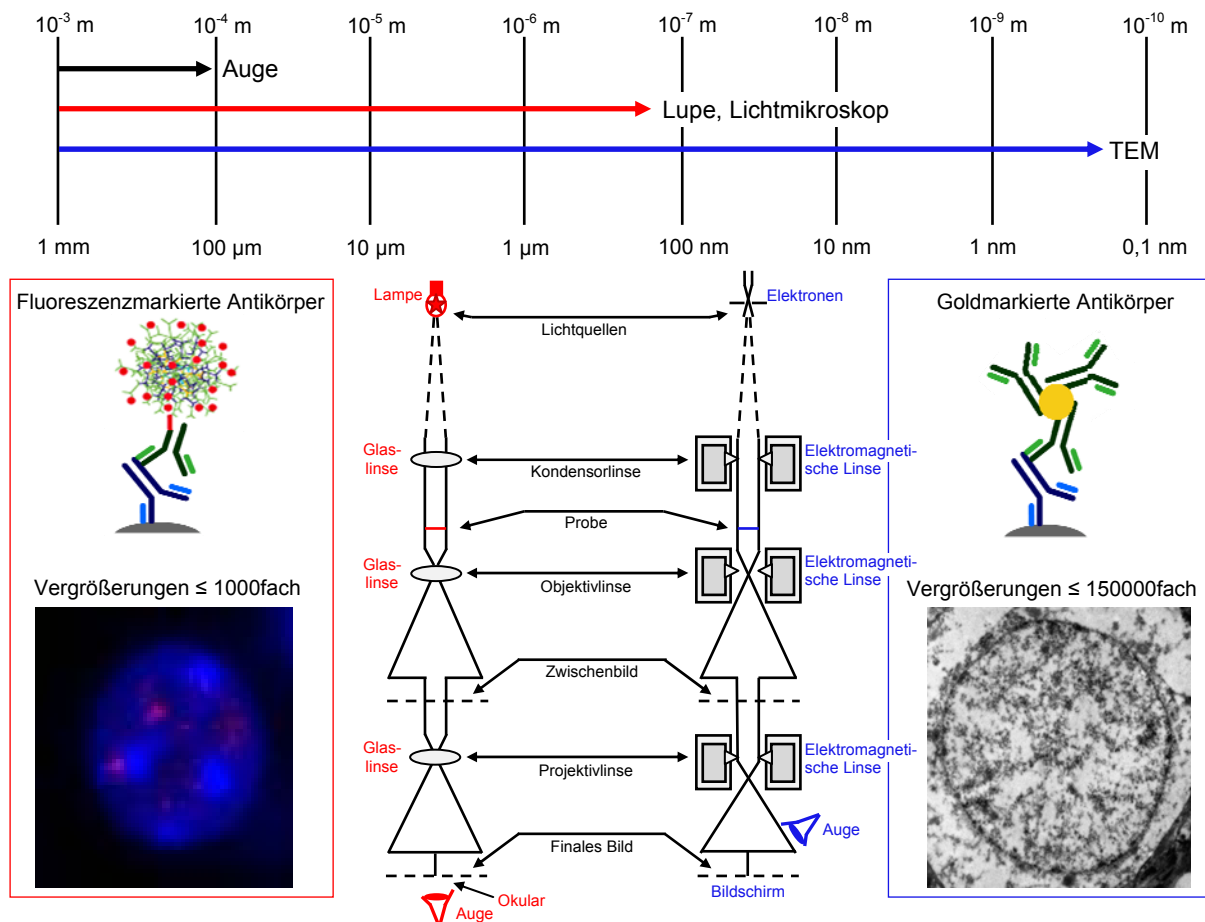
### 4.2.1. Übersicht der durchgeführten Experimente

Nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen (Quantifizierung der DSB-Induktion in Abhängigkeit von der applizierten Dosis) sowie an festgelegten Zeitpunkten nach der Bestrahlung (Erfassung der Reparaturkinetik) wurde das Hirngewebe entnommen (Abbildung 6). Im Anschluss an eine protokollspezifische Einbettung des Gewebes wurde die gleiche Region des zerebralen Cortex fluoreszenzmikroskopisch und elektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 7).



#### Abbildung 6: Arbeitsablauf

Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs zur Untersuchung verschiedener Reparaturfaktoren und Histonmodifikationen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)



**Abbildung 7: Aufbau und Auflösungsvermögen vom Licht- und Elektronenmikroskop**

Während Lichtmikroskope (LM) eine Auflösungsgrenze von 200 nm besitzen, kann im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) eine Ortsauflösung von  $\leq 1$  nm erreicht werden. Die schematische Zeichnung in der Mitte zeigt den annähernd gleichen Aufbau vom Licht- und Elektronenmikroskop, Unterschiede sind mittels farbiger Schrift gekennzeichnet (LM: rot, TEM: blau). Zum Nachweis von Reparaturfaktoren werden in der Immunfluoreszenz Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, bei der elektronenmikroskopischen Nachweismethode hingegen Antikörper, die an einen Goldpartikel gebunden vorliegen.

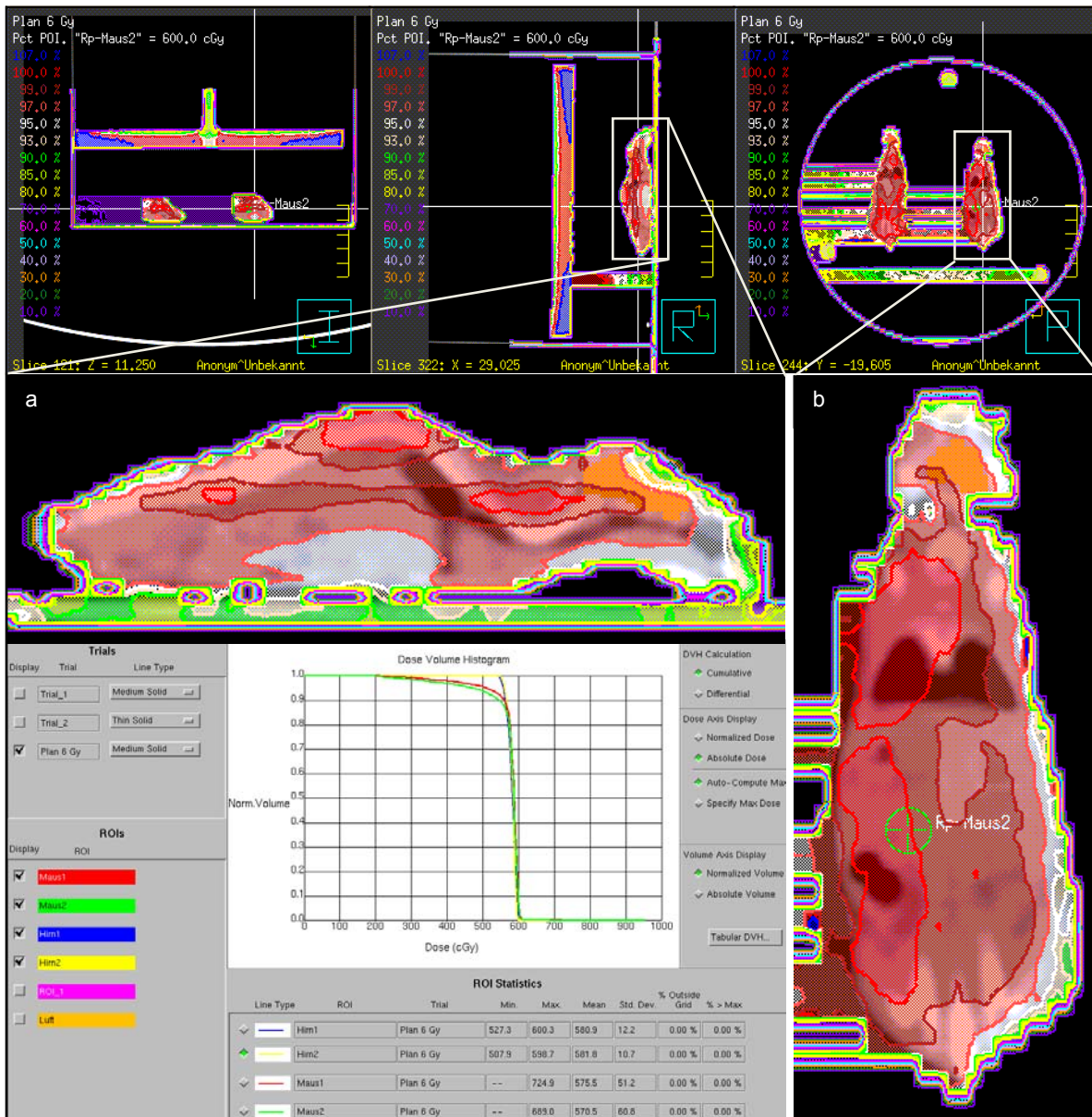
#### 4.2.2. Bestrahlung von Mäusen

Die Bestrahlung der Mäuse wurde an einem Linearbeschleuniger der Firma Siemens, Modell Artiste, bei 6 MV maximaler Beschleunigungsspannung durchgeführt. Während der Applikation befanden sich die Tiere in einem Plexiglaszylinder (18,5 cm Durchmesser), der komplett von einem senkrechten Strahlenfeld (30 cm x 30 cm Feldgröße, Gantry und Collimator  $0^\circ$ , SSD 85.92 cm) erfasst wurde.

Um den Dosisaufbaueffekt im Gewebe zu minimieren bzw. um dort eine möglichst homogene Dosisverteilung zu gewährleisten und um gleichzeitig die Bewegungsfreiheit der Tiere einzuschränken wurde parallel zum Boden eine Plexiglasscheibe (1,5 cm dick) in den Zylinder eingeführt. Durch Abstandshalter verblieb den Mäusen eine Raumhöhe von 5 cm. Die Bestrahlungsplanung erfolgte anhand einer CT-Bildserie (Plexiglaszylinder mit drei Mäusen) mittels der Software Pinnacle, Version 8.0, von Philips (Abbildung 8, oberes Bild). Für eine anschaulichere Darstellung wurden die Isodosen flächendeckend farbige eingestellt. Alle



Bereiche einer Farbe beinhalten den jeweils zugeordneten prozentualen Anteil der applizierten Gesamtdosis. Beispielsweise umschließt die 97% Isodose (hellrot) nahezu vollständig das Gehirn (orange) der Maus (Abbildung 8, a und b). Die dort vorhandene, homogene Dosis beträgt somit 5,82 Gy (Soll: 6,0 Gy). Aus der stirnseitig flachen Schädelform resultiert bis annähernd zur vorderen Hälfte des Gehirns ein Dosisgradient (weiß: 95% bis gelb: 80% der Solldosis). Deshalb wurden für die TEM-Untersuchungen die hinteren Bereiche des zerebralen Cortexes eingebettet und analysiert, da hier nur geringe Dosisinhomogenitäten von maximal 5% mittels Pinnacle berechnet wurden.



**Abbildung 8: Bestrahlungsplanung mittels Pinnacle**

Das Planungs-CT des Plexiglaszylinders und der darin enthaltenen Mäuse wurde mit einem Bildabstand von 1 mm am klinikinternen Philips Big Bore (120 kV) Computertomograph angefertigt. Die Bestrahlungsplanung erfolgte exemplarisch mittels Pinnacle, Version 8.0, ebenfalls von Philips. Zur anschaulicheren Darstellung wurden die Isodosen flächendeckend farbige eingestellt, ebenso wie die Kontur des Gehirns (orange, Abbildung a und b). Die Ganzkörperbestrahlung der Mäuse erfolgte mit 6 Gy, appliziert in einer Fraktion über ein senkrecht Strahlenfeld.

### 4.2.3. Entnahme der Gewebe

Vor der Gewebeentnahme wurden die Mäuse mit 15 µl Rompun/Ursotamin-Lösung pro Gramm Körpergewicht (subkutan verabreicht) sediert, bis keine Reflexe mehr nachweisbar waren. Nach Eröffnung der Bauchdecke wurden Herz, Lunge, Dünndarm, Nieren und Hoden sowie das Gehirn und Teile der Haut entnommen.

Alle Gewebe wurden geteilt und protokollspezifisch für die Immunfluoreszenz (Kapitel 4.2.4) sowie für die Elektronenmikroskopie (Kapitel 4.2.5.1) über Nacht fixiert und anschließend eingebettet (Kapitel 4.2.5.2). Obwohl die Experimente in dieser Arbeit ausschließlich im zerebralen Cortex erfolgten, wurden die anderen Organe ebenfalls asserviert.

### 4.2.4. Immunfluoreszenzmikroskopie

Da die einzelnen Komponenten des Detektionssystems in separaten Reaktionen und zeitlicher Abfolge dem Präparat zugeführt werden, ist die IFM zeitintensiv und beeinflussbar durch die Fixierungsart, die Fixierungsdauer sowie die Einbett- und Vorbehandlungsmethoden (Antigen-Retrieval) der Präparate. Auch besteht eine Abhängigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion von der Umgebungstemperatur, der Inkubationszeit und von dem optimalen Reaktionsmilieu (pH-Wert und Salzkonzentration der verwendeten Reagenzien), individuell für jedes durchgeführte Markierungsexperiment. Letztendlich erfolgt die Analyse der Foci im morphologischen Kontext des zu untersuchenden Gewebes, beispielsweise innerhalb Dapigefärbter Zellkerne. Hierbei können unspezifische Bindungen (endogene Peroxidasen, endogenes Biotin usw.) zu allgemeinen Hintergrundsignalen führen, wodurch eine klare Trennung von diesen und den zu analysierenden Foci erschwert wird. Für reproduzierbare und plausible Ergebnisse sollten deshalb alle Parameter möglichst konstant gehalten werden.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden 4 µm dicke Schnitte aus dem Cortex von Mäusen verwendet, welcher zuvor fixiert (Kapitel 4.2.4.1) und eingebettet (Kapitel 4.2.4.2) wurden.

#### 4.2.4.1. Fixation von Geweben

Für die Immunfluoreszenzanalysen dieser Arbeit wurde formaldehydfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet. Wässrige Formaldehydlösungen, bestehend aus Methylenglykol, dem die reaktive Carbonylgruppe ( $R-C=O$ ) fehlt, infiltrieren schnell und annähernd konzentrationsunabhängig das Gewebe (Medawar PB, 1941), jedoch erfolgt die Fixierung selbst verhältnismäßig langsam. Formaldehydmoleküle interagieren hierbei mit gewebeinternen Komponenten durch die Addition von primären Aminen ( $R-NH_2$ ) (Puchtler H, 1985) wodurch zunächst Aldimine ( $R-N=CH_2$ , Schiffsbasen) entstehen, welche unter geeigneten sterischen Bedingungen in einer langsameren Sekundärreaktion mit Amiden oder anderen funktionellen Gruppen zu stabilen Methylenbrücken ( $R-NH-CH_2-R'$ ) kondensieren und letztendlich die immobilisierungsrelevanten Vernetzungen bewirken (French D, 1945; Feldman

MY, 1973; Gustavson KH, 1956). Durch diese Reaktionen mit dem Gewebe wird stetig Formaldehyd aus der Fixierlösung entzogen, wodurch - bedingt durch die Wiederherstellung des chemischen Gleichgewichts - die Dissoziation von Methylenglykol induziert wird. Die hierdurch stetig entstehenden Formaldehydmoleküle sind wiederum an der bereits beschriebenen Fixierung beteiligt (Jones D, 1973).

Die Vernetzungsreaktion ist stark vom pH-Wert der verwendeten Lösungen abhängig, da dieser die Protonierung der Aminogruppen ( $\text{NH}_2$ ) bestimmt. Aus der dreifach erhöhten Affinität von Formaldehyd zu protonierten  $\text{NH}_2$ -Gruppen im Vergleich zu den ungeladenen (Kallen RG, 1966) resultiert eine schnelle und starke Fixation, jedoch mit unerwünschtem heterogenen Fixierungsgrad innerhalb des Gewebes (Berod A, 1981). Um dies zu vermeiden, werden strukturerhaltenden Konservierungen von Geweben üblicherweise in gepufferter Formaldehydlösung (4%) durchgeführt. Durch den erforderlichen Zusatz von Puffersalzen wird jedoch die bereits vorhandene unphysiologische Osmolalität der Lösung weiter erhöht, wodurch die Zellmembranen einem starken osmotischen Druck ausgesetzt sind (Fox CH, 1985). Durch die beschriebenen intrazellulären chemischen Prozesse können Chromatinkondensationen (durch Gradienten) sowie DNA-Fragmentierungen (durch Formaldehyd) induziert und fixiert werden (Werner M, 2002).

Die Fixierungszeit nimmt in etwa eine Stunde pro mm Gewebedicke in Anspruch (Srinivasan M, 2002). Nach etwa 24h hat eine vierprozentige Formaldehydlösung, unter Einstellung eines Diffusionsgleichgewichtes, Gewebedicken von 20 mm oder mehr infiltriert (Fox CH, 1985). Wird der Vernetzungsprozess vorher unterbrochen, bleibt das Gewebe teilweise unfixiert und/oder erfährt eine Vollendung des Prozesses durch den nachfolgend zur Gewebedehydrierung eingesetzten Ethanol. Hieraus resultieren Mischfixierungen mit variablen Anteilen aus Quervernetzungen und Proteinpräzipitationen, die nicht reproduzierbare oder inkonsistente Ergebnisse bezüglich der Immunfluoreszenzfärbungen zur Folge haben können (Werner M, 2002). Übermäßige Fixierung kann durch den dauerhaften Einfluss der Fixative und die daraus resultierende exzessive Vernetzung eine Unzugänglichkeit der Epitope bewirken und hierdurch schwache oder fehlende Antikörpersignale verursachen (Werner M, 2000).

Trotz sachgemäßer Formaldehydfixierung ist ein immunhistochemischer Proteinnachweis erst nach einer Hitze-induzierten Wiederherstellung der Epitope möglich (Kapitel 4.2.4.4).

Alle Gewebe (Teile von Haut, Herz, Lunge, Dünndarm, Nieren, Hoden und Gehirn) wurden für die IFM direkt nach der Entnahme und Teilung in wässriger 4%iger Formaldehydlösung ihrer Gewebedicke entsprechend, jedoch maximal 24h, bei Raumtemperatur fixiert.

#### 4.2.4.2. Paraffineinbettung und Sektionierung

Die über Nacht fixierten Gewebe wurden automatisiert in Paraffin eingebettet. Hierzu erfolgte zunächst die Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%) und durch anschließende dreimalige Inkubation in reinem Ethanol (je 65 min). Die Gewebe wurden mit Xylol (2 x 55 min, 1 x 80 min) auf die Paraffinaufnahme vorbereitet und anschließend in Paraffin inkubiert (1 x 60 min, 2 x 80 min).

Nachdem die Gewebe den Einbettautomaten (Shandon Excelsior ES, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durchlaufen hatten, wurden die Gewebe in Ausgießformen eingebracht und mit flüssigem Paraplast (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) übergossen. Nach dem Aushärten des Paraffins über Nacht wurden die Blöcke aus den Formen herausgelöst und im Hinblick auf die bevorstehende Anfertigung von Gewebeschnitten kurzzeitig bei -20°C gelagert. Die Sektionierung der Präparate in Schnitte mit einer Dicke von 4 µm erfolgte an einem Schlittenmikrotom (Leica, RM2235). Diese wurden von der Wasseroberfläche auf Objektträger überführt, in 50°C warmen Wasser gestreckt, damit sie luftblasenfrei aufliegen, und anschließend bei 37°C getrocknet.

#### 4.2.4.3. Entfernung des Paraffins und Rehydrierung der Gewebeschnitte

Immunhistochemische Analysen der zuvor formaldehydfixierten und in Paraffinwachs eingebetteten Präparate sind erst nach einer Deparaffinierung möglich, da das Gewebe ansonsten nicht in eine wässrige und gepufferte Umgebung überführt werden kann. Die getrockneten Schnitte auf den Objektträgern wurden zum Herauslösen des Paraffins zweimal für jeweils 10 min in dem organischen Lösungsmittel Xylol (Dimethylbenzol) inkubiert. Die angestrebte Rehydrierung des Gewebes erfordert zunächst die Substitution des Lösungsmittels durch Ethanol, da dieser Alkohol sowohl mit Xylol als auch mit Wasser mischbar ist. Hierfür wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten zunächst in reinen Ethanol überführt und 3 min unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte analog in jeder Konzentrationsstufe der absteigenden Alkoholreihe (99%, 96%, 90%, 80%, 70%) die Inkubation für jeweils 3 min, um zu sprunghafte Änderungen des umgebenden Milieus zu vermeiden. Zuletzt wurden die Schnitte einige Minuten in destilliertem Wasser inkubiert, bis sie weiterprozessiert wurden.

#### 4.2.4.4. Markierung von Reparaturfaktoren mittels IFM

Nach der Paraffinentfernung und der Rehydrierung können zwar die Zellkerne des zu untersuchenden Gewebes bereits mittels Nukleinsäurefarbstoffen, beispielsweise 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), lichtmikroskopisch analysiert werden, jedoch besteht noch keine Zugänglichkeit für Antikörper. Aus diesem Grund ist vor der Durchführung immunhistochemischer Färbungen eine Permeabilisierung des Gewebes unerlässlich. Zusätzlich verursacht die Fixierung mittels Formaldehyd Quervernetzungen, die Proteinepitope verändern und deren Erkennung durch Antikörper erschweren und verhindern können. Als Antigen-

Retrieval wird die Wiederherstellung von Epitopen durch Erhitzen mittels Mikrowellen oder Kochen im Wasserbad bezeichnet, die aufgrund der Formaldehydfixierung maskiert und somit für Antikörper unzugänglich sind (Shi SR, 1991). Die Gewebeschnitte wurden hierzu in Gegenwart eines Zitrat-Puffers (Retrival-Lösung: 30 ml zehnfach konzentrierte Retrival-Stammlösung, gemischt mit 270 ml destilliertem Wasser, pH 6) für 1h bei 95°C inkubiert um die ursprünglichen Epitope Hitze-induziert zu demaskieren. Zusätzlich erfolgt eine Permeabilisierung des Gewebes durch das in der Lösung enthaltene Natriumisothiozyanat (NaSCN). Im Anschluss daran kühlten die Gewebeschnitte in dem Zitratpuffer ca. 20 min bei RT ab und wurden nach einer kurzen Überführung in destilliertes Wasser direkt für die immunhistochemische Markierungen von Reparaturfaktoren verwendet. Um unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers im Gewebe zu blockieren wurde 1h bei RT mit 5% Normalserum aus Ziegen (in PBS) geblockt. Anschließend wurden je 200 µl einer nach Herstellerangaben empfohlenen oder aus eigenen Erfahrungen ermittelten Verdünnung des primären, gegen das nachzuweisende Epitop gerichteten Antikörpers, auf die Gewebeschnitte aufgebracht und mit einem Deckglas vorsichtig bedeckt, ohne darunter Luftblasen einzuschließen. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläser entfernt und die Proben zum Entfernen ungebundener Antikörper in PBS (dreimalig, je 10 min) unter Rühren gewaschen. Nach dem Auftragen der verdünnten Lösung des fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpers inkubierten die Gewebeschnitte unter Deckgläsern 1h bei RT in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss. Auch die darauf folgenden Waschschrte (dreimalig, je 10 min) wurden im Dunkeln durchgeführt, um einen lichtinduzierten Fluoreszenzverlust zu vermeiden. Die Gegenfärbung der DNA und gleichzeitige Versiegelung der Präparate zwischen Objektträger und Deckglas wurde mit Vectashield Eindeckmedium und dem darin enthaltenen 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) durchgeführt. Die Präparate wurden lichtgeschützt bei 4°C bis zur lichtmikroskopischen Analyse gelagert.

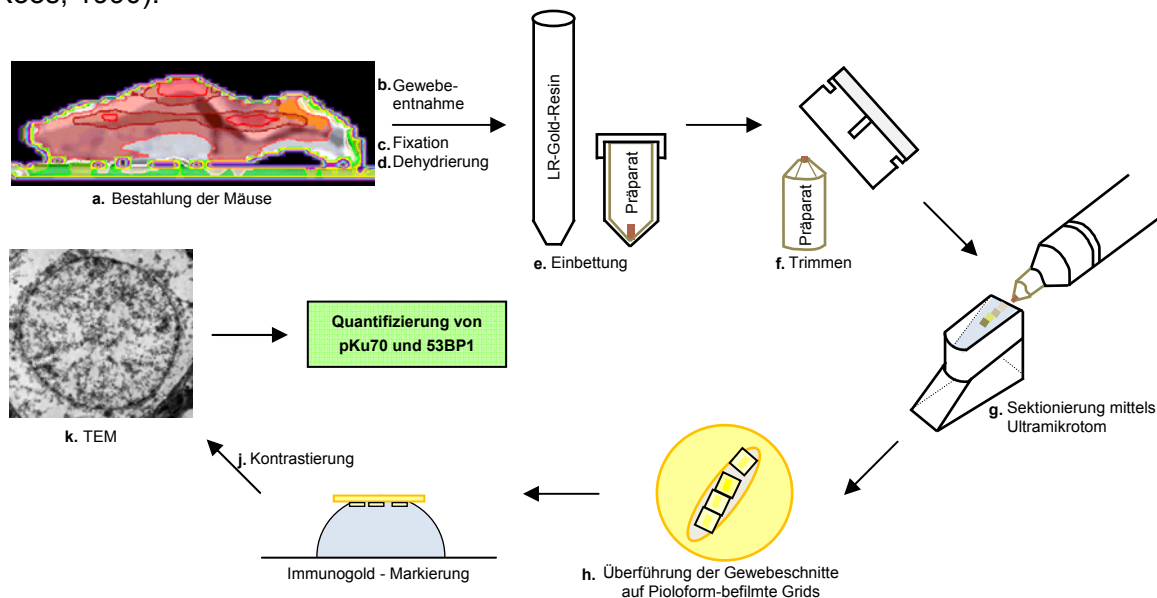
#### **4.2.4.5. Lichtmikroskopischer Nachweis unterschiedlicher Reparaturfaktoren**

Die Analyse und fotografische Dokumentation der Präparate erfolgte an einem Lichtmikroskop (Nikon, Eclipse E600) mittels der zugehörigen DS-F1-Kamera und den integrierten Filtern ND16, ND8 und ND4 für Dapi und FITC. Für Auswertung und graphische Darstellung wurde Excel (Microsoft, Version 97/2003), Origin (Version 8.0) und Photoshop (Adobe, CS4) verwendet.

#### **4.2.5. Transmissionselektronenmikroskopie**

Die elektronenmikroskopische Analyse biologischer Proben erfordert vorab unterschiedliche präparative Verfahren. Ein Hauptbestandteil von Zellen lebender Organismen ist Wasser, welches unter den Hochvakuumbedingungen des TEM bereits bei Raumtemperatur ver-

dampfen und zu einer irreversiblen Schädigung der Ultrastruktur führen würde. Dies setzt somit eine Dehydrierung des Gewebes voraus, welche jedoch zu strukturellen Veränderungen führt. Um dies wiederum zu verhindern, muss das Gewebe zunächst fixiert werden (Roos, 1990).



#### Abbildung 9: Probenvorbereitung für die Transmissionselektronenmikroskopie

Das nach der Bestrahlung (a) entnommene Gewebe (b) wurden fixiert (c), dehydriert (d) und in LR-Gold eingebettet (e). Durch Trimmen mit einer Rasierklinge (f) erhielt das Präparat die geeignete Größe und Form und wurde anschließend am Ultramikrotom in sehr dünne ( $< 90$  nm) Schnitte sektioniert (g). Diese wurden von der Wasseroberfläche auf Pioloform-befilmte Grids überführt (h) und Reparaturproteine mittels Immunogold markiert (i). Nach der Kontrastierung (j) erfolgte die transmissionselektronenmikroskopische Analyse (k) und Quantifizierung von pKu70 und 53BP1.

#### 4.2.5.1. Chemische Fixation von Geweben

Die Präparation biologischer Proben für die Elektronenmikroskopie erfordert vor dem Einbetten zur Stabilisierung der Struktur üblicherweise eine Fixierung mit Glutaraldehyd (1,5-Pentandial) und anschließend eine Kontrastierung mit Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ). Glutaraldehyd, eine sehr reaktive Verbindung, besteht aus einer Kette mit fünf C- und acht H-Atomen sowie den endständigen Aldehydgruppen, durch die eine Polymerisation und Quervernetzung mit dem Reagenz selbst und mit den terminalen Aminogruppen von Proteinen im Gewebe erfolgt.  $\text{OsO}_4$ , das Oxid des Elements Osmium, ist ein starkes Oxidationsmittel, welches durch organische Verbindungen zu einem schwarzen Oxid reduziert wird. Nach der Infiltration von Geweben reagiert es bevorzugt mit Lipiden, stabilisiert hierdurch die Zellmembranen, färbt sie schwarz und wird aufgrund dieser Eigenschaften als Kontrastmittel verwendet, um die Morphologie der Präparate besser transmissionselektronenmikroskopisch darstellen zu können.

Im Hinblick auf das Vorhaben, Reparaturproteine innerhalb intakter Zellkerne untersuchen und visualisieren zu können, ist diese gängige Methode ungeeignet, da nachzuweisende Antigene durch die Fixierung und Kontrastierung denaturiert werden und somit ein immunhistochemischer Nachweis nicht mehr möglich ist. Deshalb wurde der prozentuale Anteil des

reaktiven Glutaraldehyds durch die Verwendung von Paraformaldehyd  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  minimiert. Dieses kurzkettige Polymer des Formaldehyds zerfällt unter Energiezufuhr (Wärme) in wässriger Umgebung, wodurch in PBS eine pH-neutrale Pufferlösung hergestellt werden kann, die Proteine nicht denaturiert, aber reversibel vernetzt. Im Rahmen der Fixierung wurde kein Osmiumtetroxid verwendet, stattdessen erfolgt die Kontrastierung der Präparate im Anschluss an die Immunogold-Markierung mittels Uranylacetat (Kapitel 4.2.5.5).

Bei der chemischen Fixation ist die Diffusionsrate der Fixantien (hier: Glutaraldehyd und Paraformaldehyd) auf ca. 1 mm Dicke limitiert, wodurch nur relativ kleine Volumina fixiert werden können. Ursächlich hierfür sind Konzentrationsunterschiede, die beim Eindringen der Reagenzien entstehen, in Kombination mit einer verminderten Diffusionsgeschwindigkeit aufgrund bereits erfolgter, probeninterner Quervernetzungen. Deshalb wurde das murine Gewebe (Haut, Herz, Lunge, Niere, Dünndarm, Hoden und Cortex) nach der Entnahme von zunächst größeren Gewebeverbänden in ca. 1 mm x 1 mm x 2 mm große quaderförmige Stücke zerteilt, da ein direktes Ausschneiden solcher Quader aus unfixiertem Gewebe zu Strukturschäden (Quetschung der Zellen durch kleinvolumige Krafteinwirkung von Pinzette und Skalpell) führen kann. Anschließend wurden die Gewebequader in Glasgefäßen mit je 3 ml Fixierlösung (2,0% Paraformaldehydlösung und 0,05% Glutaraldehydlösung in PBS) bei Raumtemperatur (RT) über Nacht inkubiert.

#### **4.2.5.2. Einbettung in LR-Gold-Acrylharz**

LR-Gold wird verwendet, um nur gering vorfixiertes Gewebe bei niedrigen Temperaturen einzubetten. Die geringe Viskosität des reaktionsträgen, hydrophilen Acrylharzes ermöglicht ein schnelles Infiltrieren bei gleichzeitiger Schonung und Erhaltung fixierempfindlicher Proteine. Die Polymerisation erfolgt durch Zugabe eines lichtempfindlichen Initiators (Benzil, radikalischer Starter) und anschließender Inkubation bei  $-20^\circ\text{C}$  unter UV-Licht.

Für die Einbettung wurden 0,5 ml Reaktionsgefäße beschriftet, mit PBS gefüllt und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Für die Dehydrierung wurde 30%iges und 50%iges Ethanol ebenfalls über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gekühlt. Bei  $-20^\circ\text{C}$  wurden 50%iges, 70%iges, 80%iges, 90%iges und reines Ethanol, die Infiltrationslösungen, bestehend aus reinem Ethanol mit LR-Gold in den Verhältnissen 7:3, 5:5 und 3:7, sowie pures LR-Gold und LR-Gold mit 0,1%igem Benzil, vorgekühlt.

Am nächsten Tag wurden die Gewebeproben in die entsprechenden 0,5 ml Reaktionsgefäße mit vorgekühltem PBS überführt und 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde das PBS vorsichtig mittels einer Pasteurpipette abgesaugt, und durch 30%iges Ethanol ersetzt. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$ . Bei gleichbleibenden Inkubationsbedingungen wurde das 30%ige Ethanol durch 50%iges ersetzt. Die weitere Dehydrierung des Gewebes erfolgte mittels aufsteigender Alkoholreihe, jeweils 30 Minuten bei  $-20^\circ\text{C}$ , zunächst erneut mit 50%igem und anschließend mit 70%igem und 80%igem Ethanol. Final wurde mit 90%igem

Ethanol für 1 Stunde und dreifach für je 30 Minuten mit reinem Ethanol inkubiert. Im Anschluss daran wurde das dehydrierte Gewebe mittels der Infiltrationslösungen in LR-Gold überführt (7:3, 30 min; 5:5, 3:7 und Pures LR-Gold je 1h) und in LR-Gold mit 0,1%igem Benzil (Polymerisationslösung) bei -20°C über Nacht aufbewahrt.

Am dritten Tag, nach Erneuerung der Polymerisationslösung, wurden die Proben in einer Kältekammer bei -20°C und UV-Licht ausgehärtet.

#### **4.2.5.3. Beschichtung von Nickel-Grids mit Formvar oder Pioloform**

Um die eingebetteten Präparate im Transmissionselektronenmikroskop untersuchen zu können, müssen davon ultradünne Schnitte (85 nm) angefertigt werden (Kapitel 4.2.4.4). Als Objektträger für diese Schnitte stehen Netzträger, sogenannte Grids, aus Nickel, Kupfer, Eisen oder Gold in unterschiedlicher Größe (Durchmesser 2-3 mm) und Ausführung (mit Gitternetz oder Schlitzöffnung) kommerziell zur Verfügung. Für Gewebeproben werden üblicherweise Grids mit Gitterlinien verwendet, da diese den zu untersuchenden Proben im Vakuum des TEM zusätzliche Stabilität geben. Je dichter die Gitterlinien (Stege) zusammenliegen, umso stabiler ist das Präparat. Jedoch steigt hierdurch die Wahrscheinlichkeit, dass wichtige Informationen nicht sichtbar auf einem Steg liegen, da diese metallischen Bereiche elektronendicht sind. Für die Experimente dieser Arbeit wurden Nickel-Grids mit Schlitzöffnung (1 mm x 2 mm) verwendet um eine maximale durchstrahlbare Fläche zur Verfügung zu haben. Solche Grids müssen vor dem Aufbringen der Probe mit einer stabilen und dennoch dünnen Folie ( $\leq 30$  nm) beschichtet werden. Zur Erprobung der Stabilität und Eignung (thermische Resistenz, Hydrophobizität) wurde hierfür sowohl Pioloform als auch Formvar, beides Polyvinylbutyrale, verwendet. Beide Chemikalien wurden separat, langsam und unter ständigem Rühren in Chloroform vollständig gelöst. Die Befilmung erfolgte mit Hilfe einer Apparatur, bestehend aus einem Scheidetrichter mit Ablassventil und einem Erlenmeyerkolben als Auffanggefäß. In den Scheidetrichter wurde die jeweilige Kunststofflösung ca. 4 cm hoch eingefüllt, ein zuvor mit Kernseife gründlich gereinigter Glasobjektträger mittels Pinzette hineingestellt und anschließend die Lösung langsam und mit konstanter Geschwindigkeit abgelassen. Beim Trocknen bildet sich eine Folie auf der Oberfläche des Objektträgers, deren Dicke je nach Ablaufgeschwindigkeit 20 bis 30 nm beträgt. Unter einer Haube aus Plexiglas (Staubschutz) wurde eine pneumatische Wanne mit destilliertem Wasser gefüllt und dessen Oberfläche mit einem Glasstab abgezogen, um kleine Partikel zu entfernen. Zum Abflottieren wurde der Kunststoffilm mit einer Rasierklinge oder Ritzspitze entlang der Objektträgerkante eingeritzt und langsam in das Wasser eingetaucht. Der Film löste sich hierdurch von dem Objektträger und schwamm auf der Wasseroberfläche. Durch seitliche Beleuchtung mit einer Schreibtischlampe konnte die Filmdicke anhand der Interferenz und der daraus resultierenden Farbe abgeschätzt werden. Verwendet wurden nur Filme, die auf der Wasseroberfläche silbergrau ( $< 60$  nm) glänzten. Mit einer Pinzette wurden

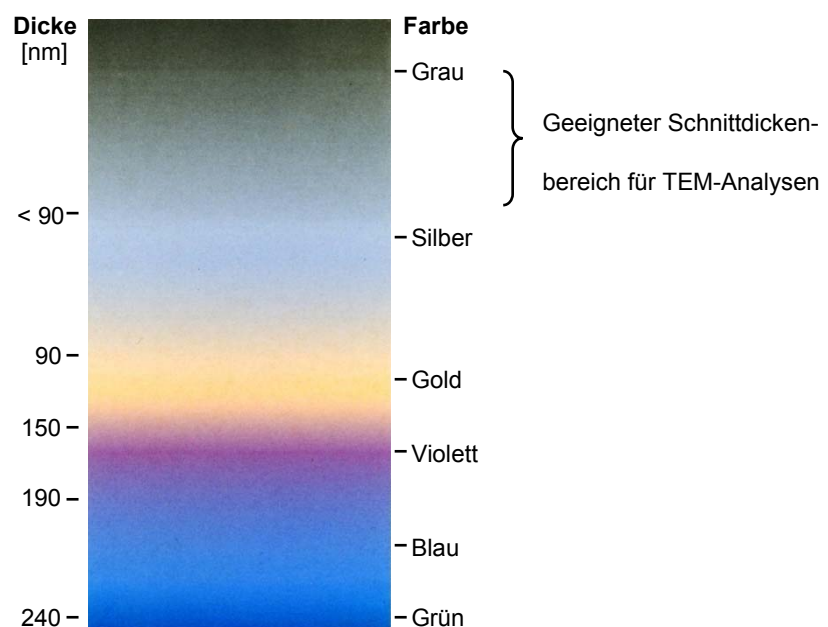


nun die Grids vorsichtig auf den Film gelegt, möglichst eng nebeneinander, aber nicht überlappend. Mit Hilfe eines Stücks Parafilmapiers wurden anschließend die befilmten Grids durch Auflegen und Herausheben von der Wasseroberfläche geborgen, zum Trocknen auf dem Papier unter eine Glasschale gelegt, anschließend in Petrischalen mittels Tesafilm befestigt und im Exsikkator aufbewahrt.

Beide Kunststofffilme, Pioloform sowie Formvar, wurden im TEM getestet. Formvar-Filme wiesen, bedingt durch kleine Löcher, eine geringere Stabilität im Vakuum auf. Deshalb wurde in allen Experimenten mit Pioloform-befilmten Nickelgrids gearbeitet.

#### 4.2.5.4. Sektionierung der Präparate mittels Ultra-Mikrotom

Um aus den eingebetteten Präparaten Ultradünnschnitte fertigen zu können, müssen die LR-Gold-Blöcke vorab getrimmt werden. Hierbei wurde unter einem Lichtmikroskop mit einer scharfen Rasiermesser Klinge randständiges LR-Gold pyramidenförmig entfernt, bis die zu schneidende Probe mittig herausgearbeitet und deren Oberfläche planar war (Abbildung 3.4). Bei einer Schnittdicke von ca. 85 nm sind andernfalls viele Leerschnitte notwendig, bis die Probe brauchbar angeschnitten ist. Zum Anschneiden wurden Glasmesser verwendet, die zuvor aus einem Glasstab erst quadratisch und dann diagonal gebrochen wurden. Die Weiterverarbeitung der Gewebeprobe zu 85 nm Ultradünnschnitten wurde im Anschluss mit einem Diamantmesser (45° Messerwinkel, Diatome AG, Biel, Schweiz) an einem Mikrotom vom Typ Ultracut (Leica, Wetzlar) durchgeführt.



**Abbildung 10: Farbskala zur Ermittlung der Schnittdicke**

Präparate müssen für die elektronenmikroskopische Analyse mittels Ultramikrotom sehr dünn (< 90 nm) sektioniert werden. Die hierbei auf einer Wasseroberfläche schwimmenden Gewebeschnitte weisen eine charakteristische Farbe auf, die zur Ermittlung der Schnittdicke anhand der Farbskala verwendet werden kann.

Eine mit Wasser gefüllte Wanne im Messerblock transportierte die fertigen Schnitte auf der Wasseroberfläche, von dort wurden die entstandenen Schnittbänder (aneinanderhaftende

Einzelnschnitte) auf die Pioloform-befilmten Grids überführt. Um die Entstehung unregelmäßig dicker oder unvollständiger Schnitte zu vermeiden, muss das Messer im richtigen Winkel zur Probe ausgerichtet sein. Ebenso muss ein Freiwinkel zwischen Messer und Präparat beachtet werden, damit das Messer nicht direkt an der Probe vorbeigleitet und die Oberfläche beschädigt.

Für die Markierung mit Immunogold wurden ausschließlich Schnitte verwendet, die auf der Wasseroberfläche silber bis hellgold glänzten, was einer Schnittdicke von 50 nm bis 90 nm entspricht (Abbildung 10). Diese ist in Summe mit der Trägerfilmdicke (ca. 30 nm) für die Elektronen durchlässig und somit für die Transmission im Elektronenmikroskop geeignet.

#### **4.2.5.5. Markierung von Reparaturfaktoren mittels Immunogold**

Der immunologische Nachweis basiert auf Antikörpern, die spezifisch an bestimmte Zellbestandteile (Reparaturfaktoren) binden. Detektiert wird ein stark elektronenstreuendes Material (Gold, Silber, Ferritin) mit definierter Partikelgröße, welches an mehrere Sekundärantikörper gekoppelt ist, abhängig von der vorhandenen Partikeloberfläche und der gegenseitigen sterischen Hinderung der Antikörper.

Doppelmarkierungen können mit Partikeln (Beads) unterschiedlicher Größe (Durchmesser: 6 nm und 10 nm) durchgeführt werden, wodurch eine Identifikation der nachzuweisenden Reparaturfaktoren anhand ihrer Substituenten möglich ist (Slater M, 1993). Diese Beads sind groß genug, um sie im Präparat gut zu visualisieren und zu separieren, jedoch klein genug, damit sie während den Waschschritten nicht durch ihren Flusswiderstand von den Bindungsstellen gelöst werden oder sich gegenseitig sterisch hindern.

Bei der hier verwendeten post-embedding Methode wird nicht das gesamte Präparat, sondern dessen Ultradünnschnitte mittels Immunogold markiert. Im Gegensatz zu der pre-embedding Methode, bei der die Kopplung der Antikörper vor der Einbettung und nur an oberflächlich zugängliche Bereiche erfolgt, sind bei der erstgenannten Methode auch Strukturen im Zellinnern zugänglich.

In dieser Arbeit wurden ultradünne Gewebeschnitte des zerebralen Cortexes analysiert, die nach der Markierung von Reparaturfaktoren mittels Immunogold (Kapitel 2.3.3.3) mit Uranylacetat kontrastiert wurden (Kapitel 4.2.5.6). Hierdurch bedingt kann Heterochromatin von euchromatischen Domänen mittels TEM visuell unterschieden und einzelne Goldpartikel (6 nm und 10 nm Durchmesser) nachgewiesen und differenziert werden. Bei den angewendeten Vergrößerungen (bis zu 86000fach) entsteht das Bild weitgehend durch den Streukontrast (Kapitel 2.3.3.2) während Effekte durch Phasenkontraste vernachlässigt werden konnten.

Die Inkubation der Gewebeschnitte auf den Grids während der Immunogold-Markierung erfolgte mit der Schnittseite nach unten in einer Feuchtekammer. Die Tropfen (30 µl) der jeweils verwendeten Reagenzien wurden auf Parafilm aufgetragen, der Transfer der Grids

erfolgte mit einer Pinzette, wobei die an den Grids anhaftenden Flüssigkeitstropfen immer wieder mit einem Einwegtuch entfernt wurden. Zunächst wurden die im Einbettmaterial vorhandenen Aldehyde durch 50 mM Glycin (20 min bei Raumtemperatur) inaktiviert und anschließend die Probenoberfläche 30 min mittels einer gebrauchsfertigen Lösung der Firma Aurion geblockt, um ladungsbedingte und unspezifische Bindungen zu minimieren. Dann wurden die Schnitte dreimal für je 5 min mit Inkubationspuffer (0,1% BSA-c in PBS, pH 7,4) gewaschen und währenddessen die primären Antikörper entsprechend mit Inkubationspuffer verdünnt. Die Inkubation der Schnitte mit Primärantikörperlösung erfolgte über Nacht bei 4°C, um eine möglichst spezifische Bindung zu gewährleisten.

Am nächsten Tag, nach weiteren sechs Waschschritten mit Inkubationspuffer für je 5 min, wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 1,5h mit goldmarkiertem Sekundärantikörper (1:30 verdünnt mit Inkubationspuffer) inkubiert und anschließend erneut sechsmal mit Inkubationspuffer und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Markierungen mit 2% Glutaraldehyd in PBS. Die Grids wurden anschließend getrocknet, in Gridboxen bei RT aufbewahrt und kurz vor der TEM-Analyse kontrastiert (Kapitel 4.2.5.6).

Die Doppelmarkierung wurde analog zu dem beschriebenen Protokoll durchgeführt, jedoch erfolgte vor dem finalen Waschschriff mit PBS und der Fixierung mit Glutaraldehyd die Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper für 1h bei 37°C. Nach sechsfachem Waschen mit Inkubationspuffer und nach der Inkubation mit dem zweiten goldmarkierten Sekundärantikörper wurde gewaschen, fixiert und kontrastiert.

#### **4.2.5.6. Kontrastierung der Präparate**

Wird eine Probe von einem fokussiertem Strahl beschleunigter Elektronen getroffen, entstehen aufgrund der Interaktionen zwischen den Primärelektronen und den Atomen, aus denen das Präparat besteht, eine Vielzahl von Wechselwirkungen (Streuung, Absorption). Hierbei steigt die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion der Primärelektronen zunehmend mit der Ordnungszahl (Größe) der Probenatome. Die Bilderzeugung im TEM erfolgt aufgrund der Transmission von Elektronen. Dies bedeutet, dass Bereiche im Präparat, in denen Primärelektronen auf ihrem Weg durch Wechselwirkung gestreut oder absorbiert wurden, dunkel (Grauabstufungen bis hin zu schwarz) dargestellt werden. Transmittierte Elektronen des Primärelektronenstrahls haben entweder keine Wechselwirkungen erfahren oder sind an der Probe elastisch/inelastisch gestreut bzw. gebeugt worden. Diese Bereiche erscheinen hell (weiß bis hellgrau) in der Bildgebung. Biologische Proben bestehen aus Elementen niedriger Ordnungszahl (C, O, N) und zeigen deshalb nur einen minimalen Kontrast im TEM. Üblicherweise werden solche Präparate vor dem Einbetten und Schneiden durch Immersion von Osmiumtetroxyd kontrastiert, jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Schnittkontrastierung durchgeführt. Hierbei flottieren die Trägernetzchen (Grids) mit den Immuno-

gold-markierten Gewebeschnitten nacheinander auf Tropfen von Uranylacetat, welches sich bevorzugt an Nukleinsäuren anlagert.

Auf die benetzten Stege in einer Feuchtekammer wurde Parafilm durch Adhäsion befestigt. Entsprechend der Anzahl der zu kontrastierenden Präparate wurden Tropfenreihen (30 µl pro Tropfen) aus Uranylacetatlösung (UA, Merck) und destilliertem Wasser auf den Parafilm pipettiert. Zunächst wurden die Grids (Gewebe nach unten) 2 bis 5 Minuten (abhängig vom Gewebe und der Schnittdicke) bei Raumtemperatur auf UA inkubiert und anschließend kurz auf dem Wasser geschwenkt. Anhaftende Flüssigkeit wurde mit einem Einwegtuch entfernt und die kontrastierten Präparate in einer Gridbox aufbewahrt.

#### **4.2.5.7. TEM-Analyse Immunogold-markierter Reparaturfaktoren**

Die TEM Analysen wurden an einem Tecnai G<sup>2</sup> Biotwin der Firma FEI durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einer Kamera der Firma Gatan (Mega View II) dokumentiert, der Transfer in ein PC-kompatibles Format erfolgte durch die Software Analysis, Version 3.1.

## 5. Ergebnisse

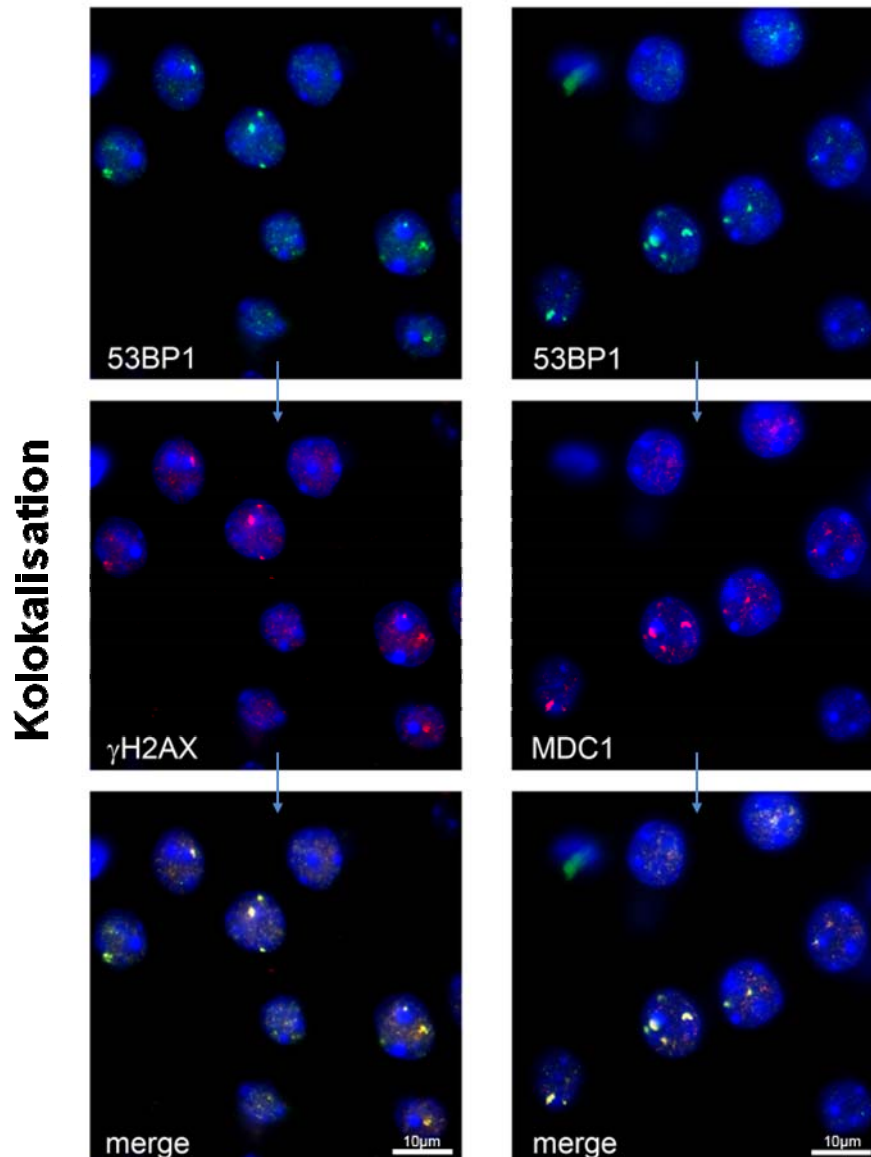
Für die Etablierung und Optimierung der TEM-Methode wurde ein überwiegender Teil der zur Verfügung stehenden Arbeitszeit verwendet. Hierbei wurden unterschiedliche Protokolle erprobt, um ladungsbedingte und somit unspezifische Bindungen der Goldpartikel an die Kunststoffmembranen der Nickelgrids zu minimieren und um die Spezifität der Antikörper gegenüber den nachzuweisenden Proteinen zu erhöhen. Geeignete Einbettmedien wurden getestet, um eine Fixierung des Gewebes unter Erhalt der Epitopzugänglichkeit für die immunologische Markierung durchführen zu können, da hierdurch die zeitnahe Asservierung von Proben direkt nach der Bestrahlung zu verwirklichen war. Die Anfertigung ultradünner Gewebeschnitte (85 nm), das faltenfreie Aufbringen dieser Schnitte auf die Trägermembran und die anschließende Handhabung im Rahmen der Markierung von Reparaturfaktoren musste gelernt und immer wieder optimiert werden, um Verluste möglichst gering zu halten. Es wurden mehrere Protokolle zur Immunogold-Markierung erprobt und durch Optimierung der eingesetzten Reagenzien, der Inkubationszeiten und/oder der Waschprozeduren letztendlich ein geeignetes Protokoll etabliert (Kapitel 4.2.4.5). Anschließend wurde zur Evaluierung zunächst 53BP1 elektronenmikroskopisch analysiert, da innerhalb der Arbeitsgruppe bereits erste Daten bezüglich dessen Reparaturkinetik und Kolo-kalisation mit anderen Reparaturfaktoren mittels IFM erhoben wurden und diese für einen Vergleich zur Verfügung standen. Erst anschließend wurde pKu70, als nicht-focibildendes und zentrales Protein des NHEJ, untersucht und die Induktion und Reparaturkinetik im Kontext des Chromatins erfasst. Im Folgenden wird zunächst auf die Untersuchungsergebnisse der Foci-Analyse (IFM, Kapitel 5.1) und der elektronenmikroskopischen Untersuchungen (TEM, Kapitel 5.2.1) für 53BP1 in den kortikalen Neuronen von Mäusen eingegangen. Die Ergebnisse für pKu70 werden anschließend in separaten Kapiteln dargestellt (Kapitel 5.2.2).

### 5.1. Foci-Analyse zur Untersuchung von 53BP1 mittels Immunfluoreszenz-mikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Experimente in Neuronen des zerebralen Cortex durchgeführt, da in diesen ausdifferenzierten und nicht proliferierenden Zellen DSBs dominierend über NHEJ repariert werden und die kugelförmigen Zellkerne eine zuverlässige Quantifizierung der Foci ermöglichen. Um die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Nachweismethode vergleichend analysieren zu können, wurde die gleiche Region des zerebralen Cortex protokollspezifisch für die Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) sowie für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) eingebettet. Zuerst wurde die Kolo-kalisation unterschiedlicher Reparaturfaktoren sowie die Induktion und Reparatur von 53BP1 mittels IFM untersucht.

### 5.1.1. Überprüfung auf Kolo-kalisation von 53BP1 mit $\gamma$ H2AX oder MDC1

C57Bl6-Mäuse wurden mit 2 Gy bestrahlt und das Hirngewebe an definierten Zeitpunkten (30 min, 5h und 24h) entnommen, fixiert und prozessiert (Kapitel 4.2.3). In einer Doppelfärbung erfolgte die Markierung von 53BP1 (grün) und  $\gamma$ H2AX oder MDC1 (beide rot) mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Zusätzlich wurde die DNA mit DAPI angefärbt (blau), um die Zellkerne sichtbar zu machen. Kompakte heterochromatische Domänen sind hierbei durch ein intensives DAPI-Signal in diesem Bereich zu erkennen.



**Abbildung 11: Kolo-kalisation strahleninduzierter Foci in der Immunfluoreszenz**

Doppelfärbung von 53BP1 (grün) und  $\gamma$ H2AX oder MDC1 (beide rot) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) des zerebralen Cortex von Mäusen, 5 Stunden nach der Bestrahlung mit 2 Gy (600fache Vergrößerung). 53BP1 kolo-kalisiert sowohl mit  $\gamma$ H2AX (linke Spalte) als auch mit MDC1 (rechte Spalte).

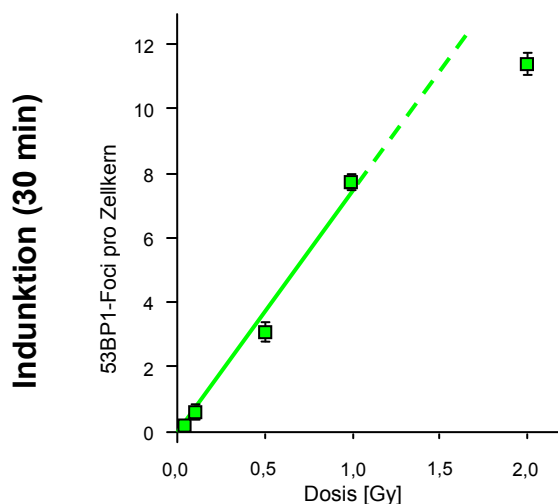
In Abbildung 11 sind repräsentative Aufnahmen von einer Färbung dargestellt, die 5 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy erfolgte. In den oberen Bildern beider Spalten sind 53BP1-Foci (grün) in DAPI-gefärbten Zellkernen gut zu erkennen. Unter Verwendung geeigneter Filter (Nikon, ND16, ND8 und ND4) sind  $\gamma$ H2AX- (linke Spalte) und MDC1-Foci (rechte Spalte) der

Doppelfärbungen nachweisbar (beide rot). Ohne Filter überlagern sich die Fluoreszenzen der verwendeten Substituenten, wodurch kolokalisierende Foci anhand der gelben Mischfarbe eindeutig zu erkennen sind.

### 5.1.2. Untersuchung zur dosisabhängigen Induktion von DSBs durch numerische Erfassung der 53BP1-Foci

Als Induktion wird die Anzahl an DSBs verstanden, die abhängig von der applizierten Dosis und zu einem möglichst frühen Zeitpunkt nach der Bestrahlung als Foci nachweisbar sind. Jedoch benötigen die Zellen, aufgrund der ablaufenden biochemischen Prozesse, zur Ausbildung fluoreszenzmikroskopisch gut sichtbarer Foci ein Zeitintervall zwischen Bestrahlung und Fixierung des Gewebes. In dieser Zeit akkumuliert eine Vielzahl unterschiedlicher Reparaturfaktoren im direkten Umfeld der DNA-Läsionen, wobei die Häufigkeit des nachzuweisenden Proteins bei der anschließenden Markierung die Intensität des Fluoreszenzsignals mitbestimmt.

Zur Ermittlung der dosisabhängigen Induktion von 53BP1 wurden C57Bl6-Mäuse mit 100 mGy, 500 mGy, 1 Gy und 2 Gy bestrahlt. Die Entnahme der Hirngewebe erfolgte für alle Proben nach 30 Minuten Reparaturzeit. Als Kontrollproben wurde zusätzlich das Gewebe unbestrahlter Mäuse eingebettet. Diese Proben geben Aufschluss über die Anzahl an Foci, welche nicht auf die Strahlung zurückzuführen sind, sondern auf DNA-Läsionen die beispielsweise durch freie Radikale induziert werden, die während intrazellulärer Stoffwechselprozesse entstehen.



**Tabelle 1:** 53BP1-Induktion (30 min); gezählte Foci pro Zellkern

Dosis [Gy]	Anzahl [Foci/Zellkern]	Standardfehler
0,0	0,08	0,01
0,1	0,55	0,08
0,5	3,06	0,14
1,0	7,69	0,09
2,0	11,35	0,13

#### Abbildung 12: Induktion strahleninduzierter 53BP1-Foci

Die Anzahl strahleninduzierter Doppelstrangbrüche wurde durch das Zählen von 53BP1-Foci pro Zellkern, 30 Minuten nach der Applikation unterschiedlicher Dosen zwischen 100 mGy und 2 Gy bestimmt. Es besteht eine Abhängigkeit zwischen der Induktion von DSBs und der applizierten Dosis mit einer linearen Korrelation zwischen 100 mGy und 1 Gy.

Nach der immunologischen Markierung von 53BP1 mittels spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden die Foci lichtmikroskopisch in jeweils 50 Zellkernen pro Probe und jeweils drei Mäusen pro Dosis mit 60facher Vergrößerung gezählt. Aus diesen gezählten

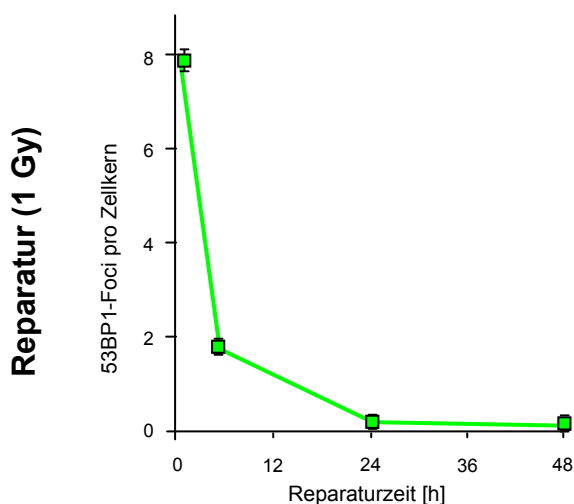
Werten wurde pro Dosis der arithmetische Mittelwert gebildet und graphisch dargestellt. Hierdurch konnte eine lineare Dosiskorrelation von 100 mGy (0,55 Foci/Zellkern) bis 1 Gy (7,69 Foci/Zellkern) nachgewiesen werden (Abbildung 12). Mit weiter steigender Dosis (> 1 Gy) verliert sich jedoch die Linearität zwischen gezählten Foci und zunehmender Dosis, da die Fluoreszenz räumlich naher Foci, aufgrund der mikroskopischen Auflösungsgrenze, nicht eindeutig separiert werden kann. Diese Signalüberlagerung führt zu einer Unterschätzung der vorhandenen Foci-Anzahl.

Die Korrelation zwischen vorhandenen Foci und applizierter Dosis bis 1 Gy belegt, dass die Anzahl gezählter Foci Rückschlüsse bezüglich der Menge induzierter DSBs ermöglicht.

### 5.1.3. Bestimmung der DSB-Reparaturkinetik anhand der 53BP1-Foci-Abnahme

Durch die numerische Erfassung strahleninduzierter Foci zu definierten Zeiten nach der Bestrahlung kann die Reparaturkapazität von Zellen untersucht werden. Hierbei wird nach der Applikation einer festgelegten Dosis die Abnahme der mikroskopisch sichtbaren Foci über die Zeit bestimmt (Reparaturkinetik).

Zur Erfassung der Reparaturkinetik wurden drei C57Bl6-Mäuse pro Reparaturzeit mit 1 Gy bestrahlt. Das Hirngewebe wurde jeweils nach 30 min, 5h, 24h und 48h entnommen, fixiert und eingebettet. Die Reparaturkinetik ergab eine abnehmende Anzahl an 53BP1-Foci, ausgehend von 7,91 Foci pro Zellkern nach 30 min Reparaturzeit bis zu 0,09 verbleibenden Foci 48 h nach der Bestrahlung (Abbildung 13).



**Tabelle 2:** 53BP1-Reparaturkinetik (1 Gy); gezählte Foci pro Zellkern

Zeit [h]	Anzahl [Foci/Zellkern]	Standardfehler
0,5	7,91	0,13
5,0	1,78	0,04
24	0,15	0,01
48	0,09	0,01

#### Abbildung 13: Reparaturkinetik anhand der 53BP1-Foci-Abnahme

Nach der Bestrahlung mit 1 Gy wurden in je 50 Zellkernen bei 3 Tieren pro Zeitpunkt 53BP1-Foci nach 0,5h, 5h, 24h und 48h Reparaturzeit lichtmikroskopisch gezählt. Die Kinetik, ermittelt aus den jeweiligen Mittelwerten pro Zeitpunkt, ergab eine abnehmende Foci-Anzahl mit zunehmender Reparaturzeit.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den in unterschiedlichen Zellen und verschiedenen Geweben ermittelten Reparaturkinetiken bereits publizierter Daten der Arbeitsgruppe.



## **5.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von DSB-Reparaturfaktoren**

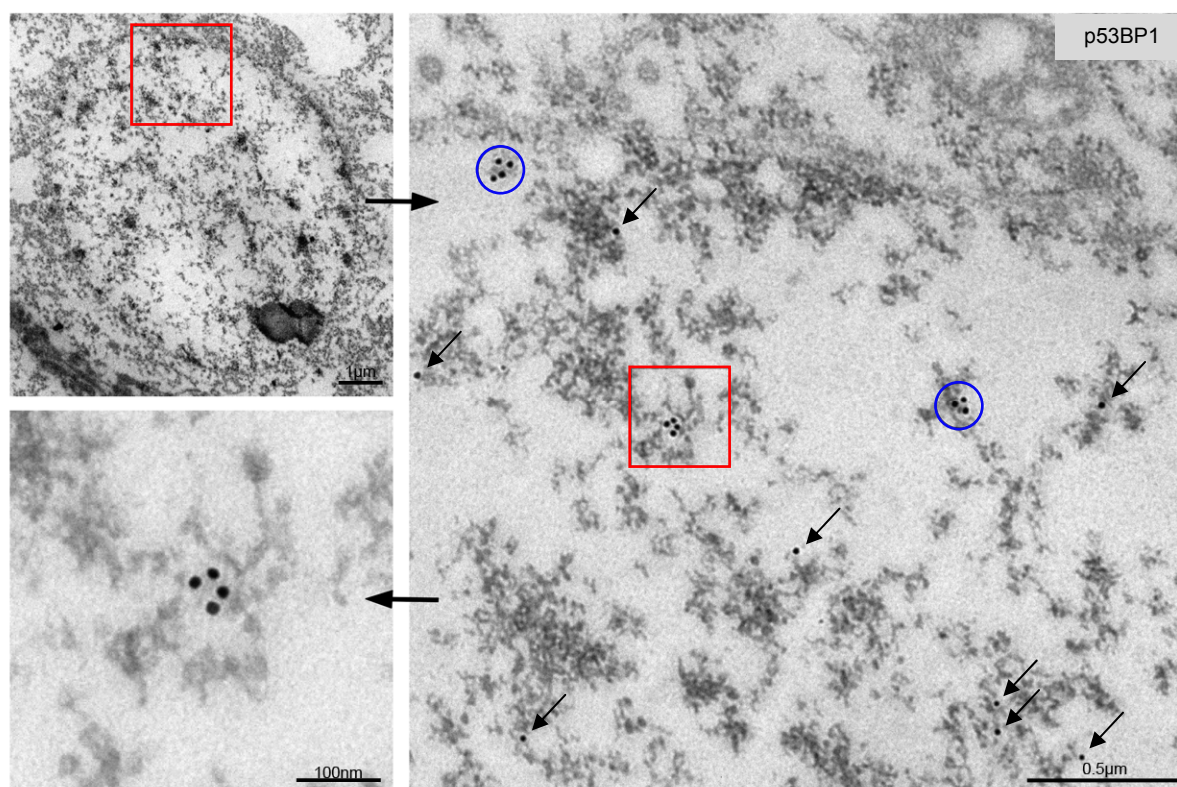
Im Verlaufe der Signaltransduktionskaskade akkumuliert eine Vielzahl unterschiedlicher Reparaturfaktoren im direkten Umfeld strahleninduzierter DSBs. Unter ihnen 53BP1, MDC1 und die phosphorylierte Form der Histonvariante H2AX. In den bereits dargestellten Experimenten wurde mittels IFM nachgewiesen, dass 53BP1 mit  $\gamma$ H2AX und MDC1 kolokalisiert (Kapitel 5.1.1.), dass bis zu einer Grenzdosis von 1 Gy eine lineare Abhängigkeit zwischen applizierter Dosis und 53BP1-Induktion besteht (Kapitel 5.1.2.) und dass sich die Anzahl nachweisbarer Foci mit zunehmender Reparaturzeit vermindert (Kapitel 5.1.3.). Ausgehend von diesen Ergebnissen erfolgte die Übertragung auf die Elektronenmikroskopie.

### **5.2.1. Untersuchung von Reparaturproteinen, die im Umfeld strahleninduzierter Doppelstrangbrüche akkumulieren**

#### **5.2.1.1. Nachweis von 53BP1 im Kontext der Chromatinstruktur**

In ersten TEM-Experimenten wurde der gleiche primäre Antikörper verwendet wie zuvor in der Immunfluoreszenz, jedoch in Kombination mit goldmarkierten Sekundärantikörpern. Das als Marker verwendete kolloidale Gold kann durch seine definierte Partikelgröße, die diskrete Form und durch die Dichte elektronenmikroskopisch eindeutig detektiert und quantifiziert werden. Pro Goldpartikel (Bead) sind mehrere Sekundärantikörper (sek. AK) an die Oberfläche gekoppelt (siehe Anhang, Abbildung 1), wobei die Anzahl der sek. AK pro Bead von der Goldpartikelgröße und der hierdurch zur Verfügung stehenden Oberfläche sowie von der gegenseitigen sterischen Hinderung abhängig ist.

Die Markierung von 53BP1 erfolgte in Neuronen des cerebralen Cortexes von C57Bl6-Mäusen, 30 Minuten nach der Bestrahlung mit 6 Gy. Die runden Zellkerne waren innerhalb des übrigen Gewebes elektronenmikroskopisch bereits bei 1250facher Vergrößerung gut darstellbar, da die Nukleinsäuren vorab mittels Uranylacetat und Methylcellulose zusätzlich kontrastiert wurden. Hetero- und Euchromatin, Nucleoli, die Kernmembran sowie das angrenzende endoplasmatische Retikulum konnten deutlich visualisiert werden, was strukturverändernde Schäden im Verlauf der Einbettungsprozedur ausschließt. Bei höherer Vergrößerung (49000fach) konnten einzelne Goldbeads im gesamten Zellkern, in hetero- und euchromatischen Domänen sowie im Karyoplasma, detektiert werden (Abbildung 14, schwarze Pfeile). Hingegen waren lokal begrenzte Ansammlungen von 3 bis 5 Goldbeads (Cluster) ausschließlich in heterochromatischen Bereichen nachweisbar (Abbildung 14). Um die Bedeutung dieser neuen Einblicke besser erfassen zu können, wurde im Folgenden überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen applizierter Dosis und der Induktion von 53BP1-Clustern und -Einzelbeads besteht.



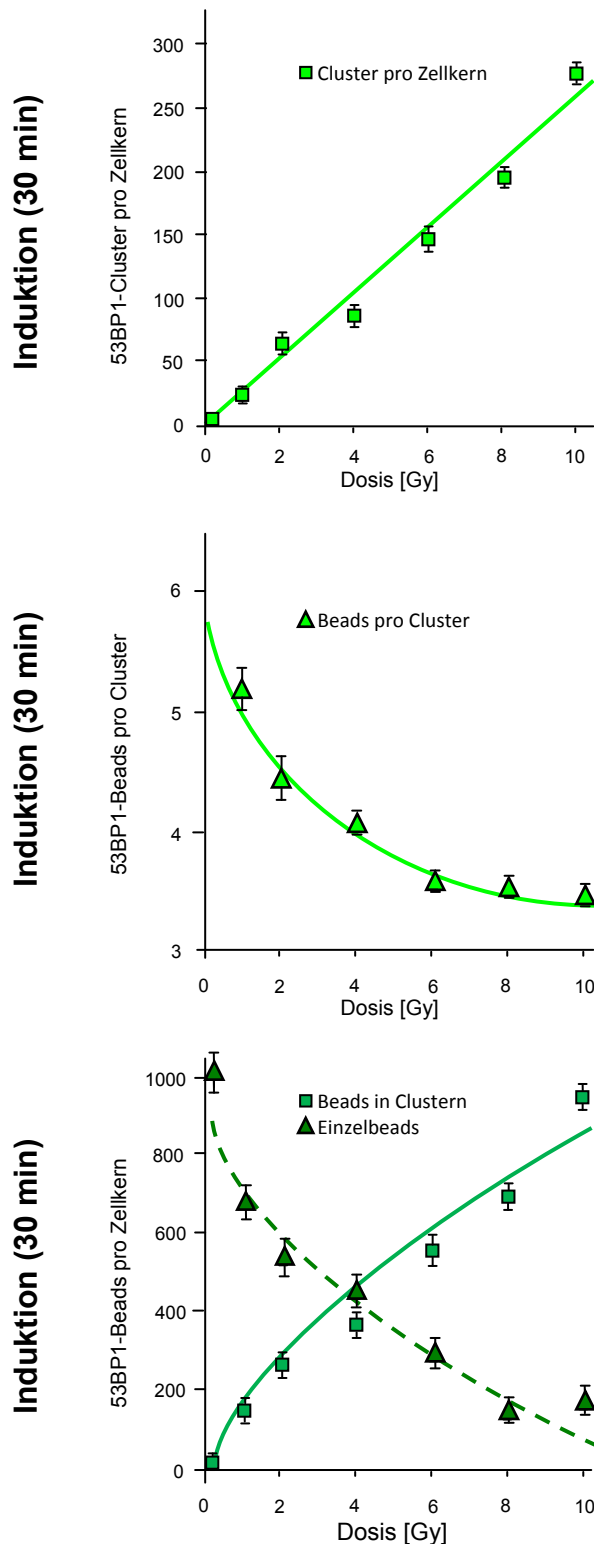
**Abbildung 14: Elektronenmikroskopischer Nachweis von goldmarkiertem 53BP1**

Antikörpervermittelte Goldmarkierung von 53BP1 in corticalen Neuronen von Mäusen, analysiert mittels TEM.

(a) Übersichtsaufnahme eines Zellkerns in 4200facher Vergrößerung. Der eingerahmte Bereich ist mit zunehmender Vergrößerung im nächsten Bild dargestellt. (b) Während Einzelbeads innerhalb des gesamten Nukleoplasmas nachweisbar waren, sind abgegrenzte Cluster, bestehend aus 3 bis 5 Goldbeads, ausschließlich im Heterochromatin lokalisiert (43000fache Vergrößerung). (c) Großaufnahme (60000fach) eines 53BP1-Clusters, bestehend aus 4 Goldbeads.

### 5.2.1.2. Bestimmung der 53BP1-Induktion durch quantitative Erfassung von Clustern und Einzelbeads

Die Induktion von 53BP1 wurde nach der Applikation von 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy und 10 Gy, jeweils 30 Minuten nach der Bestrahlung, numerisch erfasst. Hierzu wurden pro Dosis in 50 Zellkernanschnitten die Einzelbeads sowie die Cluster gezählt und auch die Anzahl an Beads ermittelt, die zusammen ein Cluster bilden. Zuerst wurde von dem jeweiligen Zellkernanschnitt in 4200facher Vergrößerung eine Übersichtsaufnahme angefertigt und anschließend der vertikale und horizontale Durchmesser mittels der Software „Analysis“ bestimmt. Die Zählungen erfolgten manuell per Auge bei 60000facher Vergrößerung für hetero- und euchromatische Bereiche durch Abrastern der gesamten Zellkernfläche. Berücksichtigt wurden ausschließlich runde Zellkerne mit möglichst maximalem Durchmesser (7 µm bis 9 µm), da die Gesamtzahl an Einzelbeads und Clustern pro Zellkern durch Extrapolation ermittelt wurde. Hierzu wurde für jeden Zellkernanschnitt der Mittelwert aus dem vertikalen und horizontalen Durchmesser gebildet, die Kreisfläche errechnet und das Volumen des Zellkernanschnitts anhand der Schnittdicke (85 nm) bestimmt. Ausgehend von dem prozentualen Anteil, das dieses Volumen vom gesamten Zellkern einnimmt, erfolgte die Hochrechnung unter Annahme eines kugelförmigen Zellkerns.

**Tabelle 3:** 53BP1-Induktion (30 min); gezählte Cluster pro Zellkern

Dosis [Gy]	Anzahl [Cluster/Zellkern]	Standardfehler
Kontr.	0,46	-
1	26,11	3,74
2	63,56	6,42
4	86,58	6,42
6	145,49	8,92
8	196,37	6,57
10	277,51	7,05

**Tabelle 4:** 53BP1-Induktion (30 min); gezählte Beads pro Cluster

Dosis [Gy]	Anzahl [Beads/Cluster]	Standardfehler
Kontr.	-	-
1	5,20	0,17
2	4,44	0,19
4	4,07	0,09
6	3,57	0,07
8	3,54	0,06
10	3,47	0,04

**Tabelle 5:** 53BP1-Induktion (30 min); gezählte Beads pro Zellkern

Dosis [Gy]	Summe pro Zellkern [■/▲]	Standardfehler [■/▲]
Kontr.	1,31 / 1016,62	1,31 / 35,38
1	148,18 / 682,25	20,51 / 22,06
2	265,42 / 538,06	27,66 / 22,18
4	365,26 / 453,90	26,86 / 15,32
6	551,30 / 298,70	34,98 / 11,52
8	691,43 / 147,49	27,14 / 6,13
10	954,26 / 172,10	27,54 / 8,53

**Abbildung 15: Induktion von 53BP1**

Quantifizierung von 53BP1 Clustern und Einzelbeads pro Zellkern, 30 min nach der Bestrahlung mit Dosen von 1 Gy bis 10 Gy. Die Induktion von 53BP1-Clustern ist abhängig von der applizierten Dosis mit einer linearen Korrelation zwischen 1 Gy und 10 Gy (obere Grafik). Die Beads pro Cluster verminderten sich mit steigender Dosis (mittlere Grafik). Die Gesamtsumme an Beads, die pro Zellkern in Clustern gebunden vorliegt, steigt mit der Dosis an, während sich die Gesamtzahl an Einzelbeads pro Zellkern vermindert (untere Grafik). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die 53BP1-Cluster im direkten Umfeld der DNA-Schäden durch die Rekrutierung von nicht-aktivierten 53BP1 aus dem Nucleoplasma bilden.

Aus den ermittelten Werten für die Cluster/Zellkern, die Beads/Cluster und die Clusterbeads/Zellkern im Vergleich zu den Einzelbeads/Zellkern wurde für die jeweilige Dosis der Mittelwert und Standardfehler bestimmt und graphisch dargestellt.

Die Induktion von 53BP1 war eindeutig von der Bestrahlungsdosis mit einer linearen Korrelation von 1 Gy ( $\approx 26$  Cluster/Zellkern) bis 10 Gy ( $\approx 277$  Cluster/Zellkern) (Abbildung 15, obere Grafik) abhängig. Hingegen vermindert sich die Anzahl an Beads, die zusammen ein Cluster bilden, mit steigender Dosis von  $\approx 5,2$  Beads/Cluster bei 1 Gy auf  $\approx 3,5$  Beads/Cluster bei 10 Gy (Abbildung 15, mittlere Grafik).

Die Gesamtsumme aller Beads, die in Clustern gebunden vorliegen, steigt mit der Dosis von  $\approx 148$  Clusterbeads/Zellkern (1 Gy) auf  $\approx 954$  Clusterbeads/Zellkern (10 Gy), während die Gesamtsumme der Einzelbeads von  $\approx 682$  Beads/Zellkern (1 Gy) auf  $\approx 172$  Beads/Zellkern (10 Gy) absinkt (Abbildung 15, untere Grafik). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der verwendete Primärantikörper sowohl die nicht-aktivierte Form von 53BP1 (Einzelbeads) als auch phosphoryliertes und hierdurch aktiviertes p53BP1 (Cluster) detektiert. Dies bedeutet möglicherweise und ausgehend von den hier gewonnenen Erkenntnissen, dass die Cluster durch Rekrutierung von nicht-aktiviertem 53BP1 gebildet werden und nur die Cluster und nicht die Einzelbeads strahleninduzierte Doppelstrangbrüche markieren.

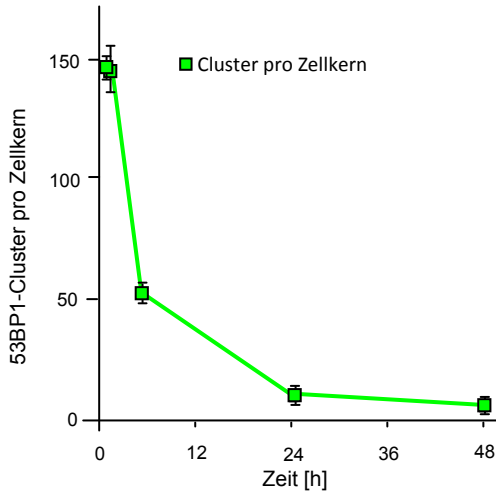
Um diese Vermutung zu belegen, wurde ein Primärantikörper gegen die phosphorylierte Form von 53BP1 (p53BP1, phosphoryliert am Serin 25) verwendet. Elektronenmikroskopisch waren anschließend nur noch die Cluster in den heterochromatischen Domänen nachweisbar, jedoch keine Einzelbeads mehr im Nucleoplasma.

### **5.2.1.3. Bestimmung der 53BP1-Reparaturkinetik anhand der Abnahme von Clustern und Einzelbeads über die Zeit**

An definierten Zeitpunkten (0,16h; 0,5h; 5h; 24h und 48h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy wurden, entsprechend der bereits beschriebenen Vorgehensweise (Kapitel 5.2.1.1), 53BP1-Cluster und Einzelbeads gezählt, sowie die Anzahl an Beads ermittelt, die zusammen ein Cluster bilden. Eine annähernd gleiche Anzahl an Clustern pro Zellkern wurde nach 0,16h ( $\approx 148$  Cluster/Zellkern) und 0,5h ( $\approx 145$  Cluster/Zellkern) erfasst (Abbildung 16, obere Grafik). Anschließend verminderte sich mit fortschreitender Reparaturzeit die Anzahl an 53BP1-Clustern pro Zellkern mit einem ähnlichen Verlauf der zuvor mittels IFM gezeigten Kinetik. Während nach 5h noch  $\approx 34\%$  ( $\approx 51$  Cluster/Zellkern) der ursprünglich vorhandenen Cluster nachweisbar waren, reduzierte sich deren Anzahl weiter auf  $\approx 6\%$  nach 24 h ( $\approx 9$  Cluster/Zellkern) und  $\approx 5\%$  nach 48h ( $\approx 7$  Cluster/Zellkern).

Die Anzahl an Beads, die gemeinsam ein Cluster bilden, erhöhte sich im Verlaufe der Reparaturzeit von  $\approx 4$  Beads/Cluster nach 0,16h Reparaturzeit auf  $\approx 6$  Beads/Cluster nach 24h, übereinstimmend mit der zuvor mittels IFM beobachteten zeitabhängigen Größenzunahme strahleninduzierter Foci.

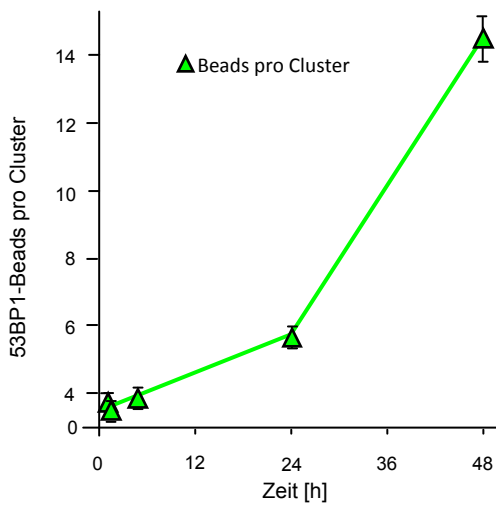
Reparatur (6 Gy)



**Tabelle 6:** 53BP1-Reparaturkinetik (6 Gy); gezählte Cluster pro Zellkern

Zeit [h]	Anzahl [Cluster/Zellkern]	Standardfehler
Kontr.	0,47	0,47
0,16	148,33	5,64
0,5	145,49	8,92
5	51,18	3,87
24	9,30	2,40
48	7,48	2,90

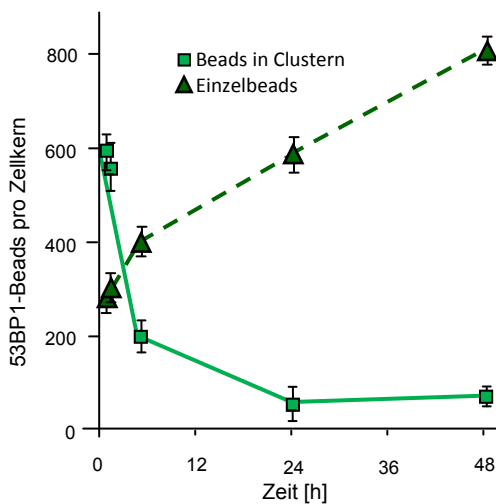
Reparatur (6 Gy)



**Tabelle 7:** 53BP1-Reparaturkinetik (6 Gy); gezählte Beads pro Cluster

Zeit [h]	Anzahl [Beads/Cluster]	Standardfehler
Kontr.	0,58	0,58
0,16	3,98	0,06
0,5	3,57	0,07
5	3,94	0,12
24	5,71	0,38
48	15,33	2,78

Reparatur (6 Gy)



**Tabelle 8:** 53BP1-Reparaturkinetik (6 Gy); gezählte Beads pro Zellkern

Zeit [h]	Summe pro Zellkern [■ ▲ ]	Standardfehler [■ ▲ ]
Kontr.	1,31 / 1016,62	1,31 / 35,38
0,16	590,87 / 282,90	23,45 / 11,63
0,5	551,30 / 298,70	34,98 / 11,52
5	202,14 / 396,84	14,37 / 9,25
24	54,98 / 588,58	15,31 / 15,94
48	62,35 / 803,57	1,72 / 12,04

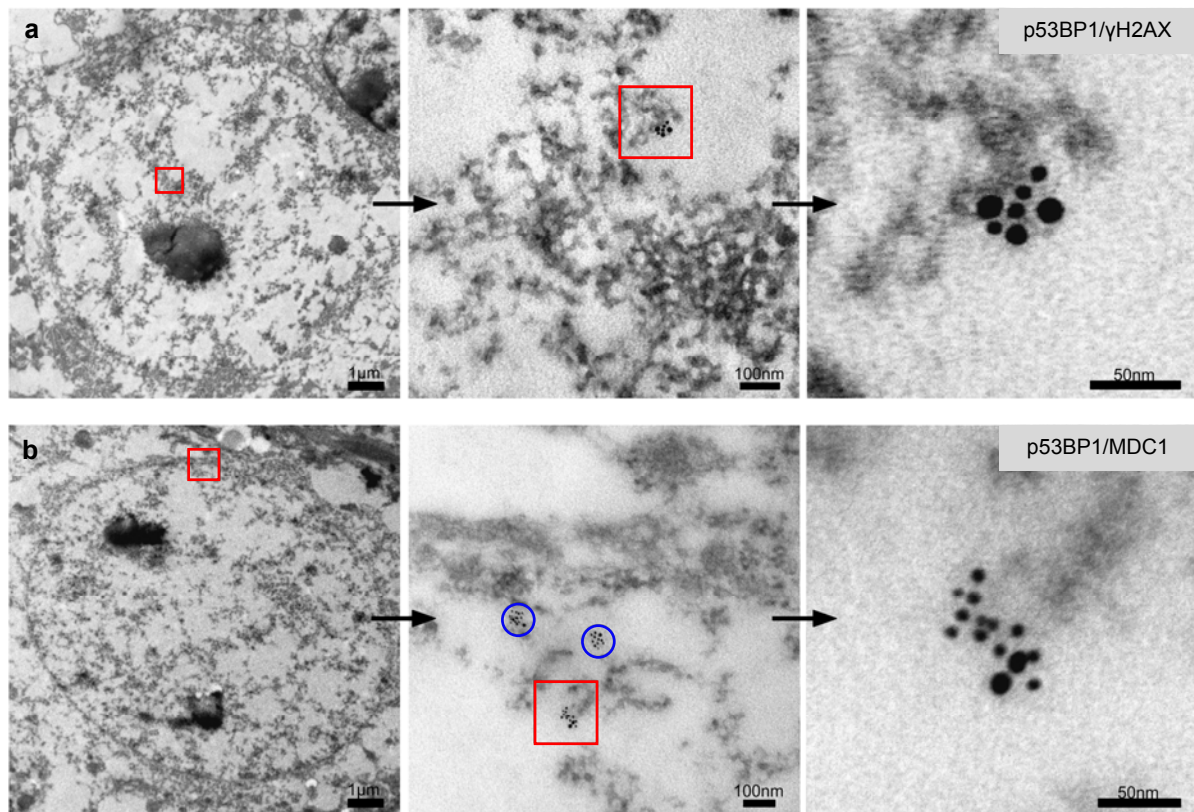
**Abbildung 16: Reparaturkinetik von 53BP1**

Numerische Erfassung von 53BP1-Clustern und Einzelbeads pro Zellkern, 0,16h, 0,5h, 5h, 24h und 48h nach der Bestrahlung mit 6 Gy. Abhängig von der Reparaturzeit vermindert sich die Anzahl an 53BP1-Clustern (obere Grafik) mit einer zuvor mittels IFM nachgewiesenen, ähnlichen Kinetik. Die Anzahl an Beads, die ein Cluster bilden, erhöht sich mit fortschreitender Reparaturzeit (mittlere Grafik). Diese Beobachtung stimmt mit der zuvor mittels IFM ermittelten zeitabhängigen Größenzunahme strahleninduzierter Foci überein. Während sich die Gesamtsumme der clustergebundenen Beads pro Zellkern mit zunehmender Reparaturzeit verringert, erhöht sich die Gesamtsumme an Einzelbeads innerhalb des gleichen Zeitintervalls (untere Grafik). Verursacht wird dies vermutlich aufgrund einer erneuten Umverteilung von 53BP1, ausgehend von der aktivierten (phosphorylierten) Form in den Clustern, zurück als nicht-aktivierter Faktor innerhalb des Nucleoplasmas.

Darüber hinaus konnte nach 48h für die verbleibenden Cluster eine erhöhte Anzahl an Beads ( $\approx 15$  Beads/Cluster) beobachtet werden (Abbildung 16, mittlere Grafik). Während sich die Gesamtsumme der in Clustern gebundener Beads pro Zellkern von  $\approx 590$  Clusterbeads/Zellkern (0,16h) auf  $\approx 62$  Clusterbeads/Zellkern (48h) reduzierte, erhöhte sich innerhalb des gleichen Zeitintervalls die Gesamtsumme an Einzelbeads im Nucleoplasma des Zellkerns von  $\approx 282$  Einzelbeads/Zellkern (0,16h) auf  $\approx 803$  Einzelbeads/Zellkern (48h) (Abbildung 16, untere Grafik), vermutlich aufgrund einer erneuten Umverteilung von 53BP1, ausgehend von der aktivierten (phosphorylierten) Form in den Clustern, zurück als nicht-aktivierter Faktor innerhalb des Nucleoplasmas.

#### 5.2.1.4. Kolokalisation von p53BP1 mit $\gamma$ H2AX oder MDC1

Eine der ersten Chromatinmodifikationen im Umfeld von Doppelstrangbrüchen, die phosphorylierte Form der Histonvariante H2AX ( $\gamma$ H2AX), fungiert als Basis zur Rekrutierung einer Vielzahl unterschiedlicher Reparaturfaktoren, unter ihnen auch MDC1 und 53BP1.



**Abbildung 17: Kolokalisation von p53BP1 mit  $\gamma$ H2AX und MDC1**

Durch die Verwendung unterschiedlicher Sekundärantikörper, gekoppelt an Goldbeads mit 6 nm bzw. 10 nm Durchmesser, können unterschiedliche Reparaturfaktoren innerhalb einer Doppelmarkierung anhand der Größe ihrer Substituenten identifiziert werden. Eingerahmte Bereiche der hier gezeigten, repräsentativen TEM-Bilder (6 Gy, 30 min) sind, mit zunehmender Vergrößerung, im nächsten Bild erneut zu sehen. a) Doppelmarkierung von p53BP1 (10 nm) und  $\gamma$ H2AX (6 nm). In heterochromatischen Domänen konnte  $\gamma$ H2AX als Kette, bestehend aus 3 bis 7 Goldbeads, nachgewiesen werden. p53BP1 kolokalisiert mit  $\gamma$ H2AX und bildet Cluster aus 3 bis 6 Goldbeads um die  $\gamma$ H2AX-Kette. b) Doppelmarkierung von p53BP1 (10 nm) und MDC1 (6 nm). MDC1 bildet kettenähnliche Cluster aus 5 bis 15 Goldbeads in heterochromatischen Domänen, die mit p53BP1 kolokalisieren.

Mittels der Immunfluoreszenz wurde bereits eine Kolokalisation von 53BP1 mit  $\gamma$ H2AX und MDC1 nachgewiesen. Die lichtmikroskopische Auflösungsgrenze erlaubt jedoch eine nur

ungenügende Ortsauflösung. Hierdurch bedingt und aufgrund der räumlichen Ausdehnung der sichtbaren Fluoreszenz des Substituenten besteht möglicherweise dennoch eine Distanz zwischen visuell kolokalisierenden Reparaturfaktoren. Um diese Fragestellung zu beantworten und um die Anordnung unterschiedlicher Reparaturkomplexe im Umfeld von DSBs zu untersuchen, wurde die Doppelmarkierung von p53BP1 mit  $\gamma$ H2AX und MDC1 etabliert. Hierfür wurden unterschiedliche Sekundärantikörper, gekoppelt an Goldpartikel mit 6 nm bzw. 10 nm Durchmesser, verwendet, um die Reparaturfaktoren anhand der Größe ihrer Substituenten unterscheiden zu können.

Im Anschluss an die Bestrahlung konnten Chromatindomänen, die  $\gamma$ H2AX enthielten, mittels TEM als deutlich erkennbare Ketten, bestehend aus 3 bis 7 Goldbeads (6 nm), nachgewiesen werden. p53BP1 (10 nm) kolokalisiert zu annähernd 100% mit  $\gamma$ H2AX und bildet Cluster aus 3 bis 5 Beads um die  $\gamma$ H2AX-Kette (Abbildung 17 a). Darüber hinaus wurden zusätzlich Bereiche beobachtet, in denen ausschließlich  $\gamma$ H2AX visualisiert werden konnte.

MDC1 (6 nm) bildet kettenähnliche Cluster aus 5 bis 15 Goldbeads, ebenfalls kolokalisierend mit p53BP1 (10 nm) (Abbildung 17 b).

Alle in diesen Experimenten markierten Reparaturfaktoren (53BP1, p53BP1,  $\gamma$ H2AX und MDC1) waren ausschließlich in Randbereichen von heterochromatischen Domänen, aber nie im Euchromatin, nachweisbar. Hierbei wurde visuell, aufgrund der unterschiedlichen Elektronenabsorption, zwischen Euchromatin (hell) und Heterochromatin (grau bis dunkelgrau, abhängig vom Kondensationsgrad des Chromatins) unterschieden.

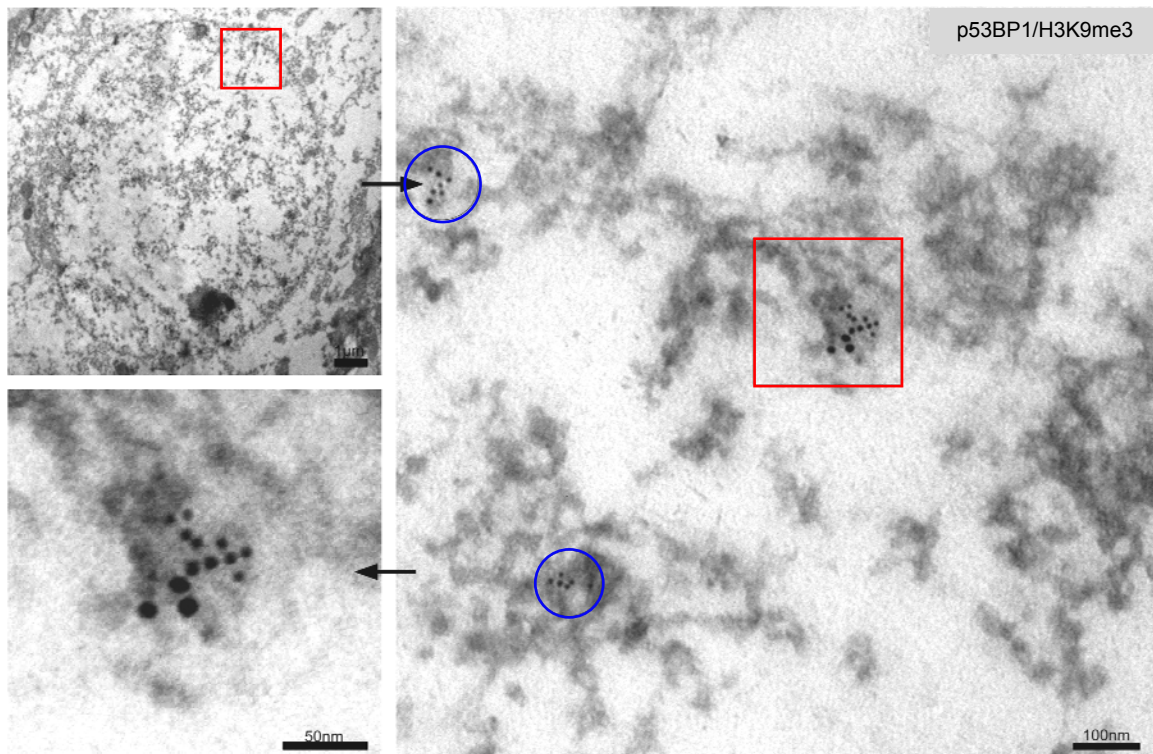
#### **5.2.1.5. Untersuchung von Chromatinmodifikationen und deren Kolokalisation mit p53BP1**

Neben der unterschiedlichen Elektronenstreuung können hetero- und euchromatische Domänen ebenfalls molekularbiologisch durch spezifische Histonmodifikationen nachgewiesen werden, welche in direkter Verbindung zur Chromatinstruktur stehen.

Um den Einfluss von Chromatinkonformationen im Zusammenhang mit der Reparatur von DSBs zu untersuchen, wurde die Markierung von p53BP1 in Kombination mit dem Euchromatinmarker H3K9acetyliert (H3K9ac) sowie dem Heterochromatinmarker H3K9trimethyliert (H3K9me3) etabliert. Die Acetylierung am Histon H3 deutet hierbei auf eine weniger dichte und für molekularbiologische Prozesse zugängliche Form des Chromatins hin, während eine Methylierung am Lysin 9 des Histons H3 bei eher kompakten und heterochromatischen Regionen vorhanden ist.

In den Doppelmarkierungen waren p53BP1-Cluster elektronenmikroskopisch in hellgrauen Heterochromatindomänen, übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorherigen Experimente, zu erkennen. Der Euchromatinmarker H3K9ac (6 nm) war nur in den hellen Bereichen des Zellkerns und nicht in direkter räumlicher Nähe von p53BP1 nachweisbar. Hingegen bildete H3K9me3 (6 nm) ausschließlich in heterochromatischen Domänen Cluster,

immer kolokalisierend mit p53BP1 (Abbildung 18). Darüber hinaus waren oftmals Chromatindomänen mit H3K9me3 nachweisbar, die keinen Marker für p53BP1 trugen.



**Abbildung 18: Kolokalisation von p53BP1 mit dem Heterochromatinmarker H3K9me3**

Repräsentative Aufnahmen einer Doppelmarkierung von p53BP1 (10 nm) und H3K9me3 (6 nm), dargestellt in zunehmender Vergrößerung. H3K9me3 bildet ausschließlich Cluster in heterochromatischen Domänen (grau) mit denen die phosphorylierte Form von 53BP1 (p53BP1) kolokalisiert.

## 5.2.2. Untersuchung von Reparaturproteinen, die im Umfeld strahleninduzierter Doppelstrangbrüche keine lichtmikroskopisch sichtbaren Foci bilden

An der Reparatur von DSBs durch NHEJ sind zentrale Proteine beteiligt, die nur in geringer Anzahl im Umfeld des Bruches benötigt werden. Diese bilden vermutlich aufgrund der geringen Akkumulation keine lichtmikroskopisch sichtbaren Foci. Durch die in vorangegangenen Experimenten nachgewiesene Sensitivität der TEM-Methode besteht erstmals die Möglichkeit auch zentrale Proteine des NHEJ zu visualisieren, die nicht in großer Anzahl akkumulieren. Ein entscheidender Schritt während der zellulären Schadensantwort auf DSBs stellt die Stabilisierung der Bruchenden in direkter Nähe zueinander durch selektives Binden des Ku70/Ku80 Heterodimers dar, welches nachfolgend als Plattform zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Reparaturfaktoren fungiert.

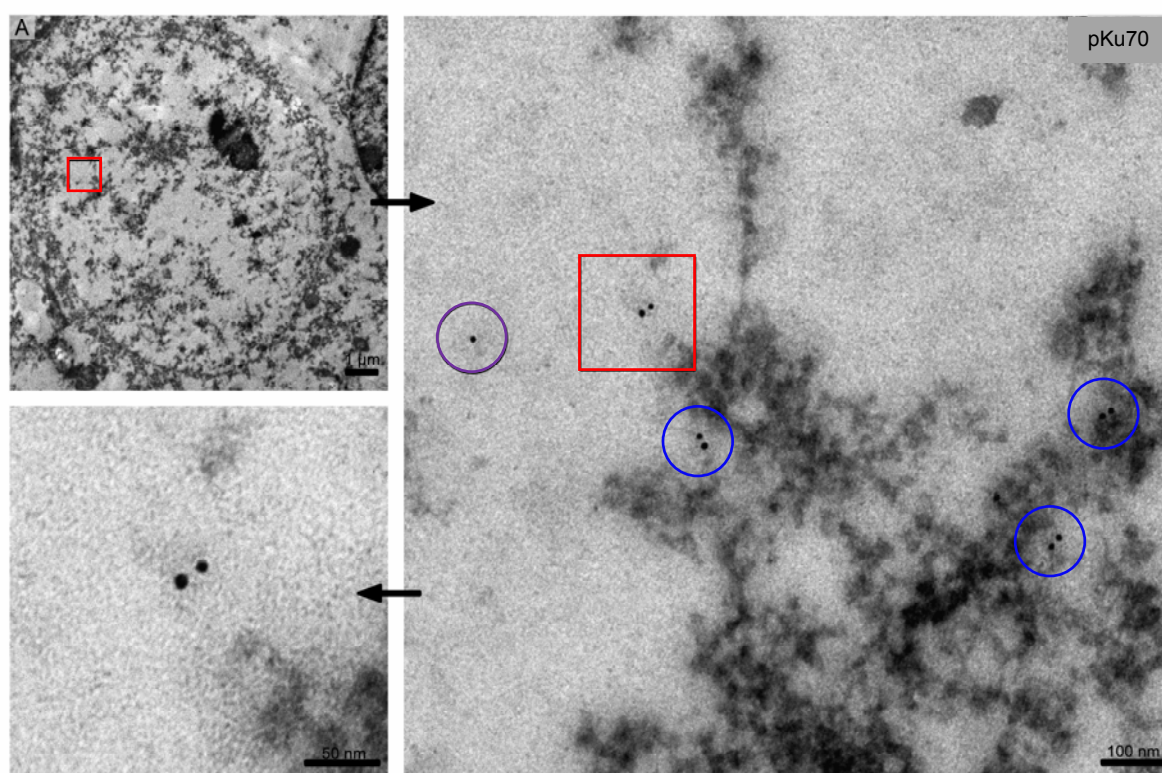
### 5.2.2.1. Nachweis von pKu70 als zentrales Protein des NHEJ

Nach dem Binden des Ku70/Ku80-Heterodimers an die Bruchenden wird DNA-PK<sub>cs</sub> rekrutiert. Durch Ringbildung dieses Multiproteinkomplexes wird der DSB weiter stabilisiert und die Religation vorbereitet. Durch Phosphorylierung erfolgt die Aktivierung der Proteine und die Rekrutierung weiterer an der Reparatur beteiligter Faktoren. Um nur diese phosphory-



lierte Form von Ku70 selektiv elektronenmikroskopisch zu detektieren, wurde ein Primärantikörper gegen eine am Serin 6 phosphorylierte Form (pKu70) eingesetzt.

Zunächst erfolgte die Markierung von pKu70 (10 nm) in den kortikalen Neuronen von Mäusen, die 30 Minuten nach der Bestrahlung mit 6 Gy fixiert werden. Sowohl im Euchromatin (hell) als auch in heterochromatischen Domänen (dunkel) konnten die pKu70-Dimere, visualisiert durch zwei Goldbeads in jeweils annähernd gleichem Abstand zueinander, nachgewiesen werden (Abbildung 19). Diese markieren vermutlich die beiden an den DNA-Doppelstrang gebundenen pKu70-Proteine. Darüber hinaus waren Einzelbeads, jedoch ausschließlich im Euchromatin, detektierbar. Im gleichen Gewebe von unbestrahlten Mäusen (Negativkontrollen) war pKu70 nur vereinzelt nachweisbar.



**Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Visualisierung von pKu70**

pKu70, markiert mit 10 nm Goldpartikeln, visualisiert in kortikalen Neuronen von Mäusen, 30 Minuten nach der Bestrahlung mit 6 Gy. Der eingerahmte Ausschnitt wird im nachfolgenden Bild mit zunehmender Vergrößerung erneut dargestellt. pKu70-Cluster wurden in hetero- (dunkel) und euchromatischen (hell) Domänen nachgewiesen, wobei die Mehrheit der Cluster aus zwei Goldbeads, lokalisiert in annähernd gleichem Abstand, bestehen. Diese markieren vermutlich die beiden an den DNA-Doppelstrang gebundenen pKu70-Proteine. Darüber hinaus waren einzelne Beads, jedoch ausschließlich im Euchromatin, nachweisbar.

### 5.2.2.2. Erfassung der pKu70-Reparaturkinetik in eu- und heterochromatischen Regionen

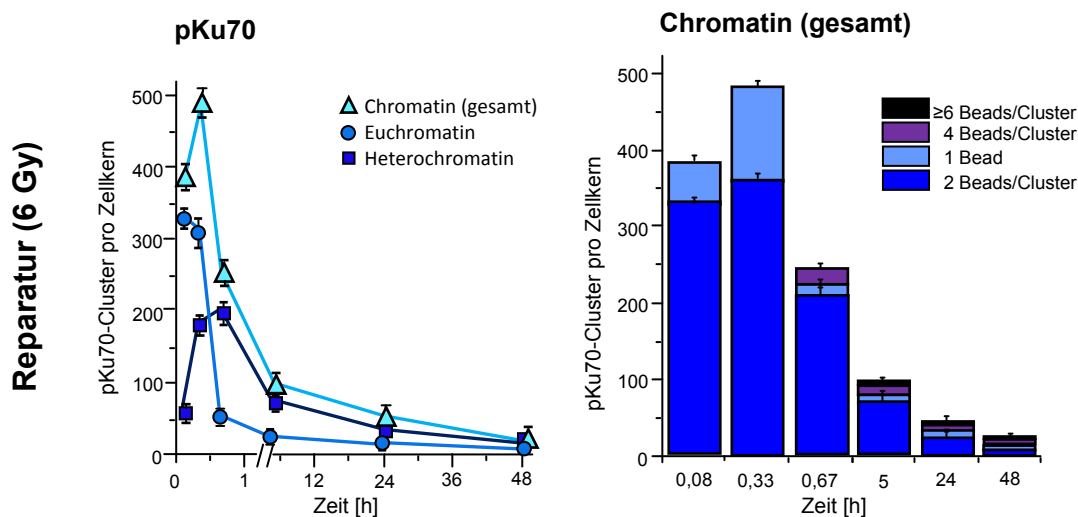
Die übergeordnete Chromatinstruktur besitzt nicht nur einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Gentranskription und DNA-Replikation sondern auch auf die Zugänglichkeit von Proteinen, die an der zellulären Schadensantwort und der DSB-Reparatur beteiligt sind. Die Reparatur von DNA-Läsionen muss in allen Stadien der möglichen Chromatinkonformationen, vom weniger dicht gepackten, relaxierten Euchromatin bis zum kompakten Hetero-

chromatin, effizient erfolgen. Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass die Reparatur von DSBs in heterochromatischen Domänen mit langsamerer Kinetik erfolgt, im Vergleich zu der Reparaturkinetik von entsprechenden Schäden im Euchromatin (Goodarzi et al., 2008, 2009; Fernandez-Capetillo und Nussenzweig, 2008; Murga et al., 2007). Zur Überprüfung dieser Hypothese, wurden pKu70-Cluster an festgelegten Zeitpunkten (0,08h; 0,33h; 0,67h; 5h; 24h; 48h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy separat für eu- und heterochromatische Regionen quantifiziert.

Direkt (0,08h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy wurden insgesamt  $\approx 389$  Cluster/Zellkern gezählt ( $\approx 65$  Cluster/Zellkern/Gy), davon  $\approx 330$  Cluster/Zellkern im Euchromatin und  $\approx 59$  Cluster/Zellkern im Heterochromatin.

**Tabelle 9:** pKu70-Reparaturkinetik (6 Gy); gezählte Cluster pro Zellkern

Zeit [h]	Chromatin [Cluster/Zellkern]	Standardfehler	Euchromatin [Cluster/Zellkern]	Standardfehler	Heterochromatin [Cluster/Zellkern]	Standardfehler
0,08	389,08	12,61	330,05	9,63	59,03	6,22
0,33	488,18	17,90	306,27	12,49	181,91	10,03
0,67	249,90	13,48	51,88	7,81	198,02	14,30
5	99,59	10,50	24,77	5,37	74,82	9,11
24	46,77	7,57	13,34	3,91	33,43	5,93
48	17,74	4,86	6,23	2,68	11,51	3,52
Kontr.	4,64	2,01	3,83	1,88	0,81	0,81



**Abbildung 20:** Zeitabhängige Quantifizierung von pKu70 in Eu- und Heterochromatin

Nach der Bestrahlung mit 6 Gy wurden pKu70-Cluster, überwiegend bestehend aus zwei Goldbeads, in euchromatischen Regionen (hell) und heterochromatischen Bereichen (dunkel) zeitabhängig quantifiziert. Die unterschiedlichen Kinetiken weisen darauf hin, dass Brüche im Euchromatin direkt detektiert und repariert werden, während die Reparatur heterochromatischer Brüche mit zeitlicher Verzögerung erfolgt (linke Abbildung). Abhängig von der Reparaturzeit variiert die Anzahl an Beads pro pKu70-Cluster (rechte Abbildung). Innerhalb der ersten halben Stunde nach der Bestrahlung wurden überwiegend Cluster aus zwei Beads und einzelne Beads detektiert. Nach  $\geq 40$  Minuten wurden darüber hinaus Cluster aus vier Beads und nach  $\geq 5$ h Cluster aus  $\geq 6$  Beads nachgewiesen.

Die hohe Anzahl an pKu70-Clustern im Euchromatin verminderte sich sehr schnell auf  $\approx 306$  Cluster/Zellkern nach 0,33h ( $\approx 93\%$  des Ausgangswertes) und  $\approx 52$  Cluster/Zellkern nach 0,67h ( $\approx 16\%$ ). Der weitere Verlauf der Kinetik erfolgte langsamer mit  $\approx 25$  Clustern/Zellkern

nach 5h ( $\approx 8\%$ ),  $\approx 13$  Cluster/Zellkern nach 24h ( $\approx 4\%$ ) und  $\approx 6$  Cluster/Zellkern nach 48h ( $\approx 2\%$ ) (Abbildung 19).

Im Gegensatz dazu erfolgte die Reparatur der pKu70-Cluster im Heterochromatin deutlich langsamer und mit unterschiedlichem Kinetikverlauf im Vergleich zu dem im Euchromatin. Direkt (0,08h) nach der Bestrahlung (6 Gy) waren im Heterochromatin  $\approx 59$  Cluster/Zellkern ( $\approx 30\%$ ) nachweisbar. Mit fortschreitender Reparaturzeit erhöhte sich zunächst die Anzahl der pKu70-Cluster auf  $\approx 182$  Cluster/Zellkern ( $\approx 92\%$ ) nach 0,33h und  $\approx 198$  Cluster/Zellkern ( $\approx 100\%$ ) nach 0,67h während sich im weiteren Verlauf die Anzahl der Cluster auf  $\approx 75$  Cluster/Zellkern ( $\approx 38\%$ ) nach 5h,  $\approx 33$  Cluster/Zellkern ( $\approx 17\%$ ) nach 24h und  $\approx 12$  Cluster/Zellkern ( $\approx 6\%$ ) nach 48h verminderte (Abbildung 20, linke Grafik).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass euchromatische Doppelstrangbrüche sehr schnell detektiert und direkt repariert werden, während die Reparatur von Brüchen in heterochromatischen Bereichen mit einer Verzögerung erfolgt, die vermutlich auf die zur Umstrukturierung des Chromatins benötigte Zeit zurückzuführen ist.

Die Anzahl an Beads pro pKu70-Cluster unterscheidet sich in euchromatischen Bereichen (einzelne Beads und 2 Beads/Cluster) und heterochromatischen Regionen (2, 4 und  $\geq 6$  Beads/Cluster). Ebenfalls variiert deren prozentualer Anteil abhängig von dem betrachteten Zeitpunkt und der hiermit verbundenen Reparaturzeit (Abbildung 20, rechte Grafik).

### 5.2.2.3. Analyse der zeitabhängigen Beadverteilung in pKu70-Clustern unter Berücksichtigung der Chromatinstruktur

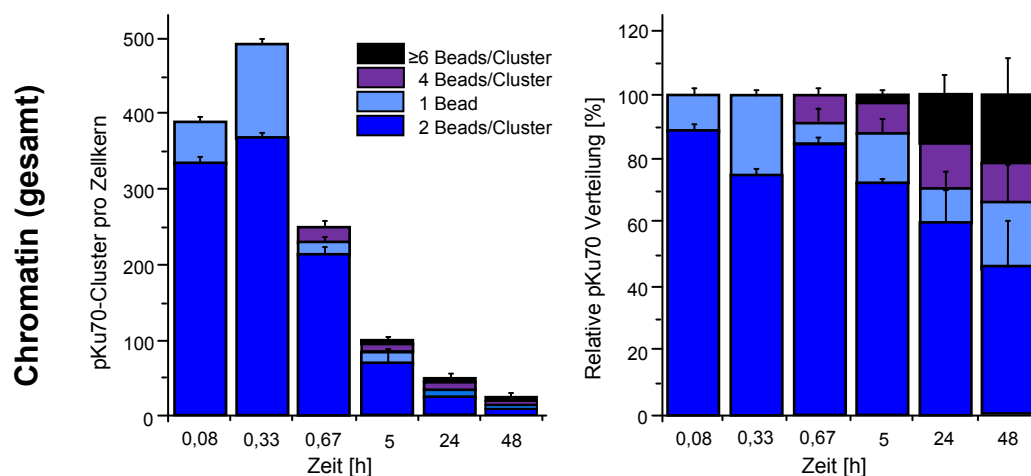
Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen erfolgt, abhängig von der umgebenden Chromatin-konformation, mit unterschiedlicher Kinetik. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente auf Unterschiede bezüglich der zeitabhängigen Prozessierung der durch pKu70 markierten Doppelstrangbrüche hin (Abbildung 21). Bereits wenige Minuten (0,08h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy wurden pro Zellkern  $\approx 389$  Cluster detektiert, davon  $\approx 85\%$  ( $\approx 330$  Cluster) im Euchromatin und  $\approx 15\%$  ( $\approx 59$  Cluster) im Heterochromatin (Abbildung 20).

**Tabelle 10:** Zeitabhängige Verteilung von pKu70-Beads pro Cluster (6 Gy) im Chromatin (gesamt); gezählte Cluster pro Zellkern

[Beads/Cluster]	<b>0,08h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler	<b>0,33h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler	<b>0,67h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler
1	57,08 17,29%	5,53	129,00 26,45%	8,66	19,07 7,63%	4,47
2	332,00 82,71%	9,48	359,18 73,55%	12,98	207,84 83,17%	12,04
4	0,00	0,00	0,00	0,00	22,99 9,20%	4,74
$\geq 6$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$\Sigma$	<b>389,08</b> 100%		<b>488,18</b> 100%		<b>249,90</b> 100%	

[Beads/Cluster]	<b>5h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler	<b>24h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler	<b>48h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler
1	12,06 12,11%	3,86	6,12 13,09%	2,64	3,75 21,13%	2,13
2	71,91 72,21%	8,90	28,07 60,03%	5,65	7,57 42,65%	2,94
4	12,90 12,95%	3,70	6,70 14,33%	2,62	2,36 13,30%	1,65
$\geq 6$	2,72 2,73%	1,91	5,87 12,55%	2,55	4,07 22,92%	2,30
$\Sigma$	<b>99,59</b> 100%		<b>46,77</b> 100%		<b>17,74</b> 100%	



**Abbildung 21:** Zeitabhängige Verteilung von Beads in pKu70-Clustern

Nach der Bestrahlung wurden in eu- und heterochromatischen Regionen für pKu70 überwiegend Cluster aus zwei Goldbeads (Beadpaare) nachgewiesen. Zusätzlich konnten ausschließlich im Euchromatin einzelne Beads und im Heterochromatin mit fortschreitender Reparaturzeit zunehmend Cluster aus 4 und  $\geq 6$  Beads detektiert werden.

Diese 330 euchromatischen pKu70-Cluster wurden zu  $\approx 83\%$  ( $\approx 273$  Cluster) aus je zwei Beads gebildet, die sich jeweils in annähernd konstantem Abstand zueinander befanden, während  $\approx 17\%$  ( $\approx 57$  Cluster) durch Einzelbeads nachgewiesen wurden (Abbildung 22).

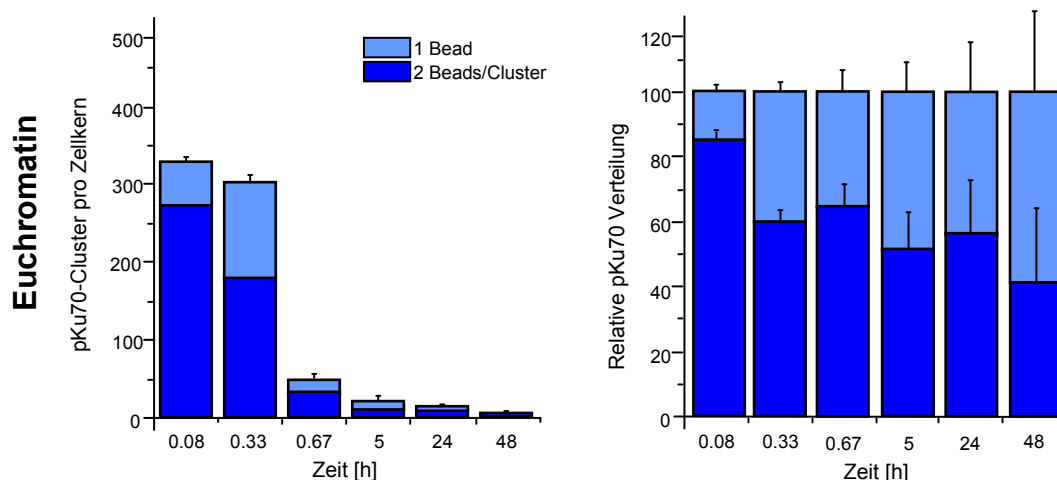
Mit fortschreitender Reparaturzeit verminderte sich im Euchromatin die Gesamtsumme an pKu70-Clustern pro betrachtetem Zeitpunkt (0,33h:  $\approx 306$  Cluster; 0,67h:  $\approx 52$  Cluster; 5h:  $\approx 25$  Cluster; 24h:  $\approx 13$  Cluster; 48h:  $\approx 6$  Cluster), jedoch blieb das Verhältnis von Beadpaaren (Mittelwert  $\approx 53\%$ ) zu Einzelbeads ( $\approx 47\%$ ) relativ konstant (Abbildung 22, linke Grafik).

**Tabelle 11:** Zeitabhängige Verteilung von pKu70-Beads pro Cluster (6 Gy) im Euchromatin; gezählte Cluster pro Zellkern

[Beads/Cluster]	<b>0,08h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler	<b>0,33h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler	<b>0,67h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler
1	57,08 17,29%	5,53	129,00 42,12%	8,66	19,07 36,76%	4,47
2	272,97 82,71%	7,91	177,27 57,88%	8,19	32,81 63,24%	5,56
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$\geq 6$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$\Sigma$	<b>330,05</b> 100%		<b>306,27</b> 100%		<b>51,88</b> 100%	

[Beads/Cluster]	<b>5h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler	<b>24h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler	<b>48h</b> [Cluster/Zellkern]	Standard- fehler
1	12,06 48,69%	3,86	6,12 45,88%	2,64	3,75 60,19%	2,13
2	12,71 51,31%	4,17	7,22 54,12%	2,83	2,48 39,81%	1,75
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$\geq 6$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$\Sigma$	<b>24,77</b> 100%		<b>13,34</b> 100%		<b>6,23</b> 100%	



**Abbildung 22: Zeitabhängige Verteilung von Beads in euchromatischen pKu70-Clustern**

Euchromatische pKu70-Cluster wurden im Verlauf der Reparaturkinetik ausschließlich aus Beadpaaren und Einzelbeads gebildet. Während wenige Minuten nach der Bestrahlung der Anteil an Clustern mit zwei Beads dominierte, blieb das Verhältnis von Beadpaaren zu Einzelbeads an allen weiteren Zeitpunkten näherungsweise konstant.

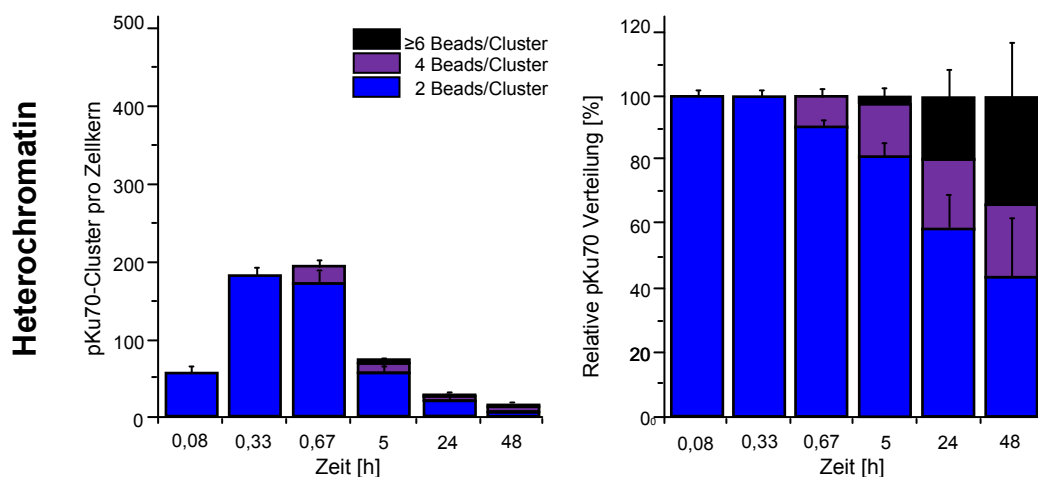
Heterochromatische Cluster wurden 5 Minuten (0,08h) und 20 Minuten (0,33h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy zu 100% ( $\approx 59$  Cluster) aus zwei Beads gebildet. Mit fortschreitender Reparaturzeit ( $\geq 0,67$ h) konnten darüber hinaus zunehmend pKu70-Cluster aus 4 Beads (0,67h:  $\approx 23$  Cluster ( $\approx 12\%$ ); 5h:  $\approx 13$  Cluster ( $\approx 17\%$ ); 24h:  $\approx 7$  Cluster ( $\approx 20\%$ ) und 48h:  $\approx 2$  Cluster ( $\approx 20\%$ )) und  $\geq 6$  Beads (5h:  $\approx 3$  Cluster ( $\approx 4\%$ ), 24h:  $\approx 6$  Cluster ( $\approx 18\%$ ) und 48h:  $\approx 4$  Cluster ( $\approx 36\%$ )) detektiert werden (Abbildung 23).

**Tabelle 12:** Zeitabhängige Verteilung von pKu70-Beads pro Cluster (6 Gy) im Heterochromatin; gezählte Cluster pro Zellkern

[Beads/Cluster]	<b>0,08h</b> [Cluster/Zellkern]	Standardfehler	<b>0,33h</b> [Cluster/Zellkern]	Standardfehler	<b>0,67h</b> [Cluster/Zellkern]	Standardfehler
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	59,03 100%	6,22	181,91 100%	8,19	175,02 88,39%	12,58
4	0,00	0,00	0,00	0,00	22,99 11,61%	4,74
$\geq 6$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$\Sigma$	<b>59,03</b> 100%		<b>181,91</b> 100%		<b>198,02</b> 100%	

[Beads/Cluster]	<b>5h</b> [Cluster/Zellkern]	Standardfehler	<b>24h</b> [Cluster/Zellkern]	Standardfehler	<b>48h</b> [Cluster/Zellkern]	Standardfehler
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	59,20 79,12%	7,58	20,85 62,39%	5,05	5,09 44,19%	2,47
4	12,90 17,24%	3,70	6,70 20,05%	2,62	2,36 20,48%	1,65
$\geq 6$	2,72 3,64%	1,91	5,87 17,56%	2,55	4,07 35,33%	2,30
$\Sigma$	<b>74,82</b> 100%		<b>33,43</b> 100%		<b>11,51</b> 100%	

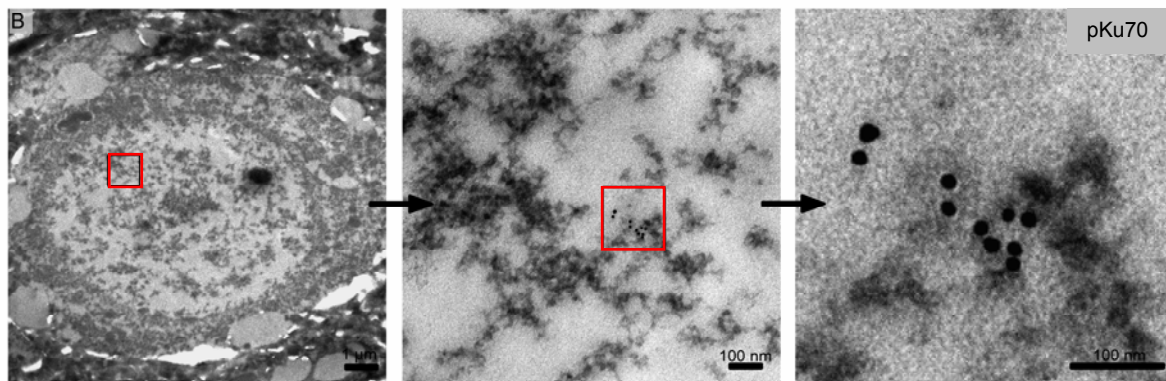


**Abbildung 23:** Zeitabhängige Verteilung von Beads in heterochromatischen pKu70-Clustern

Innerhalb der ersten 30 Minuten nach der Bestrahlung mit 6 Gy wurden in heterochromatischen Regionen ausschließlich pKu70-Cluster aus zwei Goldbeads (Beadpaare) nachgewiesen, jedoch konnten mit fortschreitender Reparaturzeit auch zunehmend Cluster aus 4 und  $\geq 6$  Beads detektiert werden.

Die Cluster mit  $\geq 6$  Beads, die durch mehrere und eindeutig zueinander gehörige Beadpaare gebildet wurden, waren bevorzugt in Übergangsbereichen und am Rand heterochromatischer Regionen (grau), jedoch nicht im kompakten Heterochromatin (dunkelgrau bis

schwarz), lokalisiert (Abbildung 24). Einzelbeads waren in heterochromatischen Domänen zu keiner Zeit nachweisbar.



**Abbildung 24: Heterochromatisch lokalisierte Ku70-Cluster mit  $\geq 6$  Beads**

Die pKu70-Cluster mit  $\geq 6$  Beads waren bevorzugt in Übergangsbereichen und am Rand heterochromatischer Regionen (hellgrau), jedoch nicht im kompakten Heterochromatin (dunkelgrau bis schwarz), lokalisiert.

#### 5.2.2.4. Kolokalisation von pKu70 und p53BP1 im Kontext des Chromatins

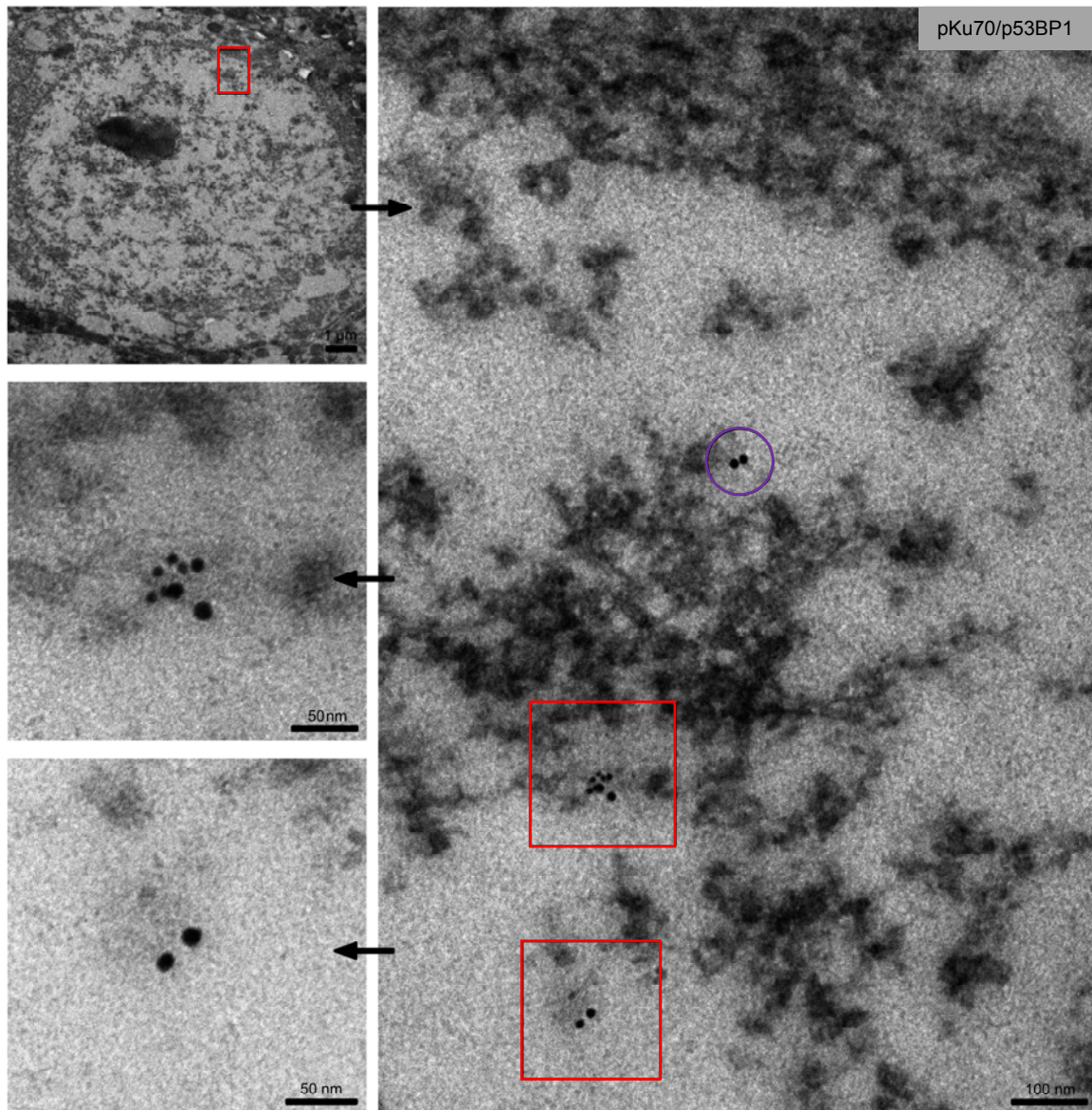
Durch Auszählen strahleninduzierter 53BP1-Foci (IFM) wurde vorab eine Reparaturkinetik ermittelt (Kapitel 5.1.3) und die maximale Focianzahl 30 Minuten nach der Bestrahlung nachgewiesen. Im weiteren Verlauf reduzierte sich die Anzahl der Foci mit fortschreitender Reparaturzeit. Durch einen Vergleich mit der mittels TEM erfassten Reparaturkinetik (Kapitel 5.2.1.3) am gleichen Zeitpunkt wird deutlich, dass ebenfalls die maximale Anzahl an 53BP1-Clustern detektiert wurde und die anschließende Reparatur mit vergleichbarer Kinetik erfolgte. Der Nachweis von pKu70 zu ähnlichen Zeitpunkten (20 min und 40 min) deutet darauf hin, dass die maximale Schadensdichte im Heterochromatin lokalisiert ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in einem weiteren Experiment die Doppelmarkierung von pKu70 (10 nm) und p53BP1 (6 nm) durchgeführt, um eine mögliche Beziehung dieser Reparaturfaktoren im Kontext des Chromatins zu untersuchen.

Bereits 5 Minuten (0,08h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy kolokalisierte pKu70 mit p53BP1 in heterochromatischen Bereichen. Im Gegensatz dazu konnte in euchromatischen Domänen ausschließlich pKu70, ohne p53BP1, nachgewiesen werden (Abbildung 24).

Aufgrund dieser Beobachtungen und unter der Annahme, dass p53BP1 möglicherweise an der Dekondensation heterochromatischer Chromatinstrukturen im Umfeld von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist, während pKu70 an jedem DSB bindet, um die Bruchenden zu stabilisieren und die räumliche Nähe zur Vorbereitung der bevorstehenden Religation zu bewahren, wurde die zeitabhängige Induktion von p53BP1 im Vergleich zu pKu70 überprüft.

Hierzu wurden C57Bl6-Mäuse mit jeweils 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy oder 10 Gy bestrahlt und der zerebrale Kortex 5 Minuten nach der Bestrahlung entnommen, fixiert, gemäß dem Protokoll weiter prozessiert und die Doppelmarkierung für pKu70 und 53BP1 durchgeführt. Die quantitative Erfassung und Analyse der Cluster erfolgte, wie bereits in Kapitel 5.2.1.2 be-

schrieben, durch die Doppelmarkierung zeitgleich für beide Reparaturproteine unter Berücksichtigung von Kollokationen.



**Abbildung 25: pKu70 und p53BP1 im Kontext des Chromatins**

Doppelmarkierung von pKu70 (10 nm) und p53BP1 (6 nm) in Neuronen des zerebralen Cortex von Mäusen. Bereits 5 Minuten nach der Bestrahlung mit 6 Gy kolokalisiert pKu70 mit p53BP1 in heterochromatischen Bereichen, während in euchromatischen Domänen ausschließlich pKu70, ohne p53BP1, nachgewiesen werden konnte.

Die Erfassung der Induktion von pKu70 erfolgte 5 Minuten nach der Bestrahlung und zeigte eine lineare Dosiskorrelation zwischen 500 mGy und 10 Gy sowohl im Euchromatin (500 mGy:  $\approx$  16 Cluster; 1 Gy:  $\approx$  40 Cluster; 2 Gy:  $\approx$  86 Cluster; 4 Gy:  $\approx$  180 Cluster; 6 Gy:  $\approx$  330 Cluster; 8 Gy:  $\approx$  406 Cluster; 10 Gy:  $\approx$  476 Cluster) als auch in heterochromatischen Domänen (500 mGy:  $\approx$  11 Cluster; 1 Gy:  $\approx$  15 Cluster; 2 Gy:  $\approx$  19 Cluster; 4 Gy:  $\approx$  37 Cluster; 6 Gy:  $\approx$  59 Cluster; 8 Gy:  $\approx$  135 Cluster; 10 Gy:  $\approx$  149 Cluster) (Abbildung 26, linke Grafik). Die Cluster bestanden in beiden Chromatinstrukturen aus zwei Beads/Cluster, zusätzlich waren noch Einzelbeads im Euchromatin nachweisbar, die jedoch nicht als Cluster in der numerischen Erfassung berücksichtigt wurden.



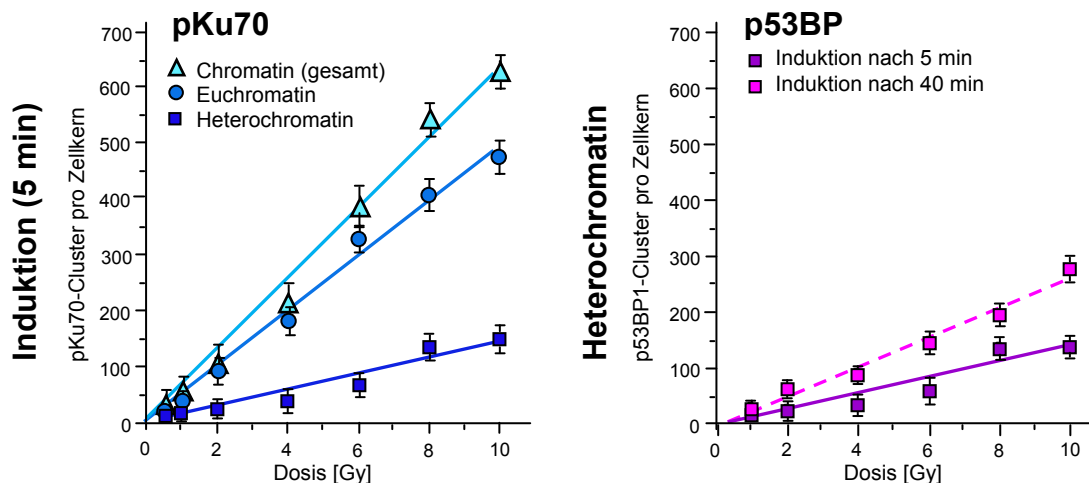
p53BP1-Cluster (3 bis 8 Beads) waren hingegen zum gleichen Zeitpunkt (5 Minuten nach der Bestrahlung) über den gesamten Dosisbereich ausschließlich im Heterochromatin (grau) nachweisbar (1 Gy:  $\approx$  16 Cluster; 2 Gy:  $\approx$  19 Cluster; 4 Gy:  $\approx$  32 Cluster; 6 Gy:  $\approx$  60 Cluster; 8 Gy:  $\approx$  133 Cluster; 10 Gy:  $\approx$  139 Cluster), immer kolokalisierend mit pKu70-Clustern (2 Beads) (Abbildung 26, rechte Grafik, dunkelviolett).

**Tabelle 13:** pKu70-Dosiskorrelation (Induktion, 5 min) und numerische Erfassung der Cluster (2 Beads/Cluster) pro Zellkern im Kontext des Chromatins

Dosis [Gy]	Heterochromatin [Cluster/Zellkern]	Standardfehler	Euchromatin [Cluster/Zellkern]	Standardfehler	Chromatin [Cluster/Zellkern]	Standardfehler
0	0,81	0,81	3,83	1,88	4,64	2,01
0,5	10,88	3,57	15,95	4,05	26,79	5,07
1	15,30	4,12	40,39	7,10	55,69	7,75
2	19,29	4,70	85,86	11,01	105,15	11,89
4	36,70	5,53	179,68	10,96	216,38	13,34
6	59,03	6,22	330,05	9,63	389,08	12,61
8	134,81	8,34	405,60	17,15	540,41	20,75
10	148,53	10,51	476,00	19,10	624,53	22,72

**Tabelle 14:** p53BP1-Dosiskorrelation (5 min und 40 min) und numerische Erfassung der Cluster pro Zellkern im Heterochromatin

Dosis [Gy]	Heterochromatin 5 min [Cluster/Zellkern]	Standardfehler	Heterochromatin 40 min [Cluster/Zellkern]	Standardfehler
0	0,46	0,46	0,46	0,46
1	15,30	4,12	26,11	3,73
2	19,29	4,70	63,56	6,41
4	31,47	4,88	86,58	6,42
6	60,23	6,21	145,49	8,92
8	133,40	8,20	196,37	6,57
10	138,89	9,18	277,51	7,05

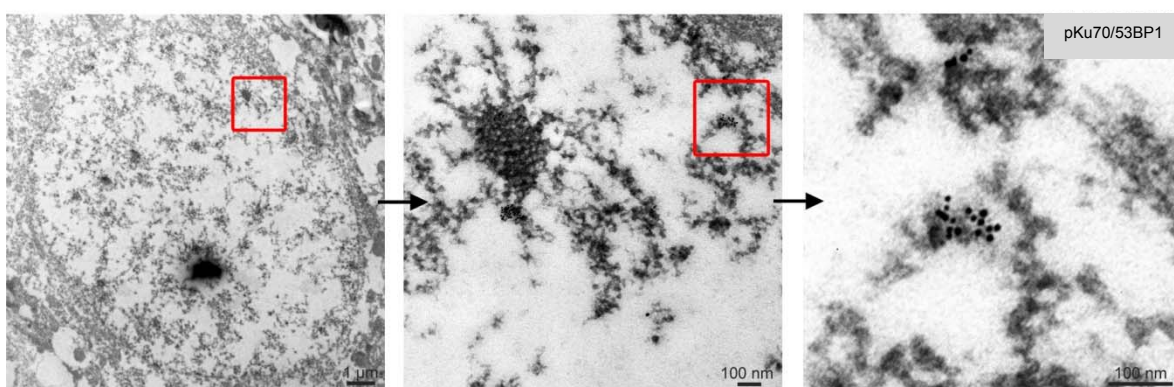


**Abbildung 26: Induktion von pKu70 (5 min) und p53BP1 (5 min und 40 min) im Kontext des Chromatins**  
Doppelmarkierung von pKu70 (linke Grafik, blau) und p53BP1 (rechte Grafik, violett) in Neuronen des zerebralen Cortex von Mäusen nach der Bestrahlung mit Dosen von 500 mGy bis 10 Gy. Bereits 5 Minuten nach der Bestrahlung war pKu70 sowohl in eu- als auch heterochromatischen Domänen nachweisbar. Hingegen konnte p53BP1 ausschließlich im Heterochromatin, kolokalisierend mit pKu70, detektiert werden. Die Anzahl der nachgewiesenen p53BP1-Cluster war bei gleicher Dosis abhängig von der Reparaturzeit.

Vergleichend wurde die Induktion von p53BP1-Clustern im gleichen Dosisbereich (1 Gy bis 10 Gy), jedoch 40 Minuten nach der Bestrahlung, erfasst (Abbildung 25, rechte Grafik, hellviolett). An diesem Zeitpunkt wurde ein höheres Clusterlevel für die jeweilige Dosis detektiert (1 Gy:  $\approx 26$  Cluster; 2 Gy:  $\approx 64$  Cluster; 4 Gy:  $\approx 87$  Cluster; 6 Gy:  $\approx 146$  Cluster; 8 Gy:  $\approx 196$  Cluster; 10 Gy:  $\approx 278$  Cluster) als zuvor nach 5 Minuten Reparaturzeit. Diese unterschiedlichen Clusteranzahlen nach verschiedenen Reparaturzeiten aber gleicher Dosis sind vermutlich auf eine zeitverzögerte Detektion, bedingt durch Modifikationen in schadensnahen heterochromatischen Chromatindomänen und die damit ermöglichte Zugänglichkeit der Reparaturfaktoren im Umfeld der Doppelstrangbrüche zurückzuführen.

### 5.2.2.5. Heterochromatische Akkumulation von 53BP1-Großclustern

Ein weiterer spannender Aspekt bezüglich der zeitlichen Abhängigkeit der Clusterbildung in Verbindung mit dem Einfluss der Chromatinstruktur, in der die Reparatur des Bruches erfolgt, stellt die Akkumulation von 53BP1 in kompakten heterochromatischen Domänen (dunkelgrau) dar. Diese 53BP1-Großcluster ( $\geq 10$  Beads) wurden erstmals bei der Erfassung der Reparaturkinetik (Kapitel 5.2.1.3) nachgewiesen, jedoch ausschließlich nach Reparaturzeiten von  $\geq 48$ h. Im Rahmen der Doppelmarkierung von pKu70 (10 nm) und p53BP1 (6 nm) sollten diese Großcluster näher untersucht werden, jedoch gelang deren Markierung und visuelle Darstellung zunächst nicht. Die Ursache hierfür lag in dem verwendeten Primärantikörper, da in den ersten Experimenten durch die Verwendung eines Antikörpers gegen 53BP1 sowohl die phosphorylierte (p53BP1) als auch die nicht-phosphorylierte Form von 53BP1 detektiert wurde. Für die Untersuchung von Kollokationen wurde jedoch ein Antikörper eingesetzt, der ausschließlich p53BP1 und somit nur die Cluster und keine Einzelbeads markiert.



**Abbildung 27: 53BP1-Großcluster**

Doppelmarkierung von pKu70 (10 nm) und 53BP1 (6 nm) in kortikalen Neuronen (C57Bl6), 72h nach der Bestrahlung mit 6Gy.

Die 53BP1-Großcluster werden somit ausschließlich durch 53BP1 gebildet, welches keine p53BP1-entsprechende Phosphorylierung mehr aufweist. Darüber hinaus kollokalisieren diese Großcluster nicht mit pKu70 oder anderen Reparaturproteinen (MDC1, pDNA-PKcs,  $\gamma$ H2AX) und waren im Gegensatz zu den pKu70/p53BP1-Cluster, die ausschließlich in den

heterochromatischen Übergangsbereichen (grau) nachgewiesen wurden, bevorzugt im kompakten Heterochromatin (dunkelgrau) lokalisiert (Abbildung 27).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei den 53BP1-Großclustern möglicherweise nicht mehr um aktiv prozessierte Brüche handelt, sondern um bleibende Chromatinmodifikationen und somit um epigenetische Veränderungen. Es ist hypothetisch denkbar, dass diese 53BP1-Akkumulationen falsch reparierte Doppelstrangbrüche markieren, um diese fehlerhafte DNA vor transkriptiven und/oder replikativen Prozessen zu bewahren. Jedoch sind, um diese Hypothese zu belegen, noch weitere Untersuchungen notwendig.

## 6. Diskussion

### 6.1. Methodenabhängige Visualisierungsunterschiede und deren Einfluss auf den Nachweis von focibildenden Reparaturfaktoren

Durch quantitatives Erfassen strahleninduzierter Foci mittels IFM wurde in vielen Arbeitsgruppen die dosisabhängige Induktion von Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur untersucht (Löbrich M, 2010). Das hierfür zugrunde liegende Prinzip, strahleninduzierte Foci ( $\gamma$ H2AX, 53BP1) zur Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen zu nutzen, beruht auf den Ergebnissen von Untersuchungsreihen in denen gezeigt wurde, dass nur DSBs und keine anderen DNA-Schäden IFM-nachweisbare Foci bilden. Darüber hinaus wurde von zahlenmäßigen Übereinstimmungen zwischen fluoreszenzmikroskopisch erfassten Foci und der aus Hochrechnungen gewonnener Anzahl an DSBs, detektiert mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), postuliert. Da beide Nachweismethoden jedoch für unterschiedliche Dosisbereiche geeignet sind (IFM: 1 mGy bis 1 Gy, PFGE: 10 Gy bis 80 Gy) und somit die experimentell erhobenen Ergebnisse nicht zum direkten Vergleich beider Methoden zur Verfügung standen, wurden die fehlenden Werte durch lineare Korrelation ergänzt. Dies ergab pro Gray und Zelle (MCR-5, humane Zelllinie, Lunge) eine Induktion (3 min nach der Bestrahlung) von 36 DSBs für IFM und 39 DSBs für PFGE (Rothkamm K, 2003).

Aufgrund der Erkenntnisse dieser Studien in Verbindung mit der einfachen Handhabung und adäquaten Sensitivität dieser Methode wurde die Immunfluoreszenz weitverbreitet zur Bestimmung strahleninduzierter DSBs und deren Reparaturkinetiken in unterschiedlichen Zelllinien angewendet (Löbrich M, 2010; Kinner A, 2008). Trotz der genannten Vorteile sollten dennoch die limitierenden Faktoren dieser Methode nicht unerwähnt bleiben. Durch die Markierung von akkumulierenden Reparaturproteinen oder Histonmodifikationen im Umfeld des Doppelstrangbruchs ist es zwar möglich Rückschlüsse anhand deren Kinetiken mittels IFM zu erheben, jedoch bleiben die Prozesse an der physikalischen DNA-Läsion selbst unerkannt (Kinner A, 2008; Costes SV, 2010). Obgleich DSBs direkt während der Exposition durch ionisierende Strahlung generiert werden, benötigt die Formation der Foci bis zur Detektion der maximalen Foci-Anzahl nach der Induktion etwa 30 Minuten. Zudem ist innerhalb der ersten Stunde näherungsweise keine Foci-Reduktion, als Hinweis auf eine Reparatur der Läsionen, nachweisbar. Hingegen wurde bei Untersuchungen mittels PFGE direkt im Anschluss an die Bestrahlung eine Reduktion der initialen Doppelstrangbrüche detektiert. Innerhalb der ersten 30 Minuten waren, trotz der hohen applizierten Dosen, nur noch die Hälfte der ursprünglichen DSBs nachweisbar (Kinner A, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in den murinen kortikalen Neuronen mittels Immunfluoreszenz für die Induktion (30 min nach der Bestrahlung) ungefähr acht 53BP1-Foci pro Gray nachgewiesen werden (Abbildung 11). Diese Ergebnisse korrelieren mit den in unterschiedlichen Geweben ermittelten Reparaturkinetiken bereits publizierter Daten der Arbeitsgruppe

(Rübe CE, 2008, 2010), sind jedoch niedriger im Vergleich zu den postulierten IFM-Daten (Rothkamm K, 2003).

Die relative biologische Wirksamkeit (Kapitel 2.1.2) und die Anzahl induzierter Schäden wird nicht nur von der applizierten Dosis, sondern ebenfalls von der Strahlenart (Photonen, Teilchen), der Dosisleistung (Gy/min), der Energie (keV, MeV) und den hierdurch hervorgerufenen Wechselwirkungsprozessen (Photoeffekt, Comptoneffekt) beeinflusst (Anhang 2). Von diesen Parametern wird somit auch der lineare Energietransfer (Kapitel 2.1.1) bestimmt. Beispielsweise beträgt der LET für Photonenstrahlung bei 100 keV (überwiegend Photoeffekt)  $2,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$ , hingegen bei 6 MeV Photonenstrahlung (überwiegend Comptoneffekt)  $0,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$ . Vor der Asservierung der hier verwendeten Gewebeproben (IFM, TEM) wurden die Mäuse mit 6 MV Photonenstrahlung (Comptoneffekt) und einer Dosisleistung von 3 Gy/min bestrahlt. Die Applikation der MCR-5-Zellen (Rothkamm K, 2003) erfolgte hingegen an einer 90 kV Röntgenröhre (Photoeffekt und Comptoneffekt) mit  $1,2 \text{ Gy/min}$  Dosisleistung. Dies stellt eine mögliche Ursache für die pro Gray abweichende Anzahl an DSBs dar, jedoch kann ebenfalls der unterschiedliche DNA-Gehalt von murinen und humanen Zellen, die zell-spezifische Anordnung der DNA in Chromatindomänen oder eine unterschiedliche Prozessierung im Rahmen der Versuchsabläufe (Fixierung, Einbettung) einen Einfluss haben.

Durch die Sensitivität der TEM-Methode kann Immunogold-markiertes 53BP1 als Cluster visualisiert werden. Darüber hinaus ist es möglich, zweifelsfrei zwischen diesen Clustern und den Einzelbeads, die in der IFM wahrscheinlich die unspezifische Hintergrundfluoreszenz darstellen, zu unterscheiden. Unter diesen Voraussetzungen wurden für 53BP1 eine Induktion von 28 Cluster pro Gray und Zellkern (30 Minuten nach der Bestrahlung) detektiert und gezeigt, dass dieses Foci-bildende Reparaturprotein nicht gleichmäßig im Zellkern verteilt, sondern ausschließlich in heterochromatischen „Übergangsbereichen“ (hellgrau) lokalisiert ist. Vergleichend mit den Ergebnissen der IFM-Analyse (8 Foci pro Gray und Zellkern) sind als Ursache für die abweichenden 53BP1-Foci/Cluster-Werte pro Gray bestahlungstechnische Unterschiede auszuschließen, da die untersuchten Präparate parallel aus dem jeweils gleichen Tier stammten. Jedoch nehmen die Durchmesser der lichtmikroskopisch detektierten Foci Größendimensionen von bis zu  $1 \mu\text{m}$  ein (Anhang 3). Elektronenmikroskopisch betrachtet wird deutlich, dass innerhalb dieser Fläche mehrere 53BP1-Cluster, räumlich nah durch ihre Lokalisation im Heterochromatin („clustering of foci“), nachweisbar sind. Diese werden jedoch lichtmikroskopisch als ein einzelner Focus detektiert. Diese Überlagerung von mehreren Fluoreszenzsignalen zu einem sichtbaren Focus und die damit verbundene Unterschätzung deren tatsächlich vorhandenen Anzahl stellt eine plausible Ursache für die numerischen Abweichungen dar.

## 6.2. H3K9me3 als Marker für heterochromatische Domänen

Als charakteristischer Heterochromatin-Marker wurde in dieser Arbeit H3K9me3 verwendet, der für drei Mitglieder der Protein 1 (HP1) Familie, HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  und HP1 $\gamma$ , über eine aminoterminaler Chromodomäne als "Landungsplattform" dient (Maison C, 2004). Diese Proteine fungieren in vielfältiger Weise als epigenetischer Regulator und sind an der Organisation der Chromatinstruktur, der transkriptiven Regulation sowie an der DNA-Replikation beteiligt. Schäden an der DNA, auch DSBs, induzieren eine vorübergehende HP1-Dissoziation von H3K9me3, wodurch eine lokale Dekondensation der übergeordneten Chromatinstruktur in diesem Bereich sowie die Zugänglichkeit von Proteinen und die Reparatur der dort vorhandenen Läsionen ermöglicht wird. Nach der Beseitigung des genomischen Schadens bindet HP1 erneut an H3K9me3, unter Wiederherstellung der ursprünglichen lokalen Chromatinstruktur (Dinant C, 2009).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Untersuchung von Chromatinmodifikationen zeigten eine Kollokalisierung von H3K9me3 mit allen 53BP1-Clustern, jedoch konnte nur wenig H3K9me3 in anderen heterochromatischen Regionen nachgewiesen werden. Da jedoch zwischen HP1 und intaktem Chromatin eine enge Assoziation besteht, wird infolge dessen der Zugang zu den H3K9me3-Bindungsdomänen aufgrund des Kondensationsgrads in diesen Bereichen erschwert und stellt eine mögliche Ursache für die geringe Markierungseffizienz von H3K9me3 dar.

## 6.3. Chromatinstrukturabhängige Kinetiken

Der Nachweis von kollokalisierenden Reparaturfaktoren (53BP1, MDC1) und Histonmodifikationen ( $\gamma$ H2AX) mittels IFM wird üblicherweise mit dem Vorhandensein eines DSBs gleichgesetzt. Jedoch ist 53BP1 nicht ausschließlich an der Reparatur der Läsionen, sondern ebenfalls an weiteren Prozessen beteiligt (Noon AT, 2011), beispielsweise der lokalen Dekondensation des Chromatins im Umfeld des Bruches. pKu70, ein zentrales Protein des NHEJ, akkumuliert nicht in hoher Anzahl im Umfeld der Läsionen und kann deshalb auch nicht mittels IFM nachgewiesen werden, da die Fluoreszenz des pKu70-markierenden Antikörpers als diffuses Hintergrundsignal und nicht additiv als ein einzelner Focus visualisiert wird. In vitro konnte gezeigt werden, dass Ku70 erst nach dem Binden an die DNA-Bruchenden von DNA-PKcs an Serin 6 der aminoterminalen Domäne phosphoryliert wird. Diese DNA-PKcs-vermittelte Phosphorylierung von Ku70 ist vermutlich ein wichtiger Schritt für die Aktivierung und/oder die Regulation des NHEJ (Chan DW, 1999). Deshalb wurde die selektive Detektion und Visualisierung von pKu70 mittels TEM als ein Hinweis auf aktiv prozessierte Doppelstrangbrüche verwendet. Somit kann hierdurch möglicherweise eine Differenzierung von Reparaturproteinen, die nach fehlerhafter Reparatur und/oder aufgrund einer verbleibenden Änderung des Chromatinstatus akkumulieren, erfolgen.

Die TEM-Analyse wurde für pKu70, unter Berücksichtigung der Kolo-kalisation mit 53BP1, im Kontext des Chromatins durchgeführt. Hierzu wurde separat in eu- und heterochromatischen Domänen die Anzahl an Clustern sowie die Beads pro Cluster gezählt und unterschiedliche, chromatinstrukturabhängige DSB-Induktionen und Reparaturkinetiken ermittelt (Abbildung 19).

Fünf Minuten nach der Bestrahlung (0,5 Gy bis 10 Gy) wurden pKu70-Cluster, überwiegend bestehend aus 2 Beads (Beadpaaren), im Euchromatin ( $\approx 45$  Cluster/Gy) sowie in heterochromatischen Domänen ( $\approx 15$  Cluster/Gy) quantitativ erfasst (Abbildung 25). Insgesamt wurde sowohl in eu- als auch heterochromatischen Domänen eine Abhängigkeit zwischen der Induktion von DSBs und der applizierter Dosis mit einer linearen Korrelation zwischen 0,5 Gy und 10 Gy nachgewiesen. Die Induktion der ausschließlich im Heterochromatin lokalisierten 53BP1-Cluster korreliert mit der heterochromatischen Induktion von pKu70, bedingt durch die stetige Kolo-kalisation beider Reparaturfaktoren. Möglicherweise ist 53BP1 nur in diesen heterochromatischen Domänen an der Reparatur von DSBs oder der Dekondensation der übergeordneten Chromatinstruktur beteiligt.

Die Reparaturkinetik wurde für pKu70 und 53BP1 an definierten Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit 6 Gy im Kontext des Chromatins erfasst. Euchromatische DSBs werden ohne zeitliche Verzögerung von pKu70 detektiert und repariert. Diese Ergebnisse korrelieren mit der schnellen Reparaturkomponente, die mittels PFGE beobachtet wurde (Iliakis G, 2004). Die ebenfalls im Euchromatin detektierten pKu70-Einzelbeads weisen vermutlich darauf hin, dass der Ablöseprozess von pKu70 im Verlauf der DNA-Reparatur an beiden DNA-Strängen nicht immer zeitgleich erfolgt (Abbildung 18). 53BP1-Cluster konnten im Euchromatin nicht nachgewiesen werden.

In heterochromatischen Domänen wurde erst 30 Minuten nach der Bestrahlung die maximale Anzahl an pKu70-Clustern detektiert, immer kolo-kalisierend mit 53BP1-Clustern. Die Reparatur der DSBs erfolgt, vermutlich bedingt durch die höhere Komplexität der Chromatinstruktur und der hierdurch erschwerten Zugänglichkeit der Reparaturfaktoren, langsamer im Vergleich zur euchromatischen DSB-Reparatur (Abbildung 19). pKu70-Einzelbeads konnten im Heterochromatin nicht nachgewiesen werden, jedoch mit fortschreitender Reparaturzeit zunehmend pKu70-Cluster, die aus 4- und  $\geq 6$  Beads bestanden (Abbildung 22). Bis jetzt konnte nicht geklärt werden, was durch diese Cluster markiert wird: mehrere Brüche, die durch ihre heterochromatische Lokalisation in direkter räumlicher Nähe induziert wurden oder eine Ansammlung von Brüchen, welche durch dynamische Prozesse in räumliche Nähe, sogenannte Reparaturzentren, gebracht werden (Aten JA, 2004; Jakob B, 2009; Kruhlak MJ, 2006).

Die Markierung und Visualisierung von pKu70 als Marker für aktiv prozessierte DSBs und die mittels TEM erstmals zur Verfügung stehende Möglichkeit, die Reparatur dieser Läsionen

sowohl im Euchromatin als auch im Heterochromatin separat zu erfassen, ergab höhere Induktionswerte pro Gray und eine schnellere Reparaturkinetik im Vergleich zu den IFM-ermittelten Ergebnissen. Die Ergebnisse dieser Arbeit korrelieren mit den postulierten Daten, die mit PFGE ermittelt wurden.

#### **6.4. pKu70 als DSB-Marker**

Die Detektion eines DSB erfolgt beim NHEJ durch terminales Binden des Ku70/Ku80-Heterodimer an die Bruchenden. Durch das Rekrutieren anderer Reparaturfaktoren, darunter auch DNA-PKcs und DNA Ligase IV, und die Bildung eines Ring- und Brückenkomplexes werden die Bruchenden stabilisiert und ein Auseinanderdriften wird verhindert. DNA-PKcs bindet C-terminal an Ku80, phosphoryliert dieses und induziert hierdurch entlang des DNA-Stranges die einwärts gerichtete Dislokation des Ku-Ringes, wobei DNA-PKcs am DNA-Terminus verbleibt. Die Brückenbildung erfolgt durch Interaktionen zwischen DNA-PKcs-Molekülen, wodurch die Kinase-Aktivität der DNA-PK induziert wird. Die transständige Phosphorylierung der DNA-PKcs-Moleküle führt zu konformalen Strukturänderungen und letztendlich zum Ablösen aus dem End-Joining-Komplex (Hammel M, 2010; Spagnolo L, 2006). Unter Beteiligung des Ligase IV/XRCC4-Komplexes, der eine Verbindung zwischen den Ku-gebundenen DNA-Bruchenden bildet, erfolgt die Religation. Anschließend lösen sich die Ku-Moleküle von der instandgesetzten DNA. Diese bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Ku-Heterodimer während der gesamten DSB-Reparatur, von dem initialen Binden an die DNA-Bruchenden bis zu deren finalen Religation, an dem Prozess beteiligt ist.

pKu70, welches erst nach dem Binden an die DNA-Bruchenden von DNA-PKcs phosphoryliert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels Immunogold überwiegend als Beadpaar oder als Cluster, bestehend aus mehreren Beadpaaren, visualisiert werden. Der Abstand der beiden Goldbeads pro Paar beträgt näherungsweise 15 nm. In der Literatur wird für das Ku-Heterodimer eine maximale Dimension von 165 Angström angegeben, die durch Strukturanalysen mittels Rasterkraftmikroskopie, Röntgenkristallographie und Kleinwinkel-Röntgenstreuung ermittelt wurden (Hammel M, 2010). Diese Angabe, als Hinweis auf den maximal möglichen Abstand der beiden DNA-gebundenen Ku70-Moleküle, stimmt gut mit den visualisierten Begebenheiten im TEM überein. Jedoch wird diese Distanz nicht ausschließlich durch die Lokalisation der pKu70-Proteine innerhalb des Ku-Komplexes bestimmt, sondern ebenfalls durch die Größe der primären und goldgekoppelten, sekundären Antikörper (Anhang 1) sowie deren stereographische Anordnung innerhalb des dreidimensionalen Gewebeschnittes.



### **6.5. pKu70-Cluster mit $\geq 6$ Beads**

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass die Chromatinstruktur eine essentielle Bedeutung für das Erkennen und Prozessieren von DNA-Läsionen besitzt. Infolge eines DNA-Schadens führt ein komplexes Zusammenspiel von Chromatin-modifizierenden Faktoren zu einer räumlichen Umstrukturierung, wodurch die Chromatinstruktur aufgelockert bzw. geöffnet wird. Hierdurch wird der Zugang verschiedener Reparaturproteine zur DNA-Läsion erst ermöglicht, so dass die einzelnen Reparaturmechanismen ablaufen können. Aufgrund der hochgradigen Kondensierung erscheinen insbesondere heterochromatische Bereiche als strukturelle Barriere für die Detektion und das Prozessieren von DSBs (Morrison AJ, 2005).

Mit fortschreitender Reparaturzeit wurden zu späten Zeitpunkten ( $> 5h$ ) zunehmend pKu70-Cluster, bestehend aus  $\geq 6$  Beads, beobachtet (Abbildung 22 und 23). Diese komplexen pKu70-Cluster wurden ausschließlich aus einem Vielfachen von pKu70-Beadpaaren gebildet, die vermutlich die beiden pKu70-Proteine des Ku70-Ku80-Heterodimers markieren. Möglicherweise handelt es sich bei diesen pKu70 Cluster mit  $\geq 6$  Beads um mehrere DSBs, die aufgrund ihrer Lokalisation in kompakten heterochromatischen Regionen in direkter räumlicher Nähe induziert wurden. Histonmodifikationen, die eine Relaxation des Chromatins bewirken und den Zugang von Reparaturproteinen zu den entstandenen Läsionen ermöglichen, sowie die Komplexität der entstandenen Brüche sind denkbare Ursachen für den zeitlich verzögerten Nachweis. pKu70 Clustern mit  $\geq 6$  Beads kolokalisieren mit pDNA-PKcs und sind eine Woche nach der Bestrahlung nicht mehr nachweisbar. Vermutlich erfolgt, trotz der Komplexität der Brüche, eine Reparatur der Läsionen.

### **6.6. 53BP1-Großcluster als Hinweis auf einen veränderten Chromatinstatus**

In heterochromatischen Domänen wurden 48h und 72h nach der Bestrahlung große und kompakte 53BP1-Cluster aus  $\geq 15$  und bis zu 60 Goldbeads detektiert (Abbildung 26). In deren direktem Umfeld war  $\gamma$ H2AX vereinzelt nachweisbar, jedoch kolokalisierte weder pKu70 noch DNA-PKcs. Durch eine Markierung mit dem phosphorylierten p53BP1-Antikörper konnten diese 53BP1-Großcluster nicht visualisiert werden, vermutlich erfolgt deren Bildung ausschließlich durch nicht-phosphoryliertes 53BP1. Darüber hinaus waren 53BP1-Großcluster auch eine Woche nach der Bestrahlung in annähernd unveränderter Anzahl vorhanden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei diesen Läsionen möglicherweise nicht um unreparierte DSBs handelt, sondern wahrscheinlicher um verbleibende Änderungen im Chromatinstatus nach erfolgter Reparatur.

## 7. Ausblick

Obwohl eine Vielzahl von Reparaturproteinen identifiziert und charakterisiert wurden, sind ihre wechselseitigen Interaktionen untereinander sowie mögliche Zusammenhänge mit spezifischen Histonmodifikationen und der lokalen Dekondensationen des Chromatins im Umfeld von Doppelstrangbrüchen noch weitgehend unklar.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit angewendete hochauflösende TEM-Methode ist es erstmals möglich, DNA-Reparaturfaktoren mittels goldmarkierten Antikörpern im Kontext der Chromatinstruktur intakter Zellkerne nachzuweisen und zu analysieren. Das übergeordnete Ziel besteht hierbei in einem besseren Verständnis bezüglich der Entstehung und Reparatur von strahlenbiologisch bedeutsamen DNA-Schäden und ihrer zellulären Konsequenz.

Aufbauend auf die bereits gewonnenen Erkenntnisse, sind zusätzliche Experimente notwendig, um die Bedeutung von strahleninduzierten DNA-Schäden näher untersuchen zu können:

Eine weitere Analyse der 53BP1-Großcluster mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP), um eine mögliche Veränderung des Chromatinstatus nachzuweisen, der in diesem Bereich die Akkumulation von 53BP1 bedingt.

Die Charakterisierung von Reparaturprozessen in Abhängigkeit von der zellspezifischen Chromatinstruktur. Es ist denkbar, dass aufgrund variierender Chromatinstrukturen zellspezifische Unterschiede hinsichtlich der DSB-Reparatur bestehen, die möglicherweise die unterschiedliche intrinsische Strahlensensitivität bedingen.

Weitere Untersuchungen bezüglich der Bedeutung von Reparaturdefekten für die Reparatur von DSBs bei eingeschränkter Kapazität oder nicht vorhandener Aktivität üblicherweise beteiligter Proteine. In diesem Zusammenhang und durch gezielte Markierung freier DNA-Bruchenden mittels TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) sowie anschließender TEM-Analyse eröffnen sich neue Möglichkeiten, verbleibende Foci zu charakterisieren und unreparierte Brüche von bleibenden Chromatinveränderungen zu unterscheiden.

## 8. Verzeichnisse

### 8.1. Literatur

1. Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA non-homologous end-joining. *Cell* 124: 301-313.
2. Altaf M, Saksouk N, Cote J (2007). Histone modifications in response to DNA damage. *Mutat. Res.* 618: 81-90.
3. Assenmacher N, Hopfner KP (2004). MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113: 157-166.
4. Ataian Y, Krebs JE (2006). Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. *Biochem. Cell Biol.* 84: 490-504 (Review).
5. Aten JA, Stap J, Krawczyk PM, van Oven CH, Hoebe RA, Essers J, Kanaar R (2004). Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303: 92-95.
6. Bassing CH, Alt FW (2004). The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair* 3: 781-796.
7. Baumann P, Benson FE, West SC (1996). Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87, 757-766.
8. Belmont AS, Bruce K (1994). Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J. Cell. Biol.* 127: 287-302.
9. Berger SL (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 142-148.
10. Berod A, Hartman BK, Pujol JF (1981). Importance of Fixation in Immunohistochemistry: The use of Formaldehyd Solutions at Variable pH for the Localization of Tyrosine Hydroxylase. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 844-850.
11. Bhogal N, Jalali F, Bristow RG (2009). Microscopic imaging of DNA repair foci in irradiated normal tissues. *Int. J. Radiat. Biol.* 18: 1-15.
12. Breen AP, Murphy JA (1995) Reactions of hydroxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 1033-1077.
13. Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O, Plebani A, Stephan J.L, Hufnagel M, le Deist F, Fischer A, Durandy A, de Villartay JP, Revy P (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124: 287-299.
14. Burma S, Chen BPC, Chen DJ (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair* 5: 1042-1048.
15. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* 424: 9-21.
16. Cadet J, D'Ham C, Douki T, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (1998). Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Radic. Res.* 29: 541-550.
17. Cary RB, Peterson SR, Wang J, Bear DG, Bradbury EM, Chen DJ (1997). DNA-looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 4267-4272.

18. Chan DW, Ye R, Veillette CJ, Lees-Miller SP (1999) DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku70/80 heterodimer. *Biochem.* 38: 1819-1828.
19. Chen BP, Uematsu N, Kobayashi J, Lerenthal Y, Krempler A, Yajima H, Löbrich M, Shiloh Y, Chen DJ (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J. Biol. Chem.* 282: 6582-6587.
20. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb L.A (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. *J. Biol. Chem.* 267: 166-172.
21. Chu G (1997). Double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 272: 24097-24100.
22. Colliex C, Kohl H (2008). *Elektronenmikroskopie: Eine anwendungsbezogene Einführung.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Berlin, 5-135.
23. Costes SV, Chiolo I, Pluth JM, Barcellos-Hoff MH, Jakob B (2010). Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutat. Res.* 704: 78–87.
24. D'Amours D, Jackson SP (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 317-327.
25. De Fazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G (2002). Synapsis of DNA ends by DNA dependent protein kinase. *EMBO J.* 21, 3192-3200.
26. Dinant C, Luijsterburg MS (2009). The emerging role of HP1 in the DNA damage response. *Mol. Cell. Biol.* 29: 6335-6340.
27. Dizdaroglu M, Dirksen ML, Jiang HX, Robbins JH (1987). Ionizing-radiation-induced damage in the DNA of cultured human cells. Identification of 8,5-cyclo-2-deoxyguanosine. *Biochem. J.* 241: 929-932.
28. Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* 447: 951-958.
29. **FEI Company** (2005). *Expanding the Bondaries and Achieving New Result, Titan 80-300.*
30. Feldman MY (1973) Reactions of Nucleic Acids and Nucleoproteins with Formaldehyde. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 13: 1-49.
31. Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A (2008) ATM breaks into heterochromatin. *Mol. Cell* 31: 303–304.
32. Fernandez-Capetillo O, Murga M (2008). Why cells respond differently to DNA damage: a chromatin perspective. *Cell Cycle* 7: 980-983.
33. Flegler SL, Heckman Jr JW, Komprens KL (1995). *Elektronenmikroskopie - Grundlagen, Methoden, Anwendungen.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 281-245.
34. Foser ER, Downs JA (2005). Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J.* 272: 3231-3240.
35. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP (1985). Formaldehyde Fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 845-853.
36. French D, Edsall JT (1945) The reaction of formaldehyde with amino acids and proteins. *Adv. Protein Chem.* 2: 277-335.
37. Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T. (2006). *DNA repair and mutagenesis.* ASM Press, Washington, D.C.

38. Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, Lindahl T, Lowndes N, Sarasin A, Wood RD (2006). DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* 5: 986-996.
39. Friedland W, Jacob P, Paretzke HG, Merzagora M, Ottolenghi A (1999). Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiat. Environ. Biophys.* 38: 39-47.
40. Fritz-Niggli H (1988). *Strahlengefährdung/Strahlenschutz*. Todt-Druck GmbH, VS Villingen.
41. Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Löbrich M, Jeggo PA (2008). ATM Signaling facilitates repair of DNA doublestrand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell* 31: 167–177.
42. Goodarzi AA, Noon AT, Jeggo PA (2009). The impact of heterochromatin on DSB repair. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 569–576.
43. Goodhead DT (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65: 7-17.
44. Gottlieb TM, Jackson SP (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72: 131-142.
45. Gupta RC, Bazemore LR, Golub EI, Radding CM (1997). Activities of human recombination protein Rad51. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 463-468.
46. Gustavson KH (1956) Aldehyde Tanning. In "The chemistry of tanning processes", 244-282, Academic Press, New York.
47. Haber JE (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.* 16: 259-264.
48. Hall EJ, Giacca AJ (2006). *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 106-116.
49. Hammel M, Yu Y, Mahaney BL, Cai B, Phipps BM, Rambo RP, Hura GL, Pelikan M, So S, Abolfath RM, Chen DJ, Lees-Miller SP, Trainer JA (2010). Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. *J. Biol. Chem.* 285: 1414-1423.
50. Hansen JC (2002) Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31: 361-392.
51. Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 17: 366-374, 411 (Review).
52. Hopfner KP, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP, Tainer JA (2001). Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105: 473-485.
53. Huygen 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 double-strand breaks. *Nature* 432: 406-411.
54. Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22: 5834-5847.
55. Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, G. Pantelias (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation, *Cytogenet. Genome Res.* 104: 14-20.

56. Jackson SP (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23: 687-696.
57. Jakob B, Splinter J, Durante M, Taucher-Scholz G (2009). Live cell microscopy analysis of Radiation-induced DNA double-strand break motion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 3172-3177.
58. Jeggo PA (1998). Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat. Res.* 150: 80-91.
59. Jones D (1973). Reactions of aldehydes with unsaturated fatty acids during histological fixation. Aus "Fixation in Histochemistry", Stoward, Chapman, Hall, London.
60. Kallen RG, Jencks WP (1966). Equilibria for the reactions of amines with formaldehyde and protons in aqueous solutions. *J. Biol. Chem* 241: 5864.
61. Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol.* 8: 483-489.
62. Kaufmann GW, Moser E, Sauer R (2001). *Radiologie*. Urban & Fischer Verlag, München.
63. Khanna KK, Jackson SP (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27: 247-254.
64. Kiefer J, Kiefer I. (2003). *Allgemeine Radiologie, Strahlenanwendung, Strahlenwirkung, Strahlenschutz*. Blackwell Verlag, Berlin.
65. Kinner A, Wu W, Staudt C, 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.
66. Kobayashi J, Antoccia A, Tauchi H, Matsuura S, Komatsu K (2004). NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair* 3: 855-861.
67. Koike M, Ikuta T, Miyasaka T, Shiomi T (1999). The nuclear localization signal of the human Ku70 is a variant bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *Exp. Cell Res.* 250: 401-413.
68. Koike M (2002). Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. *J. Radiat. Res.* 43: 223-236.
69. Kornberg RD (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868-871.
70. Kornberg RD, Lorch Y (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98: 285-294.
71. Krieger H (2007). *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, Wiesbaden: B.G. Teubner Verlag, S. 160, 165, 182, 185 f.
72. Kruhlak MJ, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Muller WG, Mc Nally JG, Bazett-Jones DP, Nussenzweig A (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 172: 823-834.
73. Lange RH, Blödorn J (1981). *Das Elektronenmikroskop TEM + REM*. Thieme Verlag.
74. Lavin MF, Kozlov S (2007). DNA damage-induced signalling in ataxia-telangiectasia and related syndromes. *Radiother. Oncol.* 83: 231-237.

75. 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.
76. Lisby M, Rothstein R (2004). DNA repair: keeping it together. *Curr. Biol.* 14: 994-996.
77. Löbrich M, Ikpeme S, Haub P, Weber KJ, Kiefer J (1993). DNA double-strand break induction in yeast by X-rays and alpha-particles measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* 64: 539-546.
78. Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fischer A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA (2010). Gamma-H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization, *Cell Cycle* 9: 662-669.
79. Louro D, Lesemann DE (1984). Use of protein A-gold complex for specific labeling of antibodies bound to viruses. *Journal of Virological Methods* 9: 107-122.
80. Lowndes NF, Murguia JR (2000). Sensing and responding to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 17-25.
81. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.
82. Lydall D, Whitehall S (2005). Chromatin and the DNA damage response. *DNA Repair* 4: 1195-1207.
83. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining, *Biochem. J.* 417: 639-650.
84. Maison MC, Almouzni G (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 296-304.
85. Marnett LJ (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Oxford Journals, Carcinogenesis* 21: 361-370.
86. Medawar PB (1941). The rate of penetration of fixatives. *J. R. Microsc. Soc.* 61: 46.
87. Meek K, Douglas P, Cui X, Ding Q, Lees-Miller SP (2007). Trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's: two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. *Mol. Cell Biol.* 27: 3881-3890.
88. Mieke G, Rodewald M, Weirich TE (2000). Transmissionselektronenmikroskopie, Technische Universität Darmstadt.
89. Mirzayans R, Severin D, Murray D (2006). Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 66: 1498-1505.
90. Moore JK, Haber JE (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of non-homologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16: 2164-2173.
91. Moreno-Herrero F, de 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* 15: 437, 440-443.
92. Morrison AJ, Shen X (2005). DNA repair in the context of chromatin. *Cell Cycle* 4: 568-571.
93. Munro TR (1970). The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat. Res.* 42: 451-470.

94. Murga M, Jaco I, Fan Y, Soria R, Martinez-Pastor B, Cuadrado M, Yang SM, Blasco MA, Skoultchi AI, Fernandez-Capetillo O (2007). Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response, *J. Cell. Biol.* 178: 1101-1108.
95. Myung K, Kolodner RD (2003). Induction of genome instability by DNA damage in *saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 2: 243-258.
96. Niida H, Nakanishi M (2006). DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21: 3-9.
97. Noll M (1974). Internal structure of the chromatin subunit. *Nucleic Acids Res.* 1: 1573-1578.
98. Noon AT, Goodarzi AA (2011). 53BP1-mediated DNA double strand break repair: Insert bad pun here. *DNA Repair* 10: 1071-1076.
99. Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 349-404.
100. Paull TT, Lee JH (2005). The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle* 4: 737-740.
101. Paull TT, Gellert M (1999). NBS1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.* 13: 1276-1288.
102. Paull TT, Gellert M (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* 1: 969-979.
103. Peterson CL, Laniel MA (2004). Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* 14: 546-551.
104. Petrini JH, Stracker TH (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* 13: 458-462.
105. Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WM (2003). Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand break sites. *Biochem Cell Biol* 81: 123-129.
106. Plattner H, Zingsheim HP (1987) *Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie*. Gustav Fischer Verlag.
107. Pruss D, Hayes JJ, Wolffe AP (1995). Nucleosomal anatomy - where are the histones? *Bioessays* 17: 161-170.
108. Puchtler H, Meloan SN (1985). On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 82: 201-204.
109. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 162-169.
110. Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell* 16: 715-724.
111. 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.
112. 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.
113. Roos N, Morgan JA (1990). *Cryopreparation of Thin Biological Specimens for*



- Electron Microscopy: Methods and Applications. Oxford Science Publications J. R. Microsc. Soc.
114. Rossi HH (1998). ICRU Report 60 - Fundamental quantities and units for ionizing radiation, International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU), 60: 16.
  115. Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Löbrich M (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell Biol.* 23: 5706-5715.
  116. 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.* 100: 5057-5062.
  117. Rube CE, Dong X, Kühne M, Fricke A, Kästner L, Lipp P, Rube C (2008). DNA double-strand break rejoining in complex normal tissues. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 72: 1180–1187.
  118. Rube CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief M, Löbrich M, Rube 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.* 14: 6546–6555.
  119. Rube CE, Fricke A, Wendorf J, Stutzel A, Kühne M, Ong MF, Lipp P, Rube C (2010). Accumulation of DNA double-strand breaks in normal tissues after fractionated irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 76: 1206–1213.
  120. Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 437-447.
  121. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 39-85 (Review).
  122. Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bahler J, Allshire RC, Kouzarides T (2004). Methylation of histone H4 lysine: 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* 119: 603-614.
  123. Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450: 509-514.
  124. Schwartz DC, Cantor CR (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
  125. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.* 158: 486-492.
  126. Shiloh Y (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* 3: 155-168.
  127. Shi SR, Key ME, Kalra KL.(1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on micro- wave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 741-748.
  128. Slater M (1993). Ultrastructural double labelling using colloidal gold. *Micron* 24: 661-675.
  129. Song B, Sung P (2000). Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J. Biol. Chem.* 275: 15895-15904.

130. Spagnolo L, B, Rivera-Calzada A, Pearl LH, Llorca O (2006). Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implication for DNA DSB repair. *Mol. Cell* 22: 511-519.
131. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.* 161: 1961-1971.
132. 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.
133. Teoule R (1987). Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 51: 573-589.
134. Thoma F, Koller T, Klug A (1997). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *Cell. Biol.* 83: 403-427.
135. Ting NS, Lee WH (2004). The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair* 3: 935-944.
136. Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY, Sung P (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J. Biol. Chem.* 273: 21447-21450.
137. 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.
138. 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.
139. Van Dyck E, Hajibagheri NM, Stasiak A, West SC (1998). Visualisation of human rad52 protein and its complexes with hRad51 and DNA. *J. Mol. Biol.* 284: 1027-1038.
140. Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (1999). Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 398: 728-731.
141. Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* 2: 196-206.
142. Von Sonntag C (1987). *The Chemical Basis of Radiation Biology.* Taylor and Francis, London.
143. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412: 607-614.
144. Ward JF (1995). Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat. Res.* 142: 362-368.
145. Ward JF (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 35: 95-125.
146. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2002). Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am. J. Surg. Pathol.* 24: 1016-1019.

147. Weterings E, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Hoeijmakers JH, van Gent DC (2003). The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res.* 31: 7238-7246.
148. Williams DB, Carter CB (1996). *Transmission Electron Microscopy - A Textbook for Materials Science*, Plenum Press, New York.
149. Woodcock CL, Frado LL, Rattner JB (1984). The higher-order structure of chromatin: Evidence for a helical ribbon arrangement. *Cell Biol.* 99: 42-52.
150. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP (2002). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 297: 1837-1848.
151. Zhang Y, Zhou J, Cao X, Zhang Q, Lim CU, Bailey SM, Ullrich RL, Liber HL (2006). Partial deficiency of DNA-PKcs increases ionizing radiation-induced mutagenesis and Telomere instability in human cells. *Cancer Lett.* 250: 63-73.
152. Zhou BBS, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439.

## 8.2. Abbildungen

Abbildung 1:	Die indirekte und direkte Wirkung ionisierender Strahlung auf DNA (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Hall EJ, 2006).	6
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Khanna KK, 2001).	10
Abbildung 3:	Homologe Rekombination (HR) und Nicht-Homologes End-Joining (NHEJ) (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Downs JA, 2007).	12
Abbildung 4:	Schematischer Aufbau einer elektromagnetischen Linse (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Miehe G, 2000).	17
Abbildung 5:	Signalerzeugung bei Bestrahlung einer Probe mit hochenergetischen Elektronen (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Miehe G, 2000; Flegler SL, 1995).	18
Abbildung 6:	Arbeitsablauf	24
Abbildung 7:	Aufbau und Auflösungsvermögen vom Licht- und Elektronenmikroskop.	25
Abbildung 8:	Bestrahlungsplanung mittels Pinnacle	26
Abbildung 9:	Probenvorbereitung für die Transmissionselektronenmikroskopie	31
Abbildung 10:	Farbskala zur Ermittlung der Schnittdicke	34
Abbildung 11:	Kolokalisation strahleninduzierter Foci in der Immunfluoreszenz	39
Abbildung 12:	Induktion strahleninduzierter 53BP1-Foci	40
Abbildung 13:	Reparaturkinetik anhand der 53BP1-Foci-Abnahme	41
Abbildung 14:	Elektronenmikroskopischer Nachweis von goldmarkiertem 53BP1	43
Abbildung 15:	Induktion von 53BP1	44
Abbildung 16:	Reparaturkinetik von 53BP1	46

Abbildung 17:	Kolokalisation von p53BP1 mit $\gamma$ H2AX und MDC1	47
Abbildung 18:	Kolokalisation von p53BP1 mit dem Heterochromatinmarker H3K9me3	49
Abbildung 19:	Elektronenmikroskopische Visualisierung von pKu70	50
Abbildung 20:	Zeitabhängige Quantifizierung von pKu70 in Eu- und Heterochromatin	51
Abbildung 21:	Zeitabhängige Verteilung von Beads in pKu70-Clustern	53
Abbildung 22:	Zeitabhängige Verteilung von Beads in euchromatischen pKu70-Clustern	54
Abbildung 23:	Zeitabhängige Verteilung von Beads in heterochromatischen pKu70-Clustern	55
Abbildung 24:	Heterochromatisch lokalisierte Ku70-Cluster mit $\geq 6$ Beads	56
Abbildung 25:	pKu70 und p53BP1 im Kontext des Chromatins	57
Abbildung 26:	Induktion von pKu70 (5 min) und p53BP1 (5 min und 40 min) im Kontext des Chromatins	58

### 8.3. Tabellen

Abbildung 1:	53BP1-Induktion (30 min); gezählte Foci pro Zellkern	40
Abbildung 2:	53BP1-Reparaturkinetik (1 Gy); gezählte Foci pro Zellkern	41
Abbildung 3:	53BP1-Induktion (30 min); gezählte Cluster pro Zellkern	44
Abbildung 4:	53BP1-Induktion (30 min); gezählte Beads pro Cluster	44
Abbildung 5:	53BP1-Induktion (30 min); gezählte Beads pro Zellkern	44
Abbildung 6:	53BP1-Reparaturkinetik (6 Gy); gezählte Cluster pro Zellkern	46
Abbildung 7:	53BP1-Reparaturkinetik (6 Gy); gezählte Beads pro Cluster	46
Abbildung 8:	53BP1-Reparaturkinetik (6 Gy); gezählte Beads pro Zellkern	46
Abbildung 9:	pKu70-Reparaturkinetik (6 Gy); gezählte Cluster pro Zellkern	51
Abbildung 10:	Zeitabhängige Verteilung von pKu70-Beads pro Cluster (6 Gy) im Chromatin (gesamt); gezählte Cluster pro Zellkern	53
Abbildung 11:	Zeitabhängige Verteilung von pKu70-Beads pro Cluster (6 Gy) im Euchromatin; gezählte Cluster pro Zellkern	54
Abbildung 12:	Zeitabhängige Verteilung von pKu70-Beads pro Cluster (6 Gy) im Heterochromatin; gezählte Cluster pro Zellkern	55
Abbildung 13:	pKu70-Dosiskorrelation (Induktion, 5 min) und numerische Erfassung der Cluster (2 Beads/Cluster) pro Zellkern im Kontext des Chromatins	58
Abbildung 14:	p53BP1-Dosiskorrelation (5 min und 40 min) und numerische Erfassung der Cluster pro Zellkern im Heterochromatin	58

### 8.3. Abkürzungen

A	Adenin, DNA-Base, Purin
AK	Antikörper
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated protein</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
ATR	ATM und <i>Rad3-related protein</i>
bp	Basenpaare
53BP1	<i>53 binding protein 1</i>
BRCA 1/2	<i>Breast cancer susceptibility gene 1/2</i>
C	Kohlenstoff (lat.: <i>carbo</i> )
C	Cytosin, DNA-Base, Pyrimidin
C	Spule
CCD	Bauteil zum Transport elektrischer Ladung (engl.: <i>charged coupled device</i> )
CeB <sub>6</sub>	Kathode, bestehend aus CeB <sub>6</sub> (lat.: <i>cerium hexaboride</i> )
Co	Cobalt (lat.: <i>cobaltum</i> )
CT	Computertomographie
D	Dosis in Gray
d	Auflösungsgrenze
DAPI	4',6-Diaminidino-2-phenyl-indole, färbt Nukleinsäuren
D <sub>Ref</sub>	Bezugsstrahlendosis
D <sub>Test</sub>	Zu vergleichende Strahlendosis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DSB	Doppelstrangbruch
e <sup>-</sup>	Elektron
E	Energie
EtOH	Ethanol
F	Fluenz, Teilchen pro cm <sup>2</sup>
f	Frequenz
FAR	<i>Fraction of radioactivity released</i>
Fe	Eisen (lat.: <i>ferrum</i> )
FEG	<i>Field emission gun</i>
FITC	Fluorescein
G	Guanin, DNA-Base, Pyrimidin
G1	Postmitotische Phase im Zellzyklus, Ruhephase (engl.: <i>gap</i> ),
G2	Prämitotische Phase im Zellzyklus, Ruhephase (engl.: <i>gap</i> )
GA	Glutaraldehyd
Gy	Gray, Energie pro Masse
H	Wasserstoff (lat.: <i>hydrogenium</i> )
h	Plancksches Wirkungsquantum
H1	Histon 1
H2A	Histon 2A
H2AX	Die Variante X des Histons 2A
H2B	Histon 2B
γH2AX	Phosphorylierte Form der Variante X des Histons 2A
H3	Histon 3
H3K9ac	H3K9acetyliert
H3K9me3	H3K9trimethyliert
H4	Histon 4
HCl	Salzsäure, bestehend aus Wasserstoff (H) und Chlor (Cl)

HR	Homologe Rekombination
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
IR	<i>Ionic radiation</i> , ionisierende Strahlung
Ku	Heterodimer, bestehend aus Ku70 und Ku80, stabilisiert die DNA-Bruchenden
kV	Kilovolt
LaB <sub>6</sub>	Kathode, bestehend aus LaB <sub>6</sub> (lat.: <i>lanthanum hexaboride</i> )
LET	Linearer Energie Transfer
LMDS	<i>Locally multiply damage site</i>
M	Mitose-Phase im Zellzyklus, Zellteilung
M	Molare Masse
m	Masse
MRN	Komplex von Reparaturproteinen, bestehend aus Mre11 ( <i>meiotic recombination protein 11</i> ), Rad50 und Nbs1 ( <i>Nijmegen breakage syndrome 1</i> )
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MV	Mega-Elektronenvolt
N	Stickstoff (lat.: <i>nitrogenium</i> )
n	Brechzahl
NaSCN	Natriumisothiozyanat
NHEJ	Nicht-Homologes End-Joining
Ni	Nickel
nm	Nanometer
O	Sauerstoff (grie.: <i>oxygenium</i> )
OH	Hydroxyl-Gruppe
OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
P	Phosphat, Bestandteil der DNA
P	Polschuh
PBS	Gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	Maß für den sauren/basischen Charakter einer Lösung
PIKKs	Phosphatidyl-inositol-3 Kinase-ähnliche Kinasen
R	Rest, Abkürzung in chemischen Formeln
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
S	Ribose, Bestandteil der DNA
S	Synthesephase im Zellzyklus, Verdopplung der DNA
T	Thymin, DNA-Base, Purin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskop
UA	Uranylacetat
UV	Ultraviolette Strahlung
w/v	Mischung zweier Stoffe nach Gewicht und Volumen (engl.: <i>weight/volume</i> )
XRCC4	<i>X-ray repair crosscomplementing</i> , an der DSB-Reparatur beteiligtes Protein
λ	Wellenlänge



## 9. Veröffentlichungen

### Publikationen

1. Schanz S, Schuler N, **Lorat Y**, Fan L, Kaestner L, Wennemuth G, Rube C, Rube CE. Accumulation of DNA damage in complex normal tissues after protracted low-dose radiation. DNA Repair 2012 Oct. 1; 11(10):823-832. PubMed – in process.
2. **Lorat Y**, Schanz S, Schuler N, Wennemuth G, Rube C, Rube CE (2012). Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by Transmission Electron Microscopy, PLoS ONE 2012; 7(5): e38165. Epub 2012 May 30. NCBI-PubMed: 22666473
3. Rube CE, **Lorat Y**, Schuler N, Schanz S, Wennemuth G, Rube C (2011). DNA repair in the context of chromatin: New molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. DNA Repair 2011 Apr. 3; 10(4):427-437. Epub 2011 Feb. 20. NCBI-PubMed:21342792

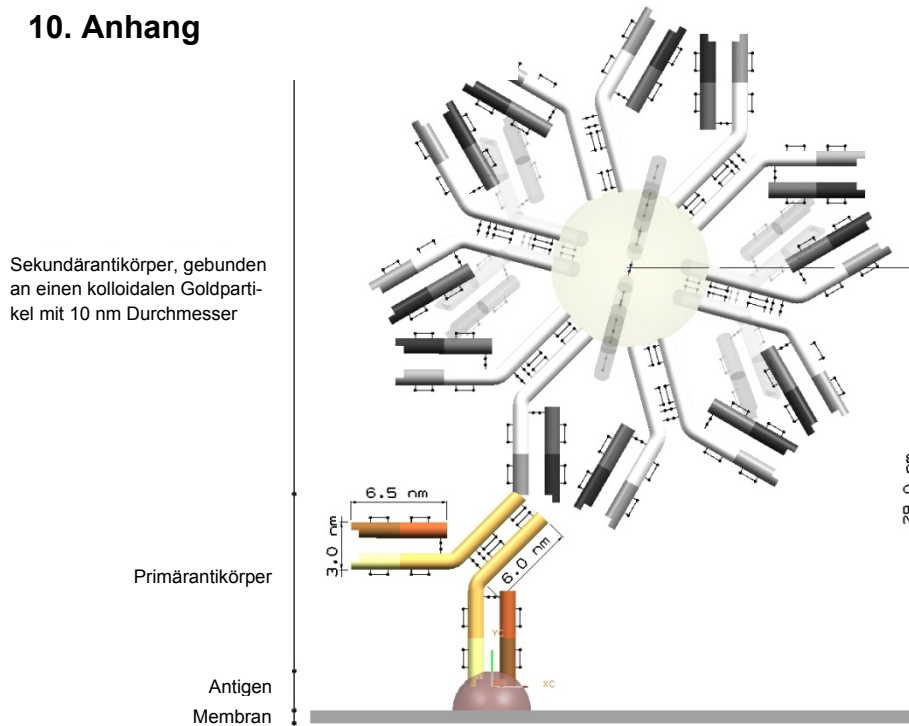
### Vorträge

1. 11th Biennial DGDR Meeting, German Society for Research on DNA Repair, Jena, 07. bis 10. Oktober 2010.
2. Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS), Jahrestagung in Hamburg, 01. bis 02. September 2010

### Poster

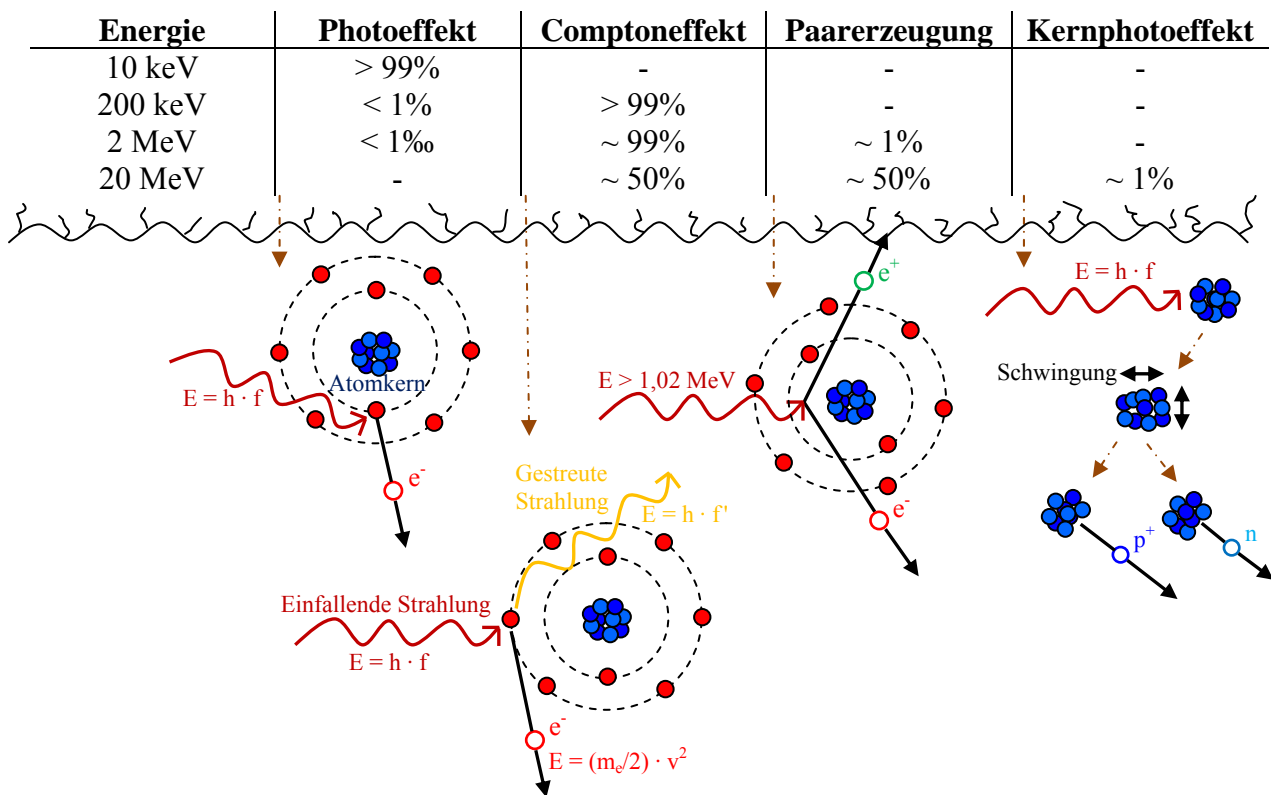
1. Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie e.V. (DEGRO), 18. Jahrestagung in Wiesbaden, 07. Bis 10. Juni 2012
2. Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS), Jahrestagung in Köln, 13. bis 16. September 2011
3. Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS), Jahrestagung in Hamburg, 01. bis 02. September 2010

### 10. Anhang



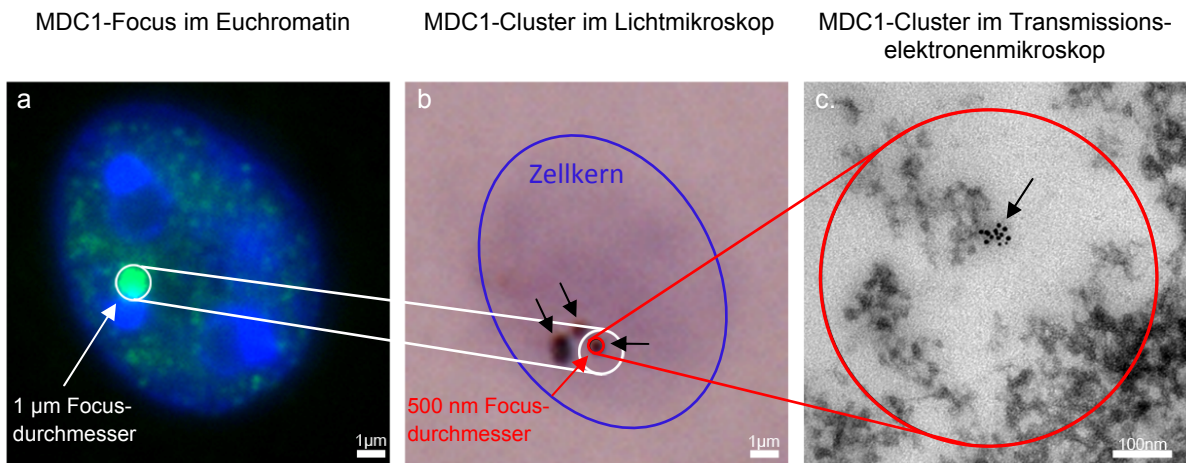
#### Anhang 1: 3D-Rekonstruktion eines immunhistochemischen Detektionssystems

Der Abstand zwischen nachzuweisendem Antigen und sekundärantikörpergebundenem Goldpartikel, der letztendlich mittels TEM visualisiert wird, beträgt maximal 28 nm. Die Zeichnung wurde maßstabsgetreu mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Udo Umlauf und der Siemens Software Unigraphics rekonstruiert.



#### Anhang 2: Energieübertragung von Photonenstrahlung in Materie

Abhängig von der Photonenenergie werden Wechselwirkungen in der Materie induziert. Die Wahrscheinlichkeiten der verschiedenen Effekte sowie die emittierten Sekundärteilchen sind für unterschiedliche Energien, von 10 keV bis 20 MeV dargestellt. Welcher der Prozesse stattfindet ist jedoch nicht nur von der Energie des einfallenden Photons abhängig, sondern wird ebenfalls maßgeblich von der Kernladungszahl Z der absorbierenden Materie mitbestimmt. (Modifizierte Abbildung, ursprünglich aus Krieger B., 2007 und Fritz-Niggli, H., 1988).



### Anhang 3: Übertragung und Größenvergleich zwischen lichtmikroskopisch sichtbaren Foci und elektronenmikroskopisch visualisierten Clustern.

Die Markierung von MDC1 erfolgte in murinen kortikalen Neuronen, 30 Minuten nach der Bestrahlung mit 2 Gy.

a. In dem DAPI-gefärbten Zellkern ist am Randbereich einer heterochromatischen Domäne (dunkelblau) der MDC1-Focus (grün) mittels Immunfluoreszenzmikroskopie gut sichtbar. Der umgebende weiße Kreis verdeutlicht die vom Focus beanspruchte Fläche (Durchmesser: 1 µm).

b. Immunhistochemische Markierung von MDC1 unter Verwendung des gleichen Primärantikörpers, jedoch in Kombination mit einem goldmarkiertem Sekundärantikörper (Immunogold, Goldpartikelgröße: 10 nm) anstelle eines Fluorochrom-Konjugats. In dieser lichtmikroskopischen Aufnahme sind die MDC1-Foci (Pfeile) wegen der Goldpartikel als schwarze Punkte zu erkennen. Der Durchmesser für diesen MDC1-Focus beträgt nun 500 nm (roter Kreis). Im Vergleich ist der Durchmesser des zuvor mittels Fluoreszenzmikroskopie detektierten Foci (weißer Kreis) erneut dargestellt.

c. Diese elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt einen Ausschnitt des Zellkerns, heterochromatische Regionen (grau) sind gut von euchromatischen Domänen (hell) zu unterscheiden. MDC1, markiert mittels Immunogold, ist deutlich als Cluster (Pfeil) zu erkennen. Innerhalb des roten Kreises befindet sich exemplarisch ein 500 nm-Bereich, der zuvor auch in Abbildung b rot umrandet dargestellt wurde. Der Bereich, den ein fluoreszierender Focus einnehmen würde (weißer Kreis), wäre noch einmal doppelt so groß und konnte deshalb nicht in dieser Grafik dargestellt werden.

## 11. Danksagung

- Mein besonderer Dank gilt der Leiterin des Labors für molekulare Radioonkologie des Universitätsklinikums Homburg/Saar *Frau Prof. Dr. med. Claudia E. Rübe* für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung dieser Doktorarbeit, die Freiheit bei der Planung der Experimente sowie die stetige Unterstützung. Danke, Dok-Mama.
- Bei Herrn *Prof. Dr. med. Christian Rübe*, dem Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Homburg/Saar bedanke ich mich für die Möglichkeit, neben meiner Arbeit als Medizin-Physik-Expertin, im experimentellen Umfeld des Radioonkologischen Labor tätig sein zu dürfen.
- Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Labors für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich...

...*Frau Dipl. Biol. Nadine Schuler* für die gemeinsame Zeit im Labor, den regen Gedankenaustausch und all die guten Gespräche beim morgendlichen Kaffee.

...*Frau Dipl. Chem Stefanie Schanz* für die enge Zusammenarbeit in themenverwandten Projekten sowie für die Anregungen und neuen gedanklichen Ansatzpunkte.

...*Frau Dipl. Biol. Christina Brunner* für das Korrekturlesen und die grammatikalischen Verbesserungsvorschläge meiner Dissertation. Wer denkt sich nur solche Kommaregeln aus?

...*Frau Daniela Jung* für die stetige Unterstützung bei allen laborrelevanten Dingen, von Bestellungen bis hin zur Zellkultur.

Liebe Frauschaft, ihr alle seid mir zu Freunden geworden.

- Herzlichen Dank an *Prof. Dr. med. Gunther Wennemuth* für die Kooperation, den Zugang zur Infrastruktur und Messgeräten im Fachbereichen Anatomie und Zellbiologie und die mir hierdurch gegebenen Möglichkeiten.

Insbesondere danke ich *Herrn Norbert Pütz* und *Frau Birgit Leis* für die Einarbeitung „Rund ums TEM“, die stetige Hilfsbereitschaft und Beantwortung meiner zahlreichen Fragen, für die lebensnahen Gespräche und all die schönen, bleibenden Erinnerungen an diese Zeit.

- Die über Nacht fixierten Gewebe wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. med. Wolfgang Feiden* (Neuropathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes) automatisiert in Paraffin eingebettet. Vielen Dank dafür.
- *Meinen Kindern* danke ich für ihr Verständnis, vor allem wenn ich nach einem langen Tag abends nicht mehr optimal aufnahmefähig war. Ihr gebt mir so viel Freude, Energie und unzählige Gründe, um glücklich zu sein.

*My 1*, mit Dir an meiner Seite kann ich all meine Träume erreichen. Danke, dass es Dich für mich gibt.

