

Aus dem Bereich Strahlentherapie und Radioonkologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# Strahleninduzierte DNA-Schäden im Kontext des Chromatins: Elektronenmikroskopische Analysen humaner Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2018

vorgelegt von: M.Sc. Sara Timm  
geb. am: 07.07.1987 in Bünde

Berichtersteller:

**Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier**

Vorsitzender:

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

Tag der mündlichen Prüfung:

## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| 1. Zusammenfassung/ Summary.....  | 2  |
| 2. Einleitung.....  | 1  |
| 2.1 Ionisierende Strahlung .....  | 1  |
| 2.1.1 Linearer Energietransfer .....  | 2  |
| 2.1.2 Strahleneffekte im biologischen System, Dosis und relative biologische<br>Wirksamkeit .....                               | 4  |
| 2.2 DNA Reparaturmechanismen.....   | 5  |
| 2.2.1 Chromatinstruktur und Organisation der DNA innerhalb des Zellkerns.....   | 5  |
| 2.2.2 Strahleninduzierte DNA-Schäden und die zelluläre Schadensantwort.....   | 8  |
| 2.2.2.1 DNA-Schadensantwort und deren Auswirkung auf die Chromatinstruktur<br>.....   | 9  |
| 2.2.2.2 DNA-Reparaturwege der Zelle.....  | 12 |
| 2.3 Nachweismethoden von DNA-Doppelstrangbrüchen .....  | 14 |
| 2.3.1 Immunfluoreszenzmikroskop und Transmissionselektronenmikroskop im<br>Vergleich .....                                      | 17 |
| 3. Fragestellungen.....   | 19 |
| 4. Material und Methoden .....  | 20 |
| 4.1 Material und Geräte.....  | 20 |
| 4.2 Methoden .....  | 26 |
| 4.2.1 Übersicht über die durchgeführten Experimente .....   | 27 |
| 4.2.2 Zellkultur und verwendete Zelltypen.....  | 28 |
| 4.2.3 Bestrahlung.....  | 28 |
| 4.2.3.1 Low-LET Bestrahlung mit Photonen .....  | 29 |
| 4.2.3.2 High-LET Bestrahlung mit Calcium oder Carbon .....  | 30 |
| 4.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie.....  | 31 |
| 4.2.4.1 Fixierung, Einbettung und Markierung der Reparaturfaktoren mittels<br>Immunfluoreszenz .....                            | 31 |
| 4.2.4.2 Lichtmikroskopischer Nachweis von Reparaturfaktoren: Quantifizierung,<br>Messung und Auswertung von Reparaturfoci ..... | 32 |
| 4.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie .....  | 32 |
| 4.2.5.1 Fixierung und Einbettung der Zellen .....   | 33 |
| 4.2.5.2 Beschichtung von Nickel-Grids mit Pioloform .....   | 34 |
| 4.2.5.3 Sektionierung der Präparate mittels Ultramikrotom.....  | 35 |
| 4.2.5.4 Immuno-Gold-Markierung .....  | 36 |
| 4.2.5.4.1 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL).....  | 37 |
| 4.2.5.4.2 Kontrastierung und Analyse am TEM (Quantifizierung am TEM) .....  | 38 |

|  |   |
|--|---|
| 5. Ergebnisse.....   | 42  |
| 5.1 Identifizierung und Charakterisierung der Chromatinstruktur in HSF1-Zellen..   | 42  |
| 5.1.1 Untersuchung der Chromatinstruktur: Euchromatische und heterochromatische Chromatinmodifikationen in HSF1-Zellen ..... | 42  |
| 5.2 Die Chromatinstruktur nach Bestrahlung.....  | 46  |
| 5.3 Chromatinveränderungen stehen in Verbindung mit der Akkumulation verschiedenster Reparaturfaktoren .....                 | 54  |
| 5.3.1 Globale Verteilung und spezifische Akkumulation von Reparaturfaktoren nach Low-LET Bestrahlung.....                    | 55  |
| 5.3.2 Die Reparaturfaktoren der DNA-Schadensantwort vermitteln nach High-LET Bestrahlung die Ausbildung der DCRs.....        | 62  |
| 5.4 Die Chromatinöffnung steht in Verbindung mit der Reparatur.....  | 66  |
| 5.4.1 Die Proteine pKu70, pKu80 und pDNA-PKcs als Marker für DSBs.....   | 66  |
| 5.4.2 TUNEL .....  | 74  |
| 5.4.3 Quantitativer Vergleich nach Low-LET und High-LET Bestrahlung mittels TEM .....  | 76  |
| 5.4.4 Lokalisationsmessungen .....   | 84  |
| 6. Diskussion .....  | 89  |
| 6.1 Der Zustand des Chromatins beeinflusst maßgeblich die strahleninduzierte DSB Reparatur .....                             | 90  |
| 6.2 Die Strahlenqualität hat einen erheblichen Einfluss auf die DNA-Schadensantwort sowie Reparatur.....                     | 93  |
| 6.2.1 Der Einfluss von Low-LET Bestrahlung mit Photonen.....   | 93  |
| 6.2.2 Der Einfluss von High-LET Bestrahlung mit Schwerionen .....  | 95  |
| 7. Ausblick .....  | 101                                       |
| 8. Verzeichnisse .....   | i   |
| 8.1 Literatur .....  | i   |
| 8.2 Abbildungen .....  | vi  |
| 8.3 Tabellen.....  | vii                                       |
| 8.4 Abkürzungen .....  | viii                                      |
| 9. Veröffentlichungen.....   | x   |
| 10. Anhang .....   | xi  |
| 10. Danksagung .....   | xiii                                      |
| 11. Lebenslauf .....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |

## 1. Zusammenfassung/ Summary

Die Reparatur von strahleninduzierten Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Doppelstrangbrüchen ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. Inwieweit die Dichte und Komplexität von strahleninduzierten DNA-Schäden (DNA-Schadensmuster) einen Einfluss auf die Chromatinstruktur nehmen und die Reparatur beeinflussen, stellen wichtige und zu klärende Fragen dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane, dermale Fibroblasten mit verschiedenen Strahlenqualitäten bestrahlt, um das DNA-Schadensmuster sowie Veränderungen in der Chromatinstruktur während der DNA-Schadenantwort und im zeitlichen Verlauf des Reparaturprozesses zu charakterisieren. Dabei konnten nach der Bestrahlung verschiedene Reparaturfaktoren über immunologische Markierungen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie oder Transmissionselektronenmikroskopie genauer untersucht werden. Mit der hochauflösenden Transmissionselektronenmikroskopie wurden die zentralen Reparaturproteine der Nicht-homologen End-zu-End Verknüpfung auf Einzelmolekülebene im Chromatinkontext (Euchromatin, Heterochromatin) dargestellt.

Im Verlauf der DNA-Schadenantwort konnten sowohl nach Photonenbestrahlung, als auch nach Teilchenbestrahlung Chromatinumstrukturierungen festgestellt werden. Insbesondere nach der Teilchenbestrahlung traten massive, dekondensierte Chromatin-Regionen auf. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Chromatinveränderungen mit der Akkumulation der verschiedenen Reparaturfaktoren assoziiert waren und in Verbindung mit der Reparatur standen. Dabei traten nach Photonenbestrahlung isolierte DNA-Schäden im gesamten Zellkern auf, die effizienter als nach Teilchenbestrahlung repariert werden konnten. Nach Teilchenbestrahlung zeigten sich hingegen zahlreiche Doppelstrangbrüche in räumlicher Nähe zueinander, die überwiegend in der heterochromatischen Peripherie der dekondensierten Chromatin-Regionen lokalisiert waren. Diese komplexen Schäden, die vermutlich in Verbindung mit den massiven Chromatinveränderungen standen, wurden zeitlich verzögert und ineffizient repariert. Dabei besteht die Annahme, dass sie die Wiederherstellung der ursprünglichen Chromatinkonstitution verhinderten und somit die funktionelle Organisation der Zelle beeinflussten. Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass die Reparatur maßgeblich durch das DNA-Schadensmuster beeinflusst wird. Die Umstrukturierung des Chromatins ist dabei ein

essentieller Prozess und nimmt somit eine wichtigere Rolle ein, als bisher angenommen wurde.

The repair of radiation-induced DNA (deoxyribonucleic acid) double-strand breaks is crucial for maintaining genomic integrity. The effect that the density and complexity of these radiation-induced damages has on chromatin structure and repair efficiency poses a considerable question.

In this study, human dermal fibroblasts were irradiated with various radiation qualities to characterize DNA damage patterns, as well as, changes in chromatin structure during the DNA damage response within the time course of the repair process. Following irradiation, several repair factors were investigated by immunofluorescence microscopy or transmission electron microscopy. Using high-resolution transmission electron microscopy, the central repair proteins of the non-homologous end-joining repair pathway could be visualized in the context of the chromatin ultrastructure (euchromatin, heterochromatin) at a single-molecule level.

In the course of the DNA damage response, chromatin reorganization was detected after both photon irradiation and charged particle irradiation. In particular, massive decondensed chromatin regions appeared after particle irradiation. Further investigations showed that these chromatin alterations were associated with the accumulation of various repair factors and the repair process. Photon irradiation resulted in isolated DNA damage throughout the entire nucleus which subsequently was efficiently repaired. After particle irradiation, however, numerous double-strand breaks were found in close proximity and located predominantly in the heterochromatic periphery of the decondensed chromatin regions. These complex damages are believed to be related to the massive chromatin changes and their repair was delayed and inefficient. It is assumed that this prevented the restoration of the original chromatin constitution and thus influenced the functional organization of the cell. These findings clarify that repair efficiency is significantly influenced by the DNA damage pattern. Chromatin restructuring is therefore an essential process and plays a more decisive role than previously thought.

## 2. Einleitung

Die Strahlentherapie ist neben der Chemotherapie und der chirurgischen Entfernung eines Tumors die zentrale Behandlungsmöglichkeit bei Krebserkrankungen. Das Ziel einer perkutanen Strahlentherapie ist es, durch ionisierende Strahlung (*ionic radiation*, IR) eine möglichst hohe Strahlendosis am Tumor zu platzieren (maximale Tumorkontrolle), um die Tumorzellen am Wachstum zu hindern oder diese zu vernichten. Gleichzeitig wird die bestmögliche Schonung des Normalgewebes angestrebt. Für die Bestrahlung der Patienten wird primär Photonenstrahlung (ultraharte Röntgenstrahlen), aber auch Elektronenstrahlung verwendet. Bei einer speziellen Indikation, beispielsweise, wenn ein Tumor besonders strahlenresistent ist und/oder nah bei Risikoorganen liegt, werden geladene Teilchen (Protonen oder Schwerionen, z.B. Kohlenstoffionen) für die Bestrahlung verwendet (Schlaff, Krauze, Belard, O'Connell, & Camphausen, 2014). Diese Therapieform bedeutet allerdings einen sehr viel größeren technischen Aufwand und es gibt derzeit nur wenige Behandlungszentren, die eine solche Therapie umsetzen können. Der Vorteil dieser Therapie begründet sich dabei im unterschiedlichen Eindringverhalten der Partikel im Vergleich zu Photonen. Photonenstrahlung besitzt eine hohe Dosis im Eintrittsbereich, die sich allmählich abschwächt. (Richter & Feyerabend, 2013; Wannemacher, Wenz, & Debus, 2013). Die geladenen Teilchen hingegen werden beim Durchdringen von Zellen im Gewebeverband kontinuierlich abgebremst und deponieren die höchste Energie erst gegen Ende ihrer Reichweite. Die Energiedeposition ist am sogenannten *Bragg Peak* (Maximaler Energieverlust pro Wegeinheit) somit am stärksten. Somit kann im Tumor eine hohe Dosis präzise platziert werden, während das Normalgewebe geschont wird (Amaldi & Kraft, 2005).

### 2.1 Ionisierende Strahlung

Atome sind die Grundbausteine von Materie. Nach dem Bohr'schen Atommodell besteht ein Atom aus einem Atomkern mit Protonen ( $p^+$ : positiv geladen) und Neutronen ( $n$ : neutral) und einer Atomhülle, in der sich Elektronen ( $e^-$ : negativ geladen) auf Bahnen (Schalen) um den Kern bewegen. Ein Atom ist elektrisch neutral, was bedeutet, dass die Anzahl der Protonen denen der Elektronen entspricht. Durch IR werden Atome und Moleküle ionisiert, wodurch Elektronen aus ihren Schalen freigesetzt werden (Sekundärelektronen) und aus elektrisch neutralen Atomen oder Molekülen positiv oder negativ geladene Teilchen erzeugt werden. IR kann aus

## 2. Einleitung

Teilchen- oder elektromagnetischer Strahlung bestehen und wird durch ihre Bestandteile, Quelle und Wirkung klassifiziert.

Elektromagnetische Strahlung besteht aus Photonen, zu der Gamma- und Röntgenstrahlung zählen. Da Photonen weder eine Masse noch eine Ladung besitzen, ist ihre Reichweite unbegrenzt. Teilchenstrahlung ist der Überbegriff für alle Strahlungen, deren Energieträger eine Masse ungleich Null besitzen. In diese Kategorie fallen Alpha- und Betastrahlung, aber auch Neutronenstrahlung.

Durchdringt energiereiche Strahlung Materie, zum Beispiel Zellen im Gewebeverband, wird dort Energie deponiert. Die Energie wird auf Elektronen übertragen, welche sich daraufhin aus ihrer Schale lösen, dabei chemische Verbindungen zerstören und somit vielfältige intrazelluläre Schäden induzieren, die letztendlich Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben können (Graewe, 1963; Lindner, 1960; Müller, 1990; Wannemacher et al., 2013).

### 2.1.1 Linearer Energietransfer

Die Dosis pro Zeit von IR wird entlang der Wegstrecke durch die Materie geringer, infolge der Wechselwirkungen der Absorptionsereignisse. Anhand der Abstände dieser Ionisationsereignisse wird lockere und dichte IR unterschieden, je nach Abhängigkeit der räumlichen Entfernung und Verteilung. Während Photonenstrahlung entlang der Wegstrecke zufällig verteilte Ionisationen verursacht, die weit voneinander entfernt liegen (locker ionisierend), induzieren Protonen, Alphateilchen, schnelle Neutronen und Schwerionen entlang ihrer Wegstrecke viele nah beieinander liegende Ionisationen (dicht ionisierend).

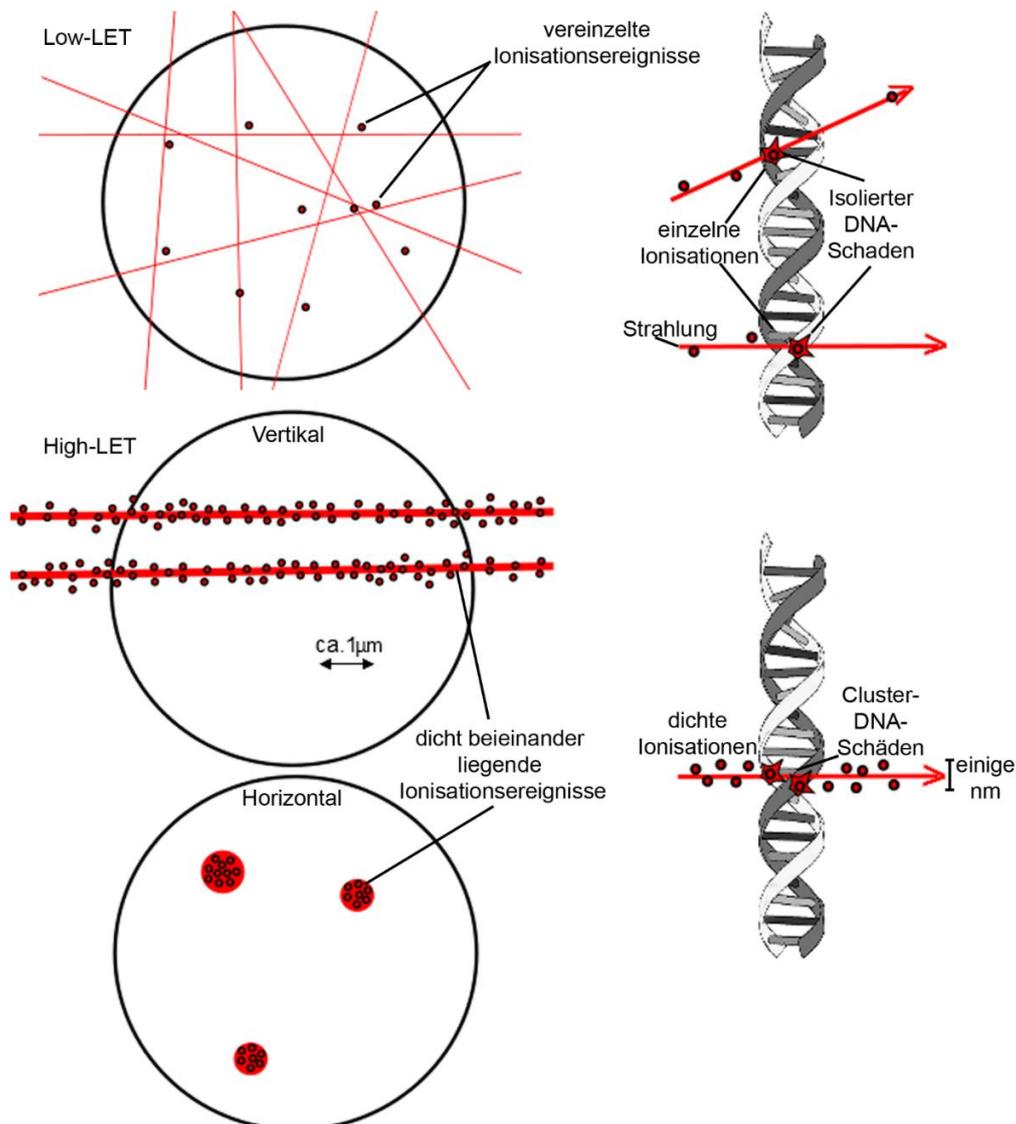
Der lineare Energietransfer (LET) bietet ein Maß für die Anzahl an Ionisationen pro Strecke und ist definiert als Quotient der auf der Teilchenbahn abgegebenen und absorbierenden Energie  $dE$  (Energieverlust des Teilchens) durch den dabei zurückgelegten Weg  $ds$ .

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

Der LET verändert sich in Abhängigkeit von dem Verlust von Energie und der Geschwindigkeit der Teilchen, wodurch ebenfalls die Eindringtiefe beeinflusst wird. Während ein langsames Teilchen mit hoher Ladung einen hohen LET (High-LET) besitzt, hat ein schnelles Teilchen mit geringer Ladung einen niedrigeren LET (Low-LET). Teilchenstrahlung mit einem High-LET gibt ihre Energie schnell ab, während Teilchenstrahlung mit einem Low-LET eine geringere Energieübertragung aufweist

## 2. Einleitung

und somit tiefer in die Materie eindringen kann, bis eine weitere Ionisation stattfindet. Für eine mit Photonen bestrahlte Zelle induziert Low-LET Strahlung im gesamten Zellkern immer wieder Ionisationen, die in isolierten DNA-Schäden resultieren (Abbildung 1, oben). Hingegen induziert eine Strahlung mit High-LET entlang ihrer Teilchenspur („Track“) Ionisationscluster aus nah beieinander liegenden DNA-Schäden (Cluster-DNA-Schaden) (siehe Abbildung 1, unten) (Kadhim, 2003; Krieger, 2010; Urushibara et al., 2006). Durch den LET unbeachtet bleibt der Energieverlust, der nicht lokal wirkt und beispielsweise durch die verteilte Energiedeposition von Sekundärelektronen zustande kommt. Diese Energien haben ebenfalls einen Anteil an der lokalen Wirkung und den induzierten DNA-Schäden.



**Abbildung 1: DNA-Schäden nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten**

Zellen weisen, je nach Bestrahlungsqualität, unterschiedliche DNA-Schadensmuster auf. Die Bestrahlung mit Low-LET verursacht isolierte DNA-Schäden, die im gesamten Zellkern (schwarze Kreise) auftreten. Werden Zellen mit High-LET bestrahlt, zum Beispiel mit Kohlenstoffionen, verursachen diese auf ihrer Spur dicht beieinander liegende DNA-Schäden, sogenannte Cluster-DNA-

## 2. Einleitung

Schäden. Diese stellen sich, je nach Betrachtungsebene, unterschiedlich dar. Modifizierte Abbildung (Kadhim, 2003; Urushibara et al., 2006).

### 2.1.2 Strahleneffekte im biologischen System, Dosis und relative biologische Wirksamkeit

Die Empfindlichkeit von Zellen auf Strahlung, vor allem auf die im Zellkern verpackte DNA, wurde schon früh erkannt und eine entsprechende Schädigung kann durch direkte oder indirekte Strahleneffekte induziert werden (Moiseenko, Edwards, Nikjoo, & Prestwich, 1997; Munro, 1970a, b; Nikjoo, O'Neill, Goodhead, & Terrissol, 1997). Beim direkten Strahleneffekt werden durch entstandene Sekundärelektronen DNA-Schäden verursacht, was zum Aufbrechen von kovalenten Bindungen und somit zu Einzelstrangbrüchen (ESBs) oder Doppelstrangbrüchen (DSBs) führen kann. Ein direkter Strahleneffekt tritt vor allem bei Strahlungsarten mit einem High-LET auf. Beim indirekten Strahleneffekt wird durch Sekundärelektronen Energie auf Wasser übertragen. Durch die Radiolyse des Wassers werden Peroxide, Ionen und freie Radikale erzeugt, die an der DNA Schäden verursachen (Hall & Giaccia, 2012; Kiefer, 2013). Da Zellen zu einem Großteil aus Wasser bestehen (Steven & Dwight, 1994), wird der größte Teil der Energie vom Wasser absorbiert. Bei der Wechselwirkung eines Photons mit einem Wassermolekül kann dieses unter Entstehung eines Radikals ionisiert werden ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$  (Ionisation)). Das entstandene, instabile und hochreaktive  $\text{H}_2\text{O}^+$ -Radikal besitzt ein ungepaartes Elektron und erzeugt mit einem weiteren Wassermolekül ein Hydroniumion sowie ein Hydroxylradikal ( $\text{H}_2\text{O}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}\cdot$ ). Durch Strahlung kann es, neben der Ionisation, ebenfalls zu einer Anregung von Wasser mit einer anschließenden Homolyse kommen. Diese Reaktion bringt ebenfalls ein Hydroxylradikal hervor ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}\cdot + \text{OH}\cdot$  (Spaltung)). Hydroxylradikale zeigen eine hohe Reaktivität und besitzen dadurch eine geringe Reichweite. Sie diffundieren nicht weiter als zwei Moleküldurchmesser, verursachen allerdings, wenn sie nur wenige Nanometer (nm) entfernt von der DNA entstehen, DNA-Läsionen (Goodhead, 1994; Marnett, 2000). Für die Beurteilung der Strahlenwirkung auf biologisches Material ist die deponierte Energie entscheidend. Die Energiedosis gibt die absorbierte Energie pro Masse an und wird in der Einheit „Gray“ (Gy) angegeben ( $1\text{Gy} = 1 \text{ Joule (J) pro } 1 \text{ Kilogramm (kg)}$ ) (Koelzer, 2014). Um einen Vergleich zwischen verschiedenen Strahlenarten durchführen zu können, die in biologischem Material bei gleicher Dosis verschieden wirken, wird der Unterscheidungsfaktor der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW) verwendet. Sie

## 2. Einleitung

ist definiert als das Verhältnis einer Bezugsstrahlendosis  $D_{\text{Ref}}$  (Referenzstrahlung, z.B. 250 kV Röntgenstrahlung oder Co-60 Gammastrahlung), die einen bestimmten biologischen Effekt hervorruft, zur Dosis einer vergleichenden anderen Strahlung  $D_{\text{Test}}$ , die für das Eintreten der gleichen Wirkung, unter gleichen Bedingungen, am gleichen biologischen Objekt notwendig ist.

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

Die RBW ist abhängig von der Dosisleistung, der örtlichen Dosisverteilung, der Ionisationsdichte, der unterschiedlichen Beschaffenheit des Gewebes und der Art der beobachteten Schädigung. Beispielsweise besitzt die Dosis von 1 Gy  $\alpha$ -Teilchen durch den höheren LET eine zeh- bis zwanzigfach höhere RBW und 1 Gy Protonen sowie schnelle Neutronen eine zehnfach höhere biologische Wirksamkeit, als 1 Gy Röntgenstrahlung (Cutnell, Johnson, Young, & Stadler, 2015; Nikjoo et al., 1997).

### 2.2 DNA Reparaturmechanismen

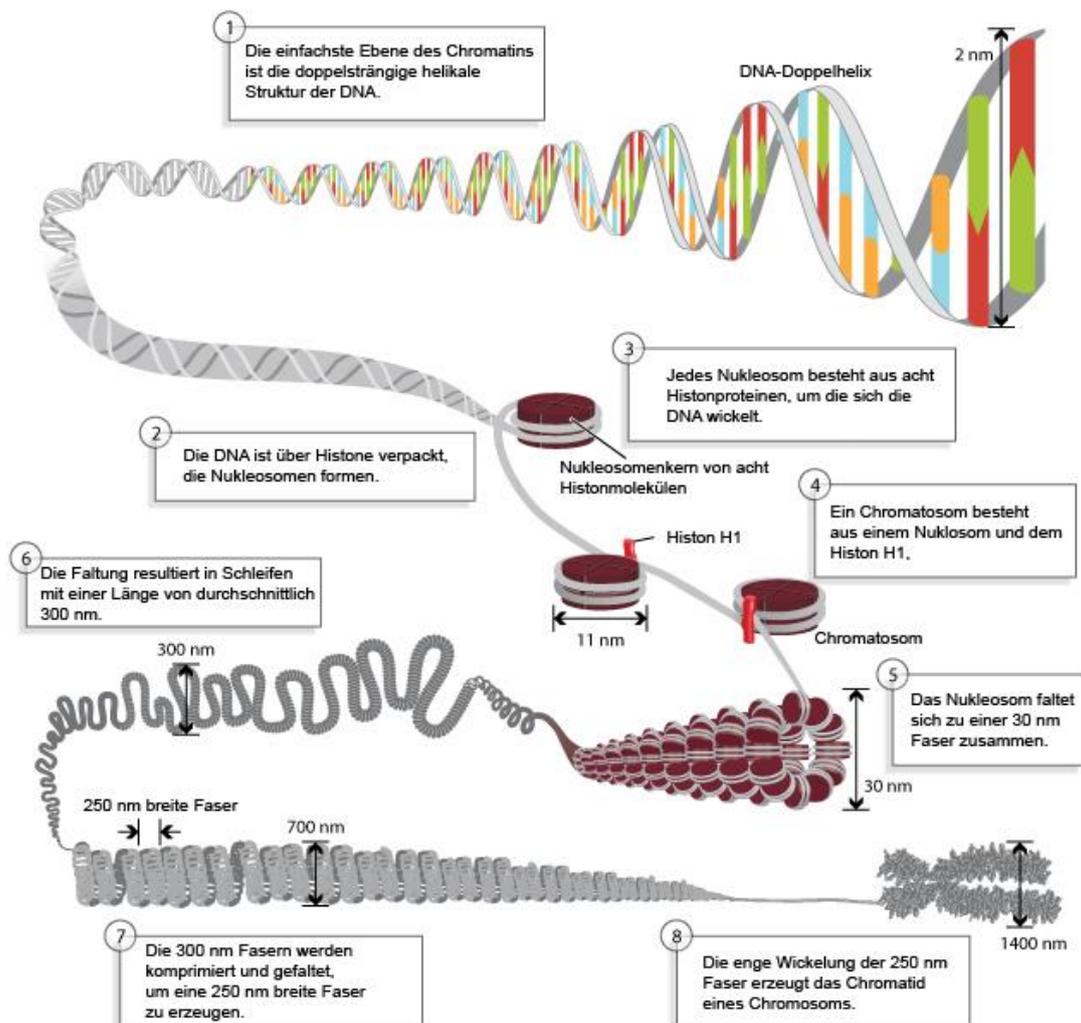
Die genetische Information in eukaryotischen Zellen liegt hochkompakt im Zellkern vor. Über eine dynamische Regulation werden die verschiedenen Chromatinzustände organisiert. Ein durch Strahlung verursachter DNA-Schaden resultiert in einer zellulären Schadensantwort, bei der infolge des Signals Reparaturproteine die Läsion erkennen, diese im hochstrukturierten, übergeordneten Chromatin freilegen und möglichst effizient reparieren, damit die fehlerfreie Erhaltung der in der DNA hinterlegten, genetischen Information gewährleistet bleibt.

#### 2.2.1 Chromatinstruktur und Organisation der DNA innerhalb des Zellkerns

Die chromosomale DNA wird im Zellkern von Eukaryonten mithilfe von Histonen verpackt. Diese positiv geladenen Proteine, die stark mit der negativ geladenen DNA interagieren, formen Komplexe bzw. Ketten aus Nukleosomen (Abbildung 2) (Pierce, 2017). Die Nukleosomen sind mit einer Masse von 100 kDa die kleinsten Untereinheiten des Chromatins (Kornberg & Lorch, 1999; Luger, Mader, Richmond, Sargent, & Richmond, 1997). Jedes Nukleosom setzt sich aus einem Oktamer der vier Kernhistone (H3, H4, H2A, H2B) zusammen sowie aus den etwa 146 Basenpaaren (bp) DNA, die 1,7-fach linksgängig superhelikal um das Oktamer gewickelt ist (Downs et al., 2007). Spezielle Histondomänen fungieren als Vermittler von Interaktionen innerhalb des Histon-Oktamers und interagieren mit den beiden Windungen der nukleosomalen DNA. Durch das Linker-Histon H1 werden die einzelnen Nukleosomen durch eine 10-20 bp lange freie „Linker-DNA“ voneinander separiert, was zu zwei

## 2. Einleitung

vollen Umdrehungen um das Oktamer führt und eine Struktur bildet, die als Chromatosom bezeichnet wird. Die Nukleosomen falten sich zusammen, wobei 6 Nukleosomen pro Windung die helikale Solenoidstruktur, eine 30-Nanometer-Chromatinfaser, bilden (Schleifen mit durchschnittlich 300 nm). Die 300 nm Fasern werden zusammengedrückt und gefaltet, um eine ca. 250 nm breite Faser zu erzeugen, die fest in das Chromatid eines Chromosoms integriert ist. Über bestimmte Proteine an der Kernmembran aufgehängt definieren sie, durch eine genaue Anordnung, bestimmte Chromosomen-Territorien. Eine so starke Kondensation tritt allerdings nur in der Metaphase des Zellzyklus auf, wenn das genetische Material an die Tochterzelle weitergeben werden muss, weshalb die Chromosomen auch Metaphasechromosomen genannt werden (Hansen, 2002; Pierce, 2017; Redon et al., 2002; Seyffert, 2003; Thoma, Koller, & Klug, 1979; Woodcock, Frado, & Rattner, 1984).



**Abbildung 2: Aufbau und Struktur des Chromatins**

Die DNA liegt als Doppelhelix vor und stellt die einfachste Ebene des Chromatins dar (1). Chromosomale DNA wird mithilfe von Histonen im Zellkern verpackt. Diese positiv geladenen Proteine, die stark an negativ geladener DNA haften, bilden gemeinsam die Nukleosomen (2). Jedes Nukleosom besteht aus 1,7-fach um die acht Histonproteine gewundener DNA (3 und 4). Die Nukleosomen falten sich zu einer Chromatinfaser (5), die Schleifen von durchschnittlich 300 nm Länge bildet (6). Diese

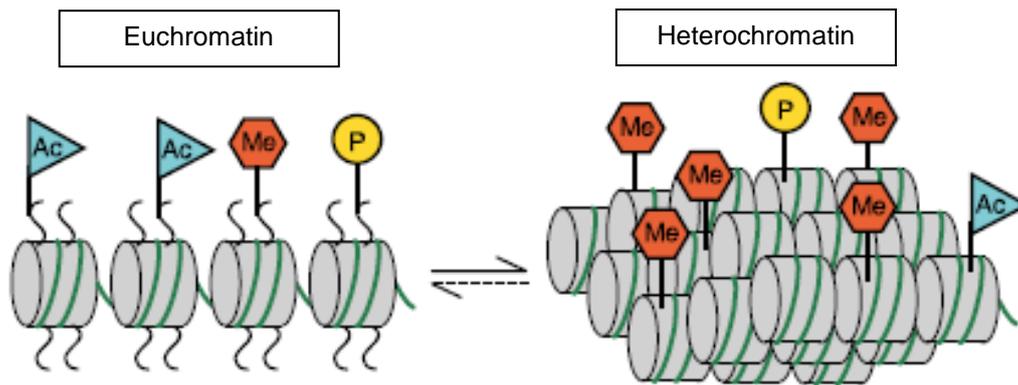
## 2. Einleitung

werden komprimiert, um eine 250 nm breite Faser zu bilden (7), die eng in das Chromatid eines Chromosoms eingegliedert ist (8). Modifizierte Abbildung (Pierce, 2017).

Die Kernhistone sind überwiegend kugelförmig, mit Ausnahme ihrer N-terminalen Reste, die unstrukturiert sind. Ein markantes Merkmal von Histonen ist die große Anzahl und Art der modifizierten Aminosäure-Gruppen (Downs et al., 2007; Kouzarides, 2007). Diese posttranslationalen Histonmodifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitylierung oder Sumoylierung) an den Aminosäuren (AS) der N-terminalen Histonarme spielen eine essenzielle Rolle für die übergeordnete Chromatinstruktur. Dabei wird in der Theorie des „Histoncodes“ die Hypothese vertreten, dass spezifische Histonmodifikationen mit bestimmten Chromatinzuständen assoziiert sind (Jenuwein & Allis, 2001; Strahl & Allis, 2000; Xu & Price, 2011).

Der dynamische Umbau des Chromatins (Remodeling) wird über zwei Hauptklassen von Proteinkomplexen gesteuert. Sowohl kovalente Histon-modifizierende Komplexe, als auch Adenosintriphosphat (ATP) -abhängige Chromatin-Remodeling-Komplexe steuern die Änderungen in der Chromatinstruktur (Misri, Pandita, Kumar, & Pandita, 2008; Wang, Allis, & Chi, 2007a, b). Die Histon-modifizierenden Komplexe induzieren das Hinzufügen oder Entfernen von verschiedenen chemischen Elementen an den Histonen. Über die daraus resultierenden Histonmodifikationen werden die Bindungsaffinitäten zwischen den Histonen, als auch zwischen den Histonen und der DNA gesteuert (Pilch et al., 2003; Rogakou, Boon, Redon, & Bonner, 1999; Rogakou, Pilch, Orr, Ivanova, & Bonner, 1998). Durch die Kombination von Chromatin-Remodeling und verschiedenen Histonmodifikationen können Zellen die dynamische Architektur des Chromatins regulieren (Xu & Price, 2011). Dabei existieren verschiedenste Übergangszustände des Chromatins, wobei morphologisch im eukaryotischen Zellkern (Interphase) zwei Chromatinstrukturen unterschieden werden: das diffuse, locker gepackte, aktive Euchromatin (EC) und das kondensierte dicht gepackte und inaktive Heterochromatin (HC) (Abbildung 3) (Seyffert, 2003).

## 2. Einleitung



**Abbildung 3: Euchromatin und Heterochromatin**

Die Kombination aus unterschiedlichen Histonmodifikationen beeinflusst den Zustand des Chromatins (Eu- bzw. Heterochromatin), Theorie des Histoncodes (Jenuwein & Allis, 2001).

Im Allgemeinen weisen Histone, die eine euchromatische Struktur vermitteln, einen hohen Grad an Acetylierungen auf, während die Methylierung sowohl bei euchromatischen als auch heterochromatischen Histonen auftritt (Xu & Price, 2011). Neben der Acetylierung und der Methylierung spielt ebenfalls die Phosphorylierung eine wichtige Rolle (Abbildung 3). Beispielsweise nimmt die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX am Serin139 ( $\gamma$ H2AX) eine zentrale Rolle in der DNA-Reparatur ein (Rogakou et al., 1998). Das dreifach methylierte Histon H3 am Lysin 9 (H3K9me3) sowie das dreifach methylierte Histon H3 am Lysin 27 (H3K27me3) werden mit dem kondensierten HC assoziiert (Bannister et al., 2001; Price & D'Andrea, 2013), wohingegen das acetylierte Histon H3 am Lysin 9 (H3K9ac) mit dem EC assoziiert wird (Hebbes, Thorne, & Crane-Robinson, 1988; Lorat et al., 2012; Rube et al., 2011). Die Acetylierung der basischen Aminosäure Lysin neutralisiert die positive Ladung, weshalb die Bindungsaffinität der negativ geladenen DNA abnimmt. Das führt zu einer lockeren Chromatinstruktur, sodass die DNA besser mit Proteinen wechselwirken kann (Fischle, 2009; Panier & Boulton, 2014). Die Methylgruppen hingegen verursachen keinerlei Ladungsänderung und fungieren vermutlich als Bindungsstelle für Chromatin-assoziierte Faktoren (Fischle, 2009; Misri et al., 2008). Als weitere Histonmodifikation, die in enger Verbindung mit der Chromatin-abhängigen DNA-Schadensantwort stehen soll, wird H4K16ac (Acetylierung des Histon H4 am Lysin 16) genannt (Gupta et al., 2008; Gupta et al., 2005; Li et al., 2010).

### 2.2.2 Strahleninduzierte DNA-Schäden und die zelluläre Schadensantwort

DNA-Schäden werden durch verschiedenste endogene und exogene Noxen verursacht (Abbildung 4). Dabei entstehen unterschiedliche Formen von Schäden, wie Basenveränderungen, DNA-DNA- sowie DNA-Protein-Verknüpfungen, ESBs und DSBs (Khanna & Jackson, 2001; Ward, Blakely, & Joner, 1985). DSBs sind für die

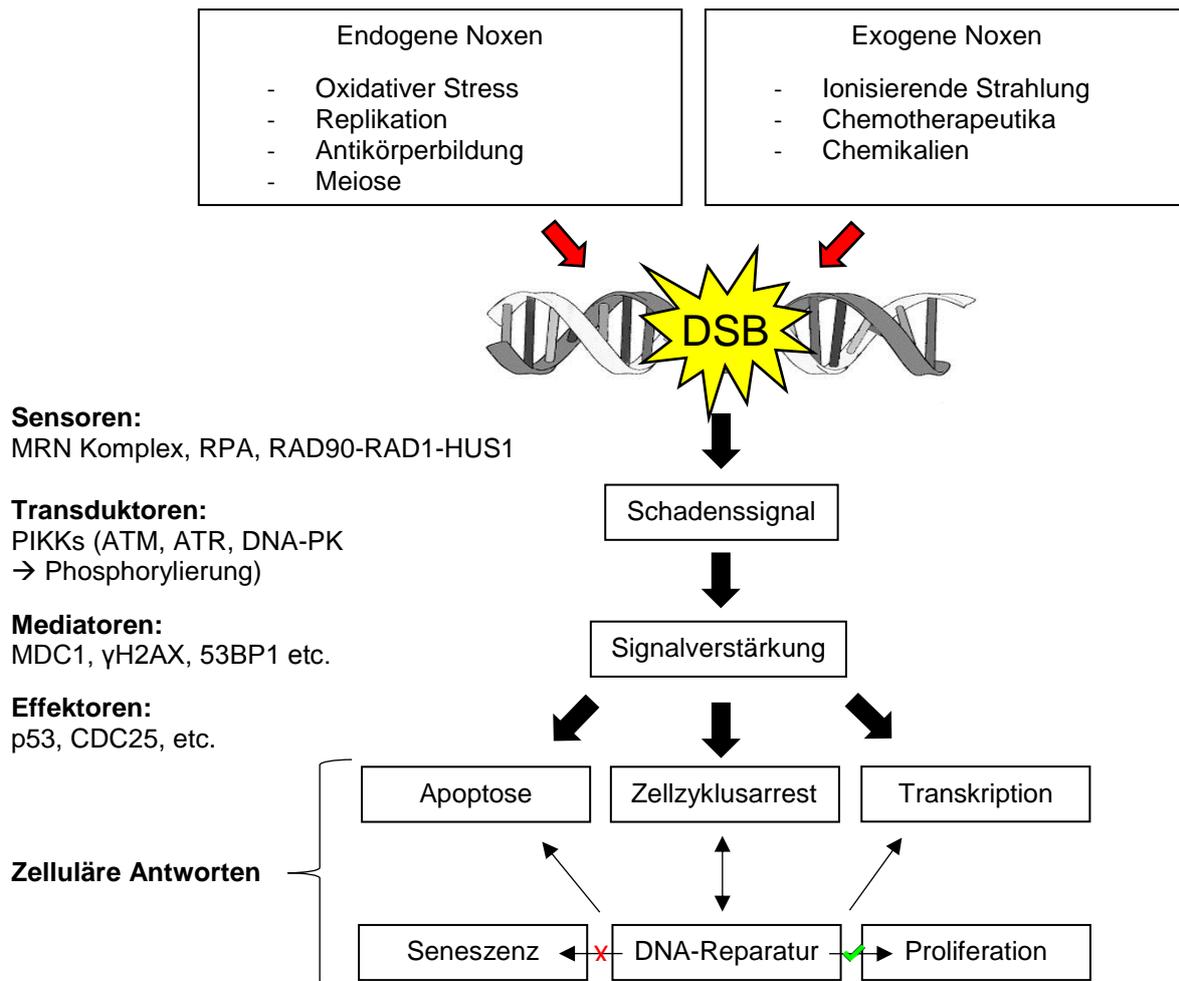
## 2. Einleitung

Zelle die schwerwiegendsten DNA-Schäden, da die genetische Information beider DNA Stränge beeinträchtigt wird und zudem freie DNA-Bruchenden entstehen, die Chromosomenaberrationen zur Folge haben können (Freifelder, 1965; Kaplan, 1966). IR, die aufgrund ihrer hohen Energie zahlreiche DNA-Schäden induzieren kann, erzeugt vorwiegend Basenveränderungen, ESBs und DSBs. Beispielsweise generiert 1 Gy Röntgenstrahlung pro Zellkern, laut Berechnungen, bis zu 2000 Basenschäden, bis zu 1000 ESBs und bis zu 40 DSBs. Die Basenveränderungen und ESBs werden schnell und effizient repariert und beeinflussen das Überleben der Zelle in der Regel nicht (Ward, 1988, 1995; Ward et al., 1985). DSBs und komplexe Schäden sind aufwändig zu reparieren oder sogar irreversibel/irreparabel (Seyffert, 2003).

### 2.2.2.1 DNA-Schadensantwort und deren Auswirkung auf die Chromatinstruktur

Die Zellteilung, mit der Weitergabe der genetischen Information auf eine Tochterzelle, ist essentiell für das Überleben eines Organismus. Die fehlerfreie DNA-Replikation sowie die korrekte Chromosomenverteilung sind dafür unerlässlich. Treten DNA-Schäden auf, so benötigt die Zelle spezialisierte Mechanismen, die die Korrektheit der DNA prüfen. Die Zelle muss einen DNA-Schaden erkennen und darauf reagieren, was über eine bestimmte Signalkaskade abläuft und als DNA-Schadensantwort definiert ist (Abbildung 5). Dieses globale Signalisierungsnetzwerk detektiert verschiedene Arten von Schäden und koordiniert, je nach Zellzyklusphase und Schwere des Schadens, eine Antwort. Mithilfe der Aktivierung von Sensorproteinen, Transduktorproteinen und Effektorproteinen wird ein Netzwerk von interagierenden Signalen gebildet, welches zusammen die Schadensantwort ausführt. Ein primäres Signal, bestehend aus dem DNA-Schaden selbst oder aus den vom Schaden resultierenden Chromatinveränderungen initiiert die Aktivierung der Sensorproteine, welche das Signal durch Phosphorylierungsreaktionen über die Transduktorproteine zu den Effektorproteinen weiterleiten (Furgason & Bahassi el, 2013; Sulli, Di Micco, & d'Adda di Fagagna, 2012; Zhou & Elledge, 2000).

## 2. Einleitung



**Abbildung 4: Schema der DNA-Schadensantwort**

Verschiedenste endogene und exogene Noxen können DNA-Schäden, beispielsweise DSBs verursachen. Mithilfe einer Signaltransduktionskaskade kann auf den DNA-Schaden reagiert werden. Sensorproteine erkennen den Schaden und das Schadenssignal wird über Transduktoren, die es verstärken an Effektorproteine weitergeleitet. Die daraus resultierende DNA-Schadensantwort reagiert je nach Schwere und Komplexität des Schadens mit verschiedene Antworten (Zelltod durch Apoptose, Änderung der Transkriptionsaktivität, Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Beeinflussung der Proliferation oder Seneszenz). Modifizierte Abbildung (Furgason & Bahassi el, 2013; Sulli et al., 2012; Zhou & Elledge, 2000).

Als ein Hauptsensor bei der Detektion von DSBs wird der MRN Komplex, bestehend aus Mre11 (meiotic recombination protein 11), Rad50 und Nbs1 (Nijmegen breakage syndrome 1) genannt (Rupnik, Lowndes, & Grenon, 2010). Die Serin-/Proteinkinasen ATM (ataxia telangiectasia mutated protein), ATR (ATM and Rad3-related protein) und DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), die zu der Familie der Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKKs) gehören, spielen als Transduktoren eine wichtige Rolle. Sie fungieren als Übersetzer, indem sie durch Phosphorylierungen verschiedener Schlüsselproteine das DNA-Schadenssignal der Sensorproteine in biochemische Modifikationen umwandeln und es somit an die Effektorproteine weitergeben (Sulli et al., 2012; Zhou & Elledge, 2000). ATM gilt hierbei als die wichtigste Kinase der DNA-Schadensantwort in Säugetieren und ist für die

## 2. Einleitung

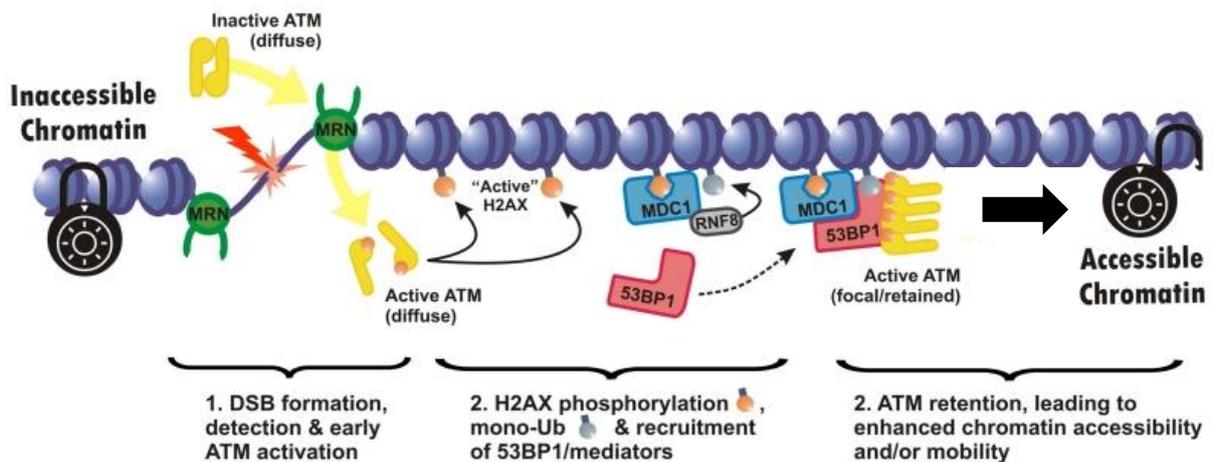
unmittelbare Schadensantwort von zentraler Bedeutung (Shiloh, 2003a, b). Als wichtigste Signalvermittler und –verstärker werden  $\gamma$ H2AX, MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1) und das p53-bindende Protein 1 (53BP1) genannt (Burma, Chen, Murphy, Kurimasa, & Chen, 2001; Francia et al., 2012; Ward & Chen, 2001). Das durch die Signalvermittler verstärkte Signal breitet sich von der beschädigten Stelle aus, wobei es auf nachgeschaltete Effektoren, wie beispielsweise p53, übertragen wird und in einer DNA-Schadensantwort resultiert. Diese kann, je nach Schwere und Komplexität des Schadens, mit dem Zelltod durch Apoptose enden, die Aktivität der Transkription beeinflussen oder die Zellzykluskontrolle durch vorübergehenden Zellzyklusarrest aktivieren. Dabei stellen die DNA-Reparatur und die dadurch mögliche Wiederaufnahme der Proliferation oder die zelluläre Seneszenz bei irreparablen DNA-Schäden, die wichtigsten Reaktionsmechanismen der Zelle dar (Francia et al., 2012).

Neben der DNA-Schadensantwort wird seit langem angenommen, dass die Kompaktheit des Chromatins den Mechanismus der DNA-Reparatur beeinflusst (Costes et al., 2007; Elia & Bradley, 1992; Xu & Price, 2011). Es ist zu beobachten, dass DSBs mit einer schnellen oder langsamen Kinetik repariert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das EC mit seiner offeneren Chromatinstruktur eine schnelle DNA-Reparaturkinetik durchläuft. Hingegen scheint die Kompaktheit des HCs eine Barriere für die Erkennung sowie Reparatur von DNA-Schäden darzustellen und eine Freilegung des Schadens zu erfordern, was eine langsamere Kinetik zur Folge hat (Goodarzi, 2013; Goodarzi, Noon, & Jeggo, 2009; Lorat et al., 2012; Rube et al., 2011). Die genauen Mechanismen und die beteiligten Komponenten bei der Freilegung eines DSBs im HC sowie die Hierarchie der Abläufe werden kontrovers diskutiert.

Wird ein DSB im HC induziert, findet im Rahmen der Signaltransduktionskaskade die Aktivierung von ATM, über eine acetylierungsinduzierte Autophosphorylierung und Monomerisation, statt. Das aktive pATM phosphoryliert den Transkriptionsrepressor *Krüppel-associated protein 1* (Kap-1), welcher mit einer kompakten, heterochromatischen Chromatinkonformation assoziiert ist. Diese Phosphorylierung erhöht die Negativität an der Reaktionsstelle, was eine Freilegung der geschädigten DNA initiiert und den Reparaturproteinen freieren Zugang zum Schaden ermöglicht (Cann & Delleire, 2011; Fischle, 2009; Murray, Stiff, & Jeggo, 2012). Des Weiteren phosphoryliert pATM die Histonvariante H2AX ( $\gamma$ H2AX) am Serin 139, über mehrere

## 2. Einleitung

Megabasenpaare, in der Region proximal zur DNA-Läsion (Burma et al., 2001; Rogakou et al., 1999; Rogakou et al., 1998). Die Histonmodifikation  $\gamma$ H2AX fungiert als Ausgangspunkt für weitere Chromatin-assoziierte Reparaturfaktoren und nimmt vermutlich einen indirekten Einfluss auf die Struktur des Chromatins (Misri et al., 2008; Xu & Price, 2011). Sie ist erforderlich, um MDC1 zu rekrutieren, welches das Schadenssignal weiter verstärkt, indem es eine vermehrte Akkumulation des MRN-Komplexes und eine verstärkte Aktivierung von ATM bewirkt. Außerdem initiiert  $\gamma$ H2AX die Rekrutierung von 53BP1, welches als wichtiger Signalvermittler fungiert (Fischle, 2009). Es ist an der Aufrechterhaltung des Schadenssignals beteiligt, indem es die ATM-Aktivierung und -Rekrutierung sowie -Speicherung verbessert und fördert somit die Öffnung des Chromatins (Abbildung 5) (Goodarzi & Jeggo, 2009; Goodarzi et al., 2009; Noon et al., 2010).



### Abbildung 5: Signalkaskade zur Dekondensation des HCs

Tritt ein DSB auf, rekrutiert und aktiviert der MRN-Komplex ATM. Die ATM-Signalgebung initiiert die Phosphorylierung von H2AX, gefolgt von der Rekrutierung von MDC, welches wiederum die Anlagerung von 53BP1 an das nun ubiquitinylierte  $\gamma$ H2AX ermöglicht. 53BP1 stabilisiert die Bindung von pATM, was die Chromatinöffnung erleichtert. Modifizierte Abbildung (Goodarzi & Jeggo, 2009).

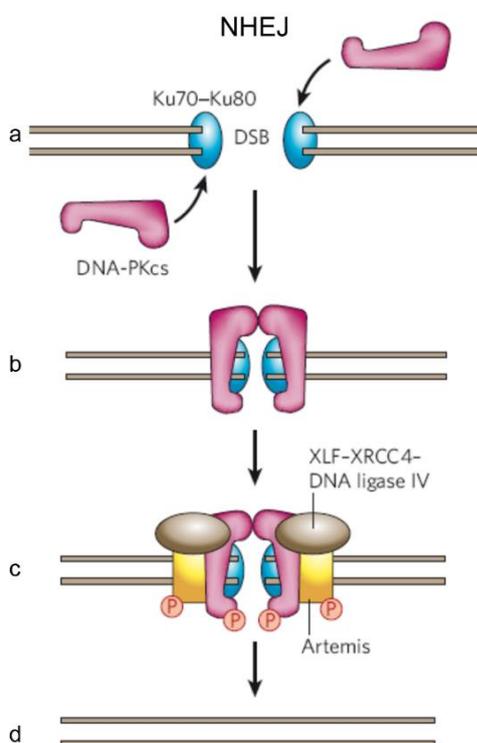
Ein frei zugänglicher DSB kann von der Zelle über mehrere Reparaturmechanismen repariert werden. Zu den Hauptreparaturwegen zählen die Homologe Rekombination (HR) und die Nicht-homologe End-zu-End Verknüpfung (*Non-homologous end joining*, NHEJ). Ist zum Zeitpunkt der Reparatur eine zweite DNA-Kopie zugänglich, wird der Bruch bevorzugt über die HR repariert. Ist dies nicht der Fall, erfolgt die Reparatur, in der Regel über die NHEJ (Ataian & Krebs, 2006).

#### 2.2.2.2 DNA-Reparaturwege der Zelle

Zellen nutzen verschiedene Reparaturwege, um DNA-Schäden zu reparieren. Bei der Wahl der Reparaturwege spielen unter anderem, die Zellzyklusphase sowie die Komplexität des Schadens eine Rolle. Neben den Hauptreparaturwegen der HR und

## 2. Einleitung

der NHEJ werden DNA-Schäden auch über die DNA-Mismatch-Reparatur (*mismatch repair*) sowie die Nukleotid- und Basenexzisionsreparatur behoben (Ataian & Krebs, 2006; Sancar, Lindsey-Boltz, Unsal-Kacmaz, & Linn, 2004). Der schwerwiegendste DNA-Schaden, der vorliegen kann, ist der DSB, denn durch ihn kann die Information der komplementären Sequenz beider DNA-Stränge verloren gehen, was die Aufrechterhaltung der ursprünglichen genetischen Information beeinträchtigt. Des Weiteren kann ein Auseinandergleiten der beiden zueinander gehörigen DNA-Bruchenden zusätzlich die Reparatur beeinträchtigen und sie erschweren. Werden DSBs fehlerhaft repariert oder sind sie irreparabel, können direkte oder verzögerte Veränderungen der Chromosomen auftreten, wie beispielsweise Translokationen, Inversionen oder Deletionen, welche schlussendlich zur Karziogenese führen können (Hoeijmakers, 2001; Khanna & Jackson, 2001; van Gent, Hoeijmakers, & Kanaar, 2001). Im Vergleich zur komplexeren Reparatur des DSB können ESBs, bei denen nur in einem der beiden DNA-Stränge ein Kontinuitätsverlust auftritt, sowie Basenschäden schnell und effizient repariert werden. Die Exzisionsreparatur behebt diese Schäden, wobei strukturelle Veränderungen der DNA durch Nukleotidexzisionsreparatur behoben werden, sowie modifizierte oder fehlende Basen durch die Basenexzisionsreparatur korrigiert werden (Ataian & Krebs, 2006; Hoeijmakers, 2001).



**Abbildung 6: Nicht-Homologe-End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ)**

a) Das Heterodimer aus Ku70 und Ku80 erkennt den DSB, bindet an diesen und rekrutiert die katalytische Untereinheit der DNA-PKcs. b) Die aktive DNA-PK (Komplex aus Ku-Komplex und DNA-PKcs) schützt die Enden des DSBs vor enzymatischem Abbau oder falscher Verknüpfung und hält sie in räumlicher Nähe zueinander. c) Nach den Phosphorylierungen der Proteine DNA-PKcs und Artemis wird der Komplex, bestehend aus XRCC4, Ligase IV und XLF (Cernunnos) für die Ligation rekrutiert. d) Nach der Ligation lösen sich die DNA-Reparaturfaktoren. Modifizierte Abbildung (Downs, Nussenzweig, & Nussenzweig, 2007).

### **Nicht-homologe End-zu-End Verknüpfung (NHEJ)**

Bei der NHEJ werden die freien DNA-Bruchenden direkt miteinander verknüpft, was zwar ein schnell ablaufender Prozess ist, allerdings oftmals zum Verlust einiger

## 2. Einleitung

Nukleotide (Mikrodeletionen) führt und somit fehlerbehafteter ist (Lieber, 2008; Lieber, Ma, Pannicke, & Schwarz, 2003; Paques & Haber, 1999). Die NHEJ kann in allen Phasen des Zellzyklus stattfinden (Rothkamm K, 2003; Burma S, 2006), wird allerdings bevorzugt in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase ausgeführt (Moore & Haber, 1996; Rothkamm, Kruger, Thompson, & Lobrich, 2003; Rothkamm & Lobrich, 2003; Takata et al., 1998). Die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), welche aus den regulatorischen Untereinheiten Ku70 (XRCC6) und Ku80 (XRCC6) sowie der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs besteht und der XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex sind die wichtigsten zwei Proteinkomplexe des NHEJ (Jackson, 2002; Jeggo, 1998). Tritt ein DSB auf, erkennt initial das Heterodimer aus Ku70 und Ku80 (Ku-Komplex) den DSB und bindet bis zur finalen Prozessierung in Richtung des intakten Stranges stabilisierend an den Bruchenden. Das Heterodimer dient als Ankerpunkt, an dem die weiteren Reparaturfaktoren der NHEJ binden können (Lieber, 2008). Bei einem DSB gibt es zwei freie DNA-Bruchenden, an denen je ein Ku-Komplex bindet (Lieber, 2010; Rube et al., 2011). Durch eine Konformationsänderung des Heterodimers kommt eine Bindung mit DNA-PKcs zustande, welche an der Aktivierung und Bindung weiterer Reparaturfaktoren beteiligt ist. Die aktive DNA-PK (Komplex aus Ku-Komplex und DNA-PKcs) dient als Brücke, um die Bruchenden in räumlicher Nähe zueinander zu halten (Chen et al., 2007; DeFazio, Stansel, Griffith, & Chu, 2002). Des Weiteren schützt es die Bruchenden vor dem Abbau durch Nukleasen oder der falschen Verknüpfung durch Ligasen (Weterings, Verkaik, Bruggenwirth, Hoeijmakers, & van Gent, 2003) und legt sie für die nächsten Schritte frei. Die Freilegung findet sowohl über eine Autophosphorylierung zweier DNA-PK-Komplexe, als auch die Phosphorylierung von ATM, statt. Voraussetzung für diese Schritte sind die bereits eingeleitete Signaltransduktionskaskade, die Kinaseaktivität von ATM und die korrekte Ausrichtung der DNA-Bruchenden. Eine weitere Konformationsänderung lässt die Nuklease Artemis und den XRCC4/DNA-Ligase IV Komplex binden und aktiviert diese. Die Ligation erfolgt schlussendlich durch den XRCC4/DNA-Ligase IV Komplex (Mahaney, Meek, & Lees-Miller, 2009), wobei XLF (auch Cernunnos) nicht essentiell für die Prozessierung ist, sie aber beschleunigt (Riballo et al., 2009).

### 2.3 Nachweismethoden von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Detektion von DSBs zu definierten Zeitpunkten nach einer Strahlenexposition ermöglicht es die DNA-Reparaturkapazität von Zellen zu untersuchen. Allerdings setzt dies voraus, dass es Methoden gibt, die den Anteil von unreparierten DSBs spezifisch

## 2. Einleitung

bestimmen. Als etablierte sowie anerkannte Methoden werden die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), der Comet-Assay, die Untersuchung von Chromosomenaberrationen und die Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) genannt. Die PFGE basiert auf der längenspezifischen Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld (Elektrophorese). Die Besonderheit dabei ist die Änderung der Orientierung des elektrischen Feldes nach regelmäßigen Abständen, sodass die DNA-Fragmente ihre Laufrichtung anpassen müssen (Schwartz & Cantor, 1984). Beim Comet-Assay werden ebenfalls mithilfe eines elektrischen Feldes die geschädigten, negativ geladenen DNA-Bruchstücke aus dem Zellkern transportiert und sortieren sich ihrer Größe nach in Richtung des Pluspols. Anhand der Länge des sogenannten Kometenschweifs (DNA-Bruchstücke), relativ betrachtet zum Kopf (Zellkern), können Rückschlüsse auf die Anzahl der DSBs gezogen werden (Gunasekarana, Raj, & Chand, 2015). Die Anzahl an Chromosomenaberrationen wird ebenfalls als Maß für unreparierte DSBs genutzt. Die sichtbaren strukturellen oder zahlenmäßigen Veränderungen der Chromosomen werden dabei lichtmikroskopisch untersucht, bewertet oder quantifiziert. Die IFM ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Über einen optischen Filter, den sogenannten Anregungsfilter, wird von der verwendeten Lampe (hier: Quecksilberdampflampe) nur ein bestimmter Wellenlängenbereich des Lichts durchgelassen, der spezifisch für die Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffes ist (Cox, 2012; Haus, 2014). Somit ist es möglich DSB-Reparaturproteine im Zellkern über fluoreszierende Farbstoffe zu visualisieren. Bestimmte Regionen der zu visualisierenden Proteine (Antigene) werden von spezifischen, primären Antikörper (AK) erkannt. An diesen ersten AK können wiederum spezifische sekundäre AK binden, die mit Fluorochromen gekoppelt sind und eine Visualisierung des DSBs ermöglichen (Lottspeich, Engels, & Solodkoff, 2012).

Erst in den letzten Jahren gewann die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) als neue Nachweismethode von unreparierten DSBs immer mehr Anerkennung. Die TEM ermöglicht mithilfe eines Elektronenstrahls die direkte Abbildung von Objekten im Nanometerbereich, wobei die Bilderzeugung durch Transmission von Elektronen erfolgt. Durch eine Glühkathode (hier: LaB<sub>6</sub>) wird ein Elektronenstrahl erzeugt, der durch einen sogenannten Wehnelt-Zylinder gebündelt in Richtung der Anode auf sehr hohe Geschwindigkeiten beschleunigt wird (Beschleunigungsspannung: zwischen 20 bis 100 kV). Durch verschiedene Linsen wird der Elektronenstrahl weiter gebündelt und gelenkt. Da allerdings die Anwesenheit von Luftsauerstoff zu Interaktionen mit

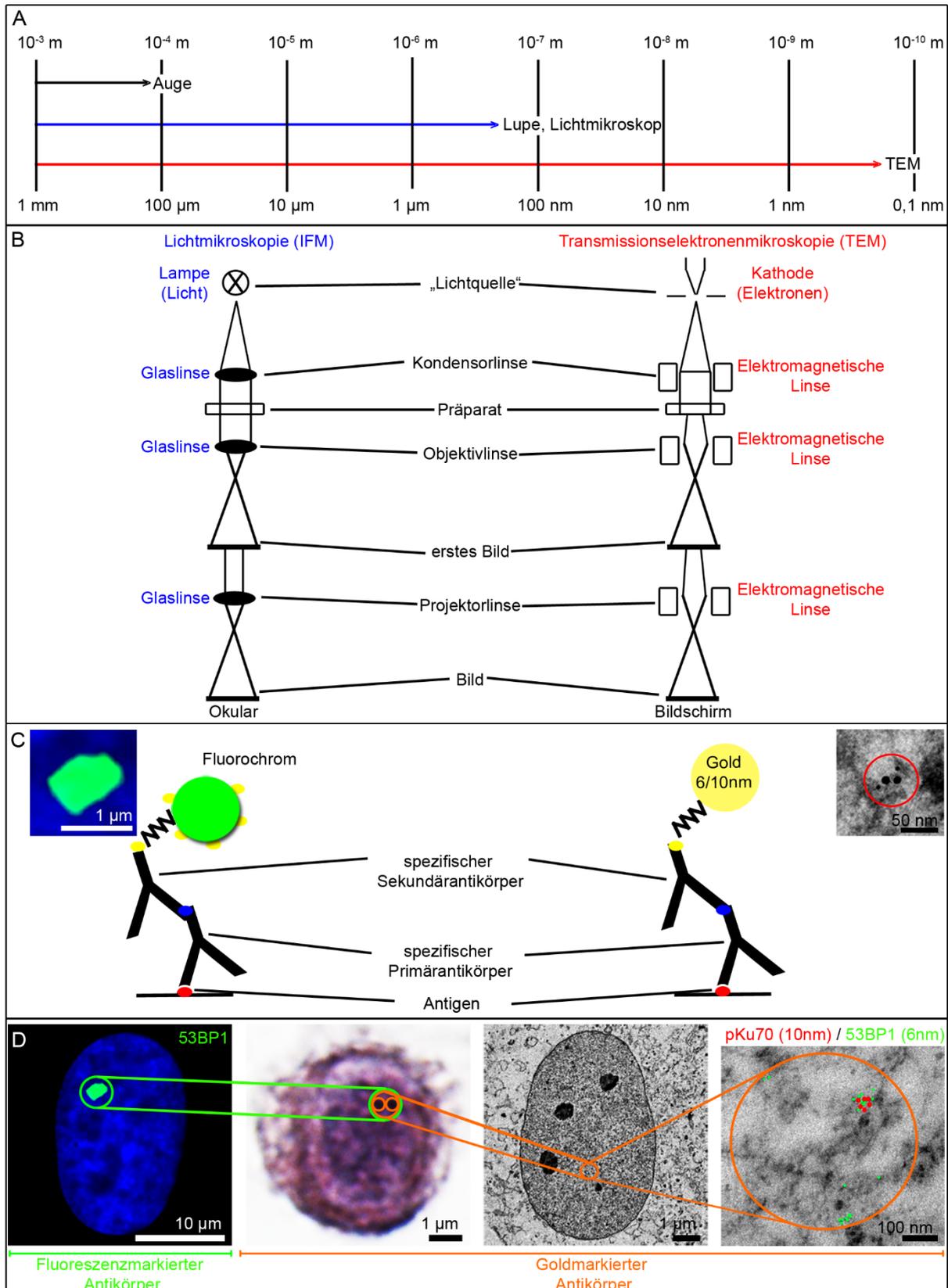
## 2. Einleitung

dem aufgeheizten Elektronenemitter führen kann, wird ein Hochvakuum benötigt. Durchdringt der Elektronenstrahl die Probe, so werden in Abhängigkeit von ihrer Beschaffenheit und Dichte die Elektronen unterschiedlich stark absorbiert und gestreut (Plattner & Zingsheim, 1987). Daher ist es von großer Bedeutung, dass die Probe durchlässig für den Elektronenstrahl ist, die Probendicke also wegen der Absorption und Streuung der Elektronen in der Materie einen bestimmten Wert nicht überschreitet (Lottspeich, Engels, & Solodkoff, 2012). Die von der Probe reflektierten Strahlen, die in verschiedene Richtungen geworfen werden, werden durch das Objektiv wieder zu einem Punkt zusammengeführt (Zwischenbildebene). Das finale Bild entsteht schlussendlich durch die Gesamtheit aller in der Zwischenebene entstandenen Probenpunkte und wird durch die Projektorlinse auf dem Bildschirm oder dem Monitor (Umwandlung in Photonen mittels Kamera) sichtbar gemacht (Abbildung 7 B, rechts) (Eckert, 1998; Lange & Blödorn, 1981; Stanley L. Flegler, 1995; von Heimendahl, 1970). Durch das Verfahren der Immuno-Gold-Markierung (Kapitel 4.2.5.4) können unter Verwendung von spezifischen AK bestimmte Antigene von DSB-Reparaturproteinen elektronenmikroskopisch dargestellt werden (Louro & Lesemann, 1984; Roth, Bendayan, & Orci, 1978; Roth & Binder, 1978). Wie auch bei der Immunfluoreszenz-Markierung bindet ein Primärantikörper am Antigen und wird anschließend über einen Sekundärantikörper detektiert. In der Elektronenmikroskopie finden Goldpartikel (kolloidales Gold) verschiedener Größe, anstelle von Fluoreszenzfarbstoffen Verwendung. Die starke Elektronenstreuung an Elementen mit einer hohen Ordnungszahl ermöglicht eine gute Darstellung der Goldpartikel. Darüber hinaus kann die Ultrastruktur der markierten Bereiche aufgrund der geringen Größe des Goldpartikels immer noch sichtbar gemacht werden (Mannweiler, Hohenberg, Bohn, & Rutter, 1982). Somit ist es möglich, einzelne Proteine im ultrastrukturellen Kontext zu visualisieren. Mithilfe von unterschiedlich großen Goldpartikeln (10 nm oder 6 nm), sogenannten Beads, können Doppelmarkierungen zweier Proteine durchgeführt werden. Die Beads sind klein genug, um sich nicht sterisch zu hindern, können aber aufgrund ihrer unterschiedlichen Größen gut unterschieden werden (Slater, 1993).

### 2.3.1 Immunfluoreszenzmikroskop und Transmissionselektronenmikroskop im Vergleich

Grundsätzlich ist der Aufbau eines Immunfluoreszenzmikroskops, welches zu den Lichtmikroskopen zählt, dem eines Transmissionselektronenmikroskops sehr ähnlich. Beide Systeme bestehen aus hintereinandergeschalteten, vergrößernden Linsen, die mithilfe einer „Lichtquelle“ (IFM: Licht verschiedener Wellenlängen und TEM: beschleunigte Elektronen) ein vergrößertes Bild einer Probe darstellen können. Dabei haben beide Methoden, sowohl die IFM als auch die TEM, Vor- und Nachteile. Der Nachweis von Proteinen über die IFM kann in gesamten Zellen oder Geweben erfolgen, während bei der TEM Ultradünnschnitte angefertigt werden müssen, damit der Elektronenstrahl die Probe durchdringen kann. Im Vergleich kann die Methode der IFM relativ schnell und einfach durchgeführt werden, wohingegen die Proben-Aufbereitung sowie -Vorbereitung für die TEM mehr Aufwand bedeutet und zeitintensiver ist. Während bei der IFM fluoreszierende Farbstoffe, die häufig sehr instabil sind, Verwendung finden, nutzt die TEM-Methode Immuno-Goldpartikel (Goldgekoppelter AK), bei denen das Signal stabil zu detektieren ist. Ein weiterer wichtiger Vorteil der TEM besteht im hohen Auflösungsvermögen. Der Mensch kann sichtbares Licht zwischen den Wellenlängen von ca. 400 nm bis 760 nm wahrnehmen. Objekte können, je nach Bedingungen (beispielsweise der Abstand zwischen Auge und Objekt oder den Lichtverhältnissen) bis auf wenige Millimeter als getrennte Punkte wahrgenommen werden. Die Auflösungsgrenze eines konventionellen Mikroskops ist, bedingt durch die Wellenlängeigenschaften (Interferenz und Beugung) des Lichtes auf ca. 200 nm begrenzt. Das Elektronenmikroskop hingegen verwendet zur Bilderzeugung, anstelle von sichtbarem Licht, ein elektrisches Feld beschleunigter Elektronen. Die theoretische Auflösungsgrenze liegt dadurch bei  $\leq 0,1$  nm, wird jedoch beispielsweise durch die biologischen Eigenschaften des Präparats auf etwa 2 nm begrenzt. Somit können die mittels IFM visualisierten Fluoreszenz-Signale durch die TEM viel detaillierter untersucht werden (siehe Abbildung 7).

## 2. Einleitung



**Abbildung 7: Licht- und Elektronenmikroskop im Vergleich**

A: Die Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops ist auf etwa 200 nm begrenzt, wohingegen im Transmissionselektronenmikroskop eine Ortsauflösung von  $\leq 1$  nm erreicht werden kann. B: Die schematische Zeichnung zeigt, dass beide Systeme (IFM und TEM) annähernd den gleichen Aufbau besitzen. Die Unterschiede sind durch die Farben blau (IFM) und rot (TEM) dargestellt. C: Der Nachweis von Reparaturfaktoren wird in der Immunfluoreszenz über Fluorochrom-gekoppelte AK umgesetzt, wohingegen bei der elektronenmikroskopischen Nachweismethode Gold-gekoppelte AK verwendet

### 3. Fragestellungen

werden. Diese sekundären AK binden spezifisch am Primärantikörper, der an das Antigen des Reparaturproteins gebunden hat. D: In der IFM bilden sich die Reparaturfaktoren (hier: 53BP1 (grün)) nach der Markierung als Fokus im, durch DAPI (blau) sichtbar gemachten, Zellkern ab. Im TEM können die Reparaturfaktoren über die Goldantikörper im Kontext der Chromatinstruktur (verschiedene Graustufen) dargestellt werden und sind hier, zur deutlicheren Darstellung, farbig markiert (pKu70: rot (10 nm), 53BP1: grün (6 nm). Modifizierte Abbildung (Grellmann, 2017).

### 3. Fragestellungen

In den letzten Jahren wurde, neben dem DNA-Schadensmuster, die Bedeutung der Chromatinstruktur für die Detektion und die Reparatur von strahleninduzierten DSBs immer deutlicher. Allerdings sind die Untersuchungsmethoden in ihrer Auflösung sowie Sensitivität begrenzt, sodass die Nanometer-genaue Betrachtung der ablaufenden Prozesse im Kontext des Chromatins sehr schwierig oder nicht möglich war.

Durch die, in der Arbeitsgruppe Rube, etablierte Methodik, welche mittels Transmissionselektronenmikroskopie die Immuno-Gold-markierten Reparaturfaktoren im Chromatinkontext visualisiert, gibt es die Möglichkeit, die beteiligten Proteine des Signalisierungsnetzwerk während der DNA-Schadensantwort und –Reparatur im Nanometerbereich zu untersuchen (Rube et al., 2011).

Das Ziel dieser Arbeit war es das DNA-Schadensmuster sowie die Bedeutung des Chromatins (Euchromatin und Heterochromatin) im zeitlichen Verlauf nach der Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten (Low-LET oder High-LET Strahlung) mittels Markierung der beteiligten Reparaturfaktoren zu untersuchen. Dabei standen sowohl die Komplexität und Verteilungsmuster der DSBs als auch die mit der Bestrahlung einhergehenden Veränderungen des Chromatins während der DNA-Schadensantwort im Fokus der Untersuchungen.

Ausgehend von den bisherigen Erkenntnissen wird vermutet, dass die High-LET Bestrahlung Cluster-DNA-Schäden verursacht, die schwieriger und aufwendiger zu reparieren sind als die durch Low-LET Bestrahlung verursachten isolierten DNA-Schäden. Daher wird die Hypothese vertreten, dass die High-LET Bestrahlung effektiver sein könnte als die Low-LET Bestrahlung.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material und Geräte

Im Folgenden sind alle Materialien und Lösungen, die für die Durchführung der Versuche verwendet wurden unter Angabe des jeweiligen Herstellers alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien**

| <b>Produkt</b>   | <b>Hersteller/ Bezugsquelle</b>   |
|--|---|
| BSA ( <u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>al</u> bumin)               | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Australien                                 |
| 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 und/oder Plano, Wetzlar, Deutschland |
| H <sub>2</sub> O dest.   | Apotheke des Universitätsklinikums Homburg, Homburg, Deutschland            |
| LR-White Beschleunigerreagenz                                      | Plano, Wetzlar, Deutschland   |
| LR-White Harz  | Plano, Wetzlar, Deutschland   |
| Natriumazid  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland   |
| Paraformaldehyd (PFA)  | Science Services, München, Deutschland                                      |
| Pioloform BM18   | Plano, Wetzlar, Deutschland   |
| Triton X100  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland   |
| Trypsin  | Biochrom, Berlin, Deutschland   |
| Uranylacetat   | Merck, Darmstadt, Deutschland   |
| Vectashield Eindeckmedium mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) | Biozol, Eching, Germany   |
| Zellkulturmedium für HSF1-Zellen                                   | PromoCell, Heidelberg, Deutschland  |

#### 4. Material und Methoden

**Tabelle 2: Lösungen und Puffer**

| <b>Bezeichnung</b>                         | <b>Herstellung</b>   |
|--|--|
| <b>Allgemeines</b>                         |  |
| Natriumazidlösung                          | 0,02% Natriumazid und 0,4% BSA in PBS  |
| PBS  | 20 mM Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4  |
| Trypsin                                    | Trypsin 1:10 in PBS  |
| <b>IFM</b>                                 |  |
| Blockingreagenz                            | 1% BSA in PBS  |
| Fixierlösung                               | 4,0% Paraformaldehydlösung in PBS  |
| Permeabilisierungslösungen                 | 0,2% Triton X100 in PBS  |
| <b>TEM</b>                                 |  |
| 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                            | Blockingreagenz von Aurion, Wageningen, Niederlande                            |
| DermaTACS™ In Situ Apoptosis Detection Kit | Trevigen, Gaithersburg, USA  |
| Ethanolreihe 30%/50%/70%/95%/100%          | Angesetzt in H <sub>2</sub> O dest.  |
| Fixierlösung                               | 2,0% Paraformaldehydlösung und 0,05% Glutaraldehydlösung in PBS                |
| Infiltrationslösungen                      | LR-White mit Ethanol im Verhältnis 2:1 mischen                                 |
| Inkubationspuffer                          | 0,1% BSA-c in PBS, pH 7,4 (mit 1 M HCl)  |
| Nachfixierlösung                           | 2% Glutaraldehydlösung in PBS  |
| Uranylacetat                               | 2,0% in H <sub>2</sub> O dest. lösen (w/w)                                     |

#### 4. Material und Methoden

**Tabelle 3: Antikörper**

| <b>Bezeichnung</b>                           |                 | <b>Verdünnungen</b> |            | <b>Bezugsquelle</b>        |   |
|--|-----------------|---------------------|------------|----------------------------|---|
| <b>Primär-Antikörper</b>                     | <b>Ursprung</b> | <b>TEM</b>          | <b>IFM</b> | <b>Artikel-<br/>nummer</b> | <b>Hersteller/ Firma</b>                      |
| 53BP1<br>(Monoklonal, BP18)                  | Maus            | 1:700               | 1:400      | Mab3804                    | Merck Millipore,<br>Darmstadt,<br>Deutschland |
| 53BP1<br>(Polyklonal)                        | Kaninchen       | 1:200               | -          | IHC-<br>00001              | Bethyl,<br>Montgomery,<br>USA                 |
| 53BP1<br>(Polyklonal)                        | Kaninchen       | 1:7000              | 1:5000     | NB100-<br>304              | Novus<br>Biologicals,<br>Littleton, USA       |
| H3K27me3<br>(Monoklonal,<br>mAbcam 6002)     | Maus            | 1:200               | -          | ab6002                     | Abcam,<br>Cambridge, UK                       |
| H3K9ac<br>(Polyklonal)                       | Kaninchen       | 1:100               | 1:100      | ab10812                    | Abcam,<br>Cambridge, UK                       |
| H3K9me3<br>(Polyklonal)                      | Kaninchen       | 1:200               | 1:200      | ab8898                     | Abcam,<br>Cambridge, UK                       |
| H4K16ac<br>(Monoklonal,<br>EPR1004)          | Kaninchen       | 1:100               | 1:100      | ab10946<br>3               | Abcam,<br>Cambridge, UK                       |
| pKap-1 (S824)<br>(Polyklonal)                | Kaninchen       | 1:400               | 1:400      | A300-<br>767A              | Bethyl,<br>Montgomery,<br>USA                 |
| pATM (S1981)<br>(Monoklonal,<br>10H11.E12)   | Maus            | 1:400               | 1:400      | ab36810                    | Abcam,<br>Cambridge, UK                       |
| pDNA-PKcs<br>(Thr2609)<br>(Monoklonal, 10B1) | Maus            | 1:100               | 1:100      | NB100-<br>2077             | Novus<br>Biologicals,<br>Littleton, USA       |
| pKu70 (S5)<br>(Polyklonal)                   | Kaninchen       | 1:100               | 1:100      | ab61783                    | Abcam,<br>Cambridge, UK                       |

#### 4. Material und Methoden

|   |           |            |            |                                       |   |
|---|-----------|------------|------------|---------------------------------------|---|
| pKu80 (Thr714)<br>(Polyklonal)                | Kaninchen | 1:200      | 1:200      | LS-<br>C199178<br>/57774              | LifeSpan<br>Biosciences,<br>Seattle, USA      |
| γH2AX<br>(Monoklonal,<br>JBW301)              | Maus      | 1:200      | 1:200      | 05-636                                | Merck Millipore,<br>Darmstadt,<br>Deutschland |
| γH2AX<br>(Polyklonal)                         | Kaninchen | 1:500      | 1:500      | IHC-<br>00059                         | Bethyl,<br>Montgomery,<br>USA                 |
|   |           |            |            |                                       |   |
| <b>Sekundär-<br/>Antikörper</b>               |           | <b>TEM</b> | <b>IFM</b> | <b>Bestell-<br/>nummer</b>            | <b>Hersteller/ Firma</b>                      |
| <u>Fluoreszenzmarkiert</u>                    |           |            |            |                                       |   |
| Anti-Kaninchen<br>Alexa Fluor 488/ 568<br>IgG | Ziege     | -          | 1:1200     | A11034<br>A11036                      | Invitrogen,<br>Oregon, USA                    |
| Anti-Maus<br>Alexa Fluor 488/ 568<br>IgG/IgM  | Ziege     | -          | 1:1200     | A11001<br>A11031<br>A10667<br>A21043  | Invitrogen,<br>Oregon, USA                    |
| <u>Goldmarkiert</u>                           |           |            |            |                                       |   |
| Anti-Kaninchen<br>6/10 nm<br>Partikelgröße    | Ziege     | 1:30       | -          | 6 nm:<br>806.011<br>10 nm:<br>810.011 | Aurion,<br>Wageningen,<br>Niederlande         |
| Anti-Maus<br>6/10 nm<br>Partikelgröße,        | Ziege     | 1:30       | -          | 6 nm:<br>806.022<br>10 nm:<br>810.022 | Aurion,<br>Wageningen,<br>Niederlande         |
| Streptavidin-Gold (10<br>nm)                  | Ziege     | 1:30       | -          | 810.088                               | Aurion,<br>Wageningen,<br>Niederlande         |

#### 4. Material und Methoden

**Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien**

| <b>Bezeichnung</b>                   | <b>Bezugsquelle</b>                 |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Deckgläser (24 x 50 mm)              | VWR, Darmstadt, Deutschland         |
| Einwegpipetten, 5/10/25 ml           | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland    |
| Falcon-Röhrchen, 15/50 ml            | Nunc, Wiesbaden, Deutschland        |
| Grid-Aufbewahrungsboxen              | Plano, Wetzlar, Deutschland         |
| Grids, Nickel, 2x1 mm Schlitz        | Plano, Wetzlar, Deutschland         |
| Objektträger                         | Menzel, Braunschweig, Deutschland   |
| Objektträger-Boxen                   | NeoLab, Heidelberg, Deutschland     |
| Parafilm                             | NeoLab, Heidelberg, Deutschland     |
| Pipettenspitzen (cell safer)         | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland    |
| Pipettenspitzen weiß/gelb/blau       | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland    |
| Rasierklingen                        | Plano, Wetzlar, Deutschland         |
| Reaktionsgefäß, 0.5/1.5/2.0/5.0 ml   | Eppendorf, Hamburg, Deutschland     |
| Rundbogenfalkons                     | VWR, Darmstadt, Deutschland         |
| Sechswellplatte                      | Nunc, Wiesbaden, Deutschland        |
| Zellkulturflaschen klein/mittel/groß | Greiner, Frickenhausen, Deutschland |

**Tabelle 5: Geräte und Software**

| <b>Bezeichnung</b>  | <b>Bezugsquelle</b>   |
|---|---|
| Analysis (Version 3.1)  | zugehörige Software für das Transmissionselektronenmikroskop          |
| Beschleuniger, Artiste, MLC 160, LINAC<br>( <i>Artiste linear accelerator</i> ) | Siemens Medical Solutions, Kalifornien, USA                           |
| Beschleuniger, UNILAC<br>( <i>Universal Linear Accelerator</i> )                | GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung, Darmstadt, Deutschland |
| Brutschrank   | Heraeus, Hanau, Deutschland   |
| Diamantmesser HistoJumbo; 3,5 mm Länge, 45° Winkel                              | Diatome AG, Biel, Schweiz   |
| Diamantmesser; 3,5 mm Länge, 45° Winkel   | Diatome AG, Biel, Schweiz   |
| Diamantmesser; 3,5 mm Länge, 35° Winkel   | Diatome AG, Biel, Schweiz   |

#### 4. Material und Methoden

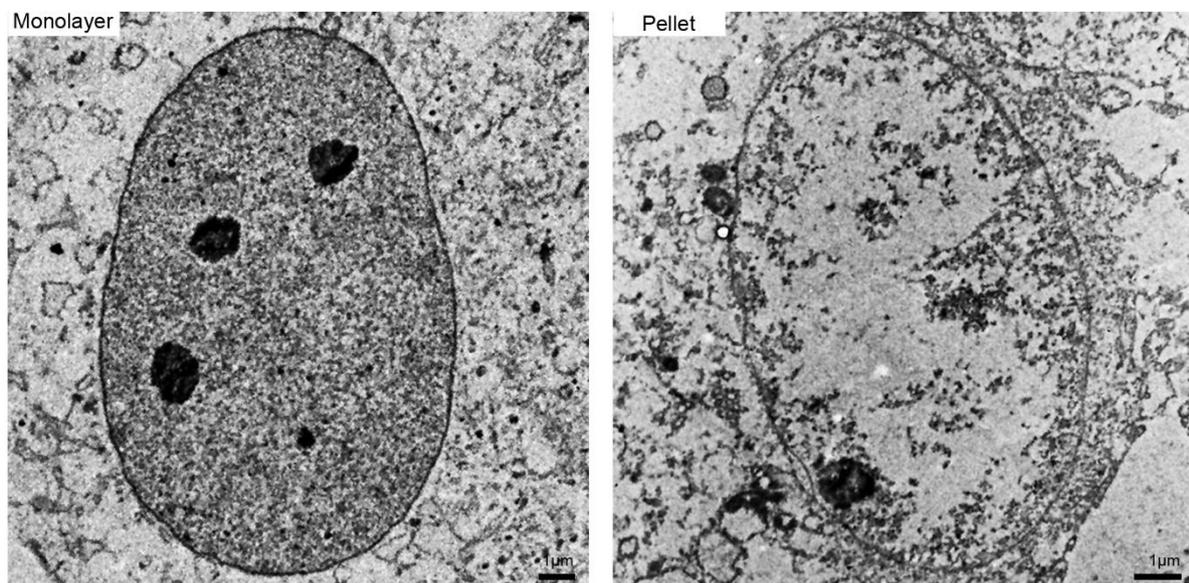
|   |   |
|---|---|
| Dumontpinzette  | Plano, Wetzlar, Deutschland                 |
| Eismaschine   | Scotsman, Illinois, USA                     |
| Excel   | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA     |
| Feuchtekkammer  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland           |
| Gefrierschrank, - 20°C  | Bosch, Gerlingen, Deutschland               |
| Gefrierschrank, - 80°C  | Thermo Scientific, Massachusetts, USA       |
| Inkscape (Version 0.48.5)   | Inkscape-Projekt, freie Internetplattform   |
| Kryotank (Arpege 170)   | VWR, Darmstadt, Deutschland                 |
| Kühlschrank   | Bosch, Gerlingen, Deutschland               |
| Lichtmikroskop, Nikon Eclipse Ni mit integrierter Kamera DS-Qi2 und den zugehörigen Filtern ND16, ND8 und ND4 | Nikon, Tokio, Japan                         |
| Magnetrührer mit Heizfunktion   | VWR, Darmstadt, Deutschland                 |
| OriginPro 8.6G Programm   | OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA |
| Photoshop (Adobe, CS3)  | Adobe Systems GmbH, München, Deutschland    |
| Pinnacle Planungssoftware Version 8.0   | Philips, Amsterdam, Niederlande             |
| Pinzette  | NeoLab, Heidelberg, Deutschland             |
| Pipettierhilfe  | Hirschmann, Eberstadt, Deutschland          |
| Plexiglasplatte für die Bestrahlung   | Klinikinterne Eigenanfertigung              |
| Schüttler   | ELMI, Calabasas, USA                        |
| Software des Lichtmikroskops, NIS Elements BR45000  | Nikon, Tokio, Japan                         |
| Sterilbank  | Heraeus, Hanau, Deutschland                 |
| Transmissionselektronenmikroskop, Tecnai G2 Biotwin, Kamera Mega View III                                     | FEI, Oregon, USA                            |
| Ultramikrotom, Ultracut S   | Leica, Wetzlar, Deutschland                 |
| Vortex-Mixer  | Scientific Industries, New York, USA        |
| Wärmeschrank  | Binder, Tuttlingen, Deutschland             |

#### 4. Material und Methoden

|            |  |
|------------|--|
| Wasserbad  | GFL, Burgwedel, Deutschland                |
| Word       | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA    |
| Zentrifuge | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland |

#### 4.2 Methoden

Im Rahmen der Versuche konnte auf vorherigen Projekten der Arbeitsgruppe aufgebaut und die vorhandene Methodik der IFM und der TEM erweitert und verbessert werden. Vorherige Experimente zeigten, dass die Kultivierung und Einbettung von primären, humanen, dermalen Fibroblasten (PromoCell, Heidelberg) einen Einfluss auf die Struktur des Chromatins hatten, weshalb eine Chromatinstruktur-erhaltende Einbettmethodik als Monolayer-Zellschicht in dieser Arbeit Verwendung fand. Der Unterschied des Kerngerüsts ist in Abbildung 8 dargestellt. Während die Chromatinstruktur in den Monolayer-Proben gleichmäßig über den gesamten Zellkern verteilt zu erkennen war, schien sie bei den Pellet-Proben (Einbettung des zentrifugierten Zellpellet nach Ablösung der Zellen) inhomogen verteilt und verklumpt vorzuliegen.



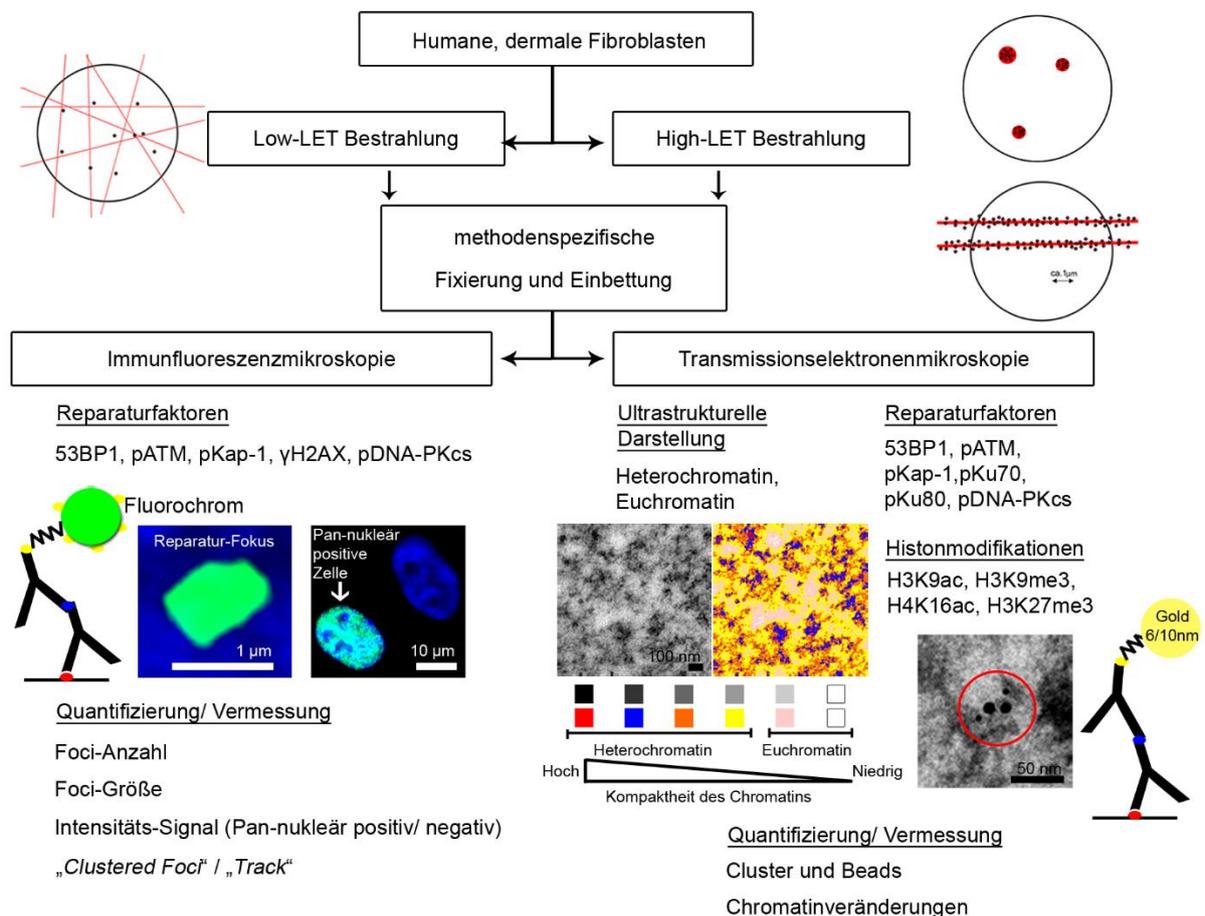
**Abbildung 8: Monolayer versus Pellet**

Das Chromatin der Zellen, die als Monolayer eingebettet wurden (links), war gleichmäßig über den gesamten Zellkern verteilt, während bei den Zellen, die als Pellet eingebettet wurden (rechts), das Kerngerüst zusammengefallen erschien und das Chromatin inhomogen im Zellkern verteilt vorlag.

## 4. Material und Methoden

### 4.2.1 Übersicht über die durchgeführten Experimente

Nach der Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten (Low-LET und High-LET) wurden die Zellen zu definierten Zeitpunkten (Betrachtung der Proteinverteilung im zeitlichen Verlauf) methodenspezifisch fixiert und sowohl fluoreszenzmikroskopisch, als auch elektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 9). Für die Experimente fanden die gleichen primären AK Verwendung. Als Sekundärantikörper wurden für die IFM Fluorochrom-gekoppelte und für die TEM Gold-gekoppelte AK genutzt (Abbildung 9). Mittels IFM konnten verschiedene Reparaturfaktoren über Intensitäts-Signale, Foci (nach Low-LET), bzw. „*Clustered Foci*“ (Anhäufung vieler DNA-Schäden nach High-LET Bestrahlung in vertikaler Ausrichtung) und „*Tracks*“ (Anhäufung vieler DNA-Schäden nach High-LET Bestrahlung in horizontaler Ausrichtung) visualisiert sowie quantifiziert werden (Abbildung 9). Mithilfe der TEM war sowohl die Visualisierung von Reparaturfaktoren im Kontext der Chromatinstruktur als auch deren Quantifizierung möglich. Durch die beiden Methoden sollten das DNA-Schadensmuster, die Reparaturmechanismen und die Chromatinveränderungen im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung charakterisiert und analysiert werden.



#### Abbildung 9: Arbeitsablauf

Primäre, humane, dermale Fibroblasten wurden mit Low-LET Photonen oder High-LET Ionen bestrahlt, methodenspezifisch fixiert und daraufhin mittels IFM und TEM untersucht. Die Markierung von

## 4. Material und Methoden

Reparaturfaktoren (53BP1, pATM, pKap-1,  $\gamma$ H2AX, pKu70, pKu80 und pDNA-PKcs) und Histonmodifikationen (H3K9ac, H3K9me3, H4K16ac, H3K27me3) wurde mit spezifischen Antikörpern umgesetzt. Diese banden an den nachzuweisenden Antigenen und wurden mit Fluorochrom-gekoppelten (über IFM) oder Gold-gekoppelten (über TEM) Sekundärantikörpern detektierbar. Dabei wurden in der IFM die Foci-Anzahl, Foci-Größe bzw. -Fläche sowie Intensitätssignale (Pan-nukleär positiv), als auch „*Clustered Foci*“ oder „*Tracks*“ in Einzel- und Doppel-Markierungen quantifiziert und vermessen. Mithilfe der TEM konnten außerdem ultrastrukturelle Veränderungen in der Chromatinstruktur untersucht und quantifiziert werden. Dazu wurden die verschiedenen Dichtegrade des Chromatins, anhand verschiedener Graustufen, den beiden morphologischen Zuständen des Chromatins (EC und HC) zugeordnet. Die Immuno-Gold-Markierung ermöglichte es die Beads (ein Bead entspricht einem Goldpartikel) und Cluster (Anhäufung mehrerer Beads) von verschiedenen Reparaturfaktoren im Kontext des Chromatins zu visualisieren und zu quantifizieren. Die Untersuchungen der verschiedenen Reparaturfaktoren fanden sowohl an Einzel- sowie Doppel-Markierungen statt.

### 4.2.2 Zellkultur und verwendete Zelltypen

Die Kultivierung (37°C und 2% CO<sub>2</sub>) von humanen, dermalen Fibroblasten (HSF1-Zellen, PromoCell, Heidelberg) fand unter sterilen Bedingungen in handelsüblichen Zellkulturflaschen und mit für die Zellen spezifischem Nährmedium (PromoCell, Heidelberg) statt. Für die Versuche wurden die Zellen (nur frühe Passagen, bis P9) als Monolayer auf kleinen Deckgläschen in einer Sechs-Well-Platte kultiviert, bis sie konfluent (G0) gewachsen waren.

### 4.2.3 Bestrahlung

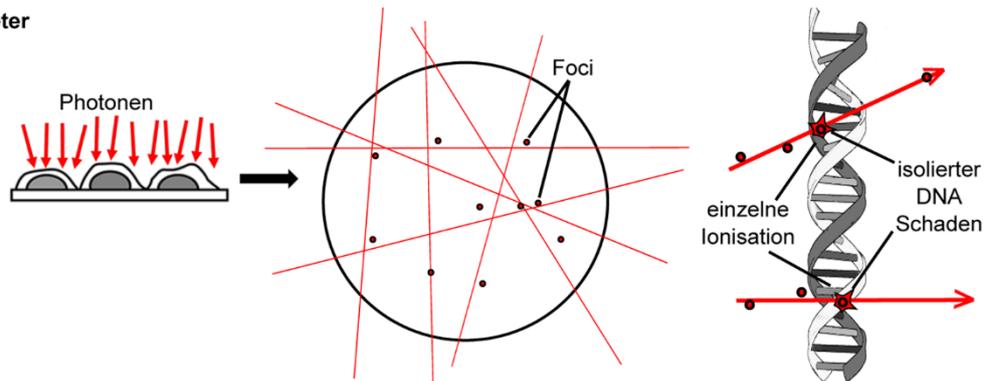
Die Low-LET Bestrahlungen wurden in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie in Homburg durchgeführt. Die High-LET Bestrahlungen fanden im Rahmen einer Kooperation mit der Abteilung Biophysik der GSI (Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH) in Darmstadt statt. Unbestrahlte, Passagen-entsprechende Kontrollen wurden ebenfalls für die Untersuchungen mitgeführt.

## 4. Material und Methoden

### Bestrahlungsparameter

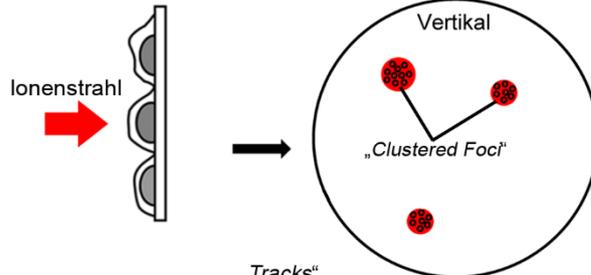
#### Low-LET

LINAC  
Strahlung: Photonen  
Energie: 6 MV  
LET:  $\sim 1 \text{ keV}/\mu\text{m}$

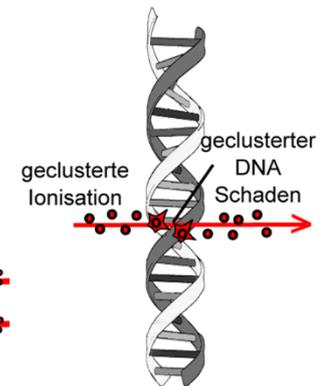
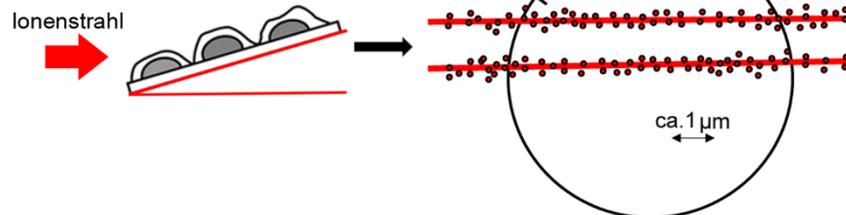


#### High-LET

UNILAC  
Carbon  
9,5 MeV/Nucleon  
LET:  $\sim 190 \text{ keV}/\mu\text{m}$   
Fluenz:  $5 \times 10^6$



UNILAC  
Calcium  
7,7 MeV/Nucleon  
LET:  $\sim 1800 \text{ keV}/\mu\text{m}$   
Fluenz:  $5 \times 10^6$



### Abbildung 10: Bestrahlungsübersicht

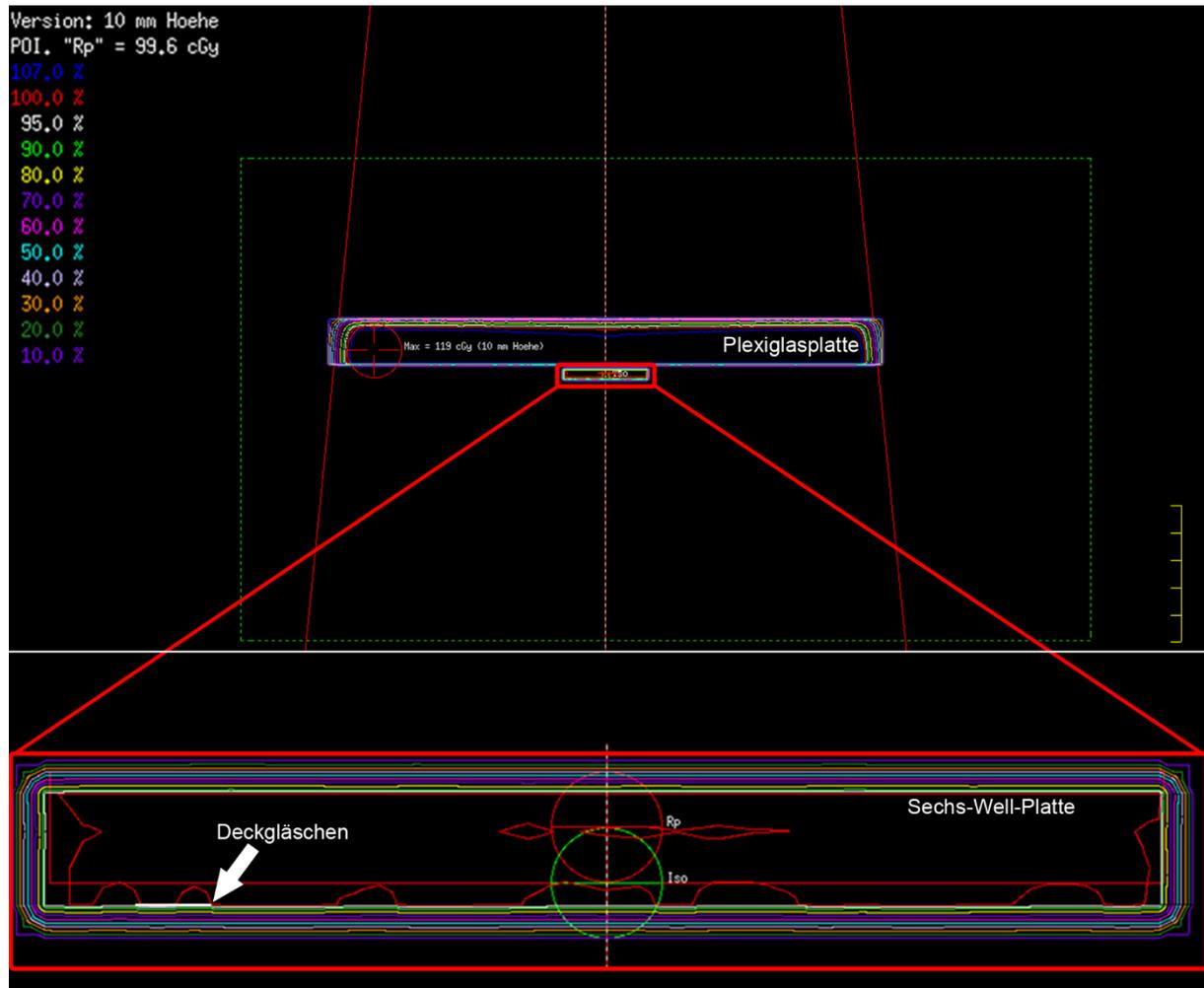
Die Low-LET Bestrahlung (Photonen) der Zellen erfolgte in einem senkrecht ausgerichteten Strahlenfeld. Die locker ionisierenden Photonen verursachen DNA-Schäden im Zellkern, die beispielsweise über Foci mittels IFM, visualisiert werden können. Die High-LET Bestrahlung wurde mit Schwerionen (Carbon oder Calcium) durchgeführt, wobei die Zellen vertikal oder horizontal zum Ionenstrahl ausgerichtet waren. Diese Ausrichtung ermöglichte es, die Cluster-DNA-Schäden mittels IFM darzustellen. Je nach Betrachtungsebene konnten „Clustered Foci“ oder „Tracks“ visualisiert werden. Die verschiedenen Parameter der Bestrahlung sind links in der Abbildung aufgeführt.

#### 4.2.3.1 Low-LET Bestrahlung mit Photonen

Die Low-LET Bestrahlungen der Zellen mit Photonen wurden an einem Linearbeschleuniger (Artiste™, Siemens) mit einer Beschleunigungsspannung von 6 Megavolt (MV) (Photonen) durchgeführt. Die Dosisapplikation erfolgte über ein senkrecht ausgerichtetes Strahlenfeld (Gantrywinkel  $0^\circ$ , Kollimatorwinkel  $0^\circ$ , Bestrahlungsfeld  $30 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ ) mit einer Dosisleistung von  $2 \text{ Gy}/\text{min}$ . Die auf den Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden in einer Sechs-Well-Platte, die jeweils mit ca. 3 ml Medium gefüllt waren, bestrahlt. Beim Eintritt der Photonenstrahlung in Materie erfolgt zunächst ein Anstieg der Energiedosis durch Sekundärelektronen, welcher als Aufbaueffekt bezeichnet wird. Im Bereich der mittleren Reichweite der Sekundärelektronen befindet sich der Ort größter Energiedeposition (Dosismaximum).

#### 4. Material und Methoden

Ab dieser Eindringtiefe nimmt, aufgrund der Absorption der Strahlung in der Materie, die Energiedosis mit zunehmender Eindringtiefe ab. Um eine homogene Dosisverteilung innerhalb der Zellen zu gewährleisten, musste der Aufbaueffekt vorher stattgefunden haben. Aus diesem Grund wurde eine 1,5 cm dicke Plexiglasscheibe (Gewebe äquivalent) auf der Sechs-Well-Platte platziert, damit die Zellen sich innerhalb der 95 % (weiß) und 100% (rot) Isodosen befanden (Abbildung 11). Die Gesamtdosis betrug 10 Gy, wobei der ungefähre LET bei ca. 1 keV/μm lag.



**Abbildung 11: Bestrahlungsplanung**

Mithilfe der Planungssoftware Pinnacle™ konnte die Dosisverteilung berechnet werden. Farblich dargestellt sind die verschiedenen Isodosen. Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen (siehe Pfeil), die auf dem Boden der Kammern der Sechs-Well-Platte platziert waren, befinden sich innerhalb der 95 % (weiß) und 100% (rot) Isodosen.

#### 4.2.3.2 High-LET Bestrahlung mit Calcium oder Carbon

Die High-LET Bestrahlungen der auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurde mit den Schwerionen Calcium ( $^{40}\text{Ca}$ ) oder Carbon ( $^{12}\text{C}$ ) durchgeführt. Sie wurden in einer Bestrahlungsvorrichtung vertikal oder unter einem Winkel von  $15^\circ$  (horizontal) im Teilchenschauer platziert. Die Partikelfluenz betrug  $5 \times 10^6$  Partikeln pro  $\text{cm}^2$ . Der LET

betrug bei den Calciumionen ca. 1800 keV/ $\mu\text{m}$  (Energie: 7,7 MeV/Nucleon) und bei den Carbonionen ca. 190 keV/ $\mu\text{m}$  (Energie: 9,5 MeV/Nucleon).

##### 4.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Analysemethode der Immunfluoreszenzmikroskopie müssen die Proben chemisch fixiert und permeabilisiert werden. Die Permeabilisation gewährleistet die Durchlässigkeit der Zellen für die Reagenzien und vor allem die AK. Bevor die Proben am Immunfluoreszenzmikroskop analysiert werden können, ist die Stabilisierung des Fluoreszenzfarbstoffes nötig, damit dieser weitestgehend stabil detektiert werden kann. Dafür werden die Proben in einem entsprechenden Einbettmedium eingebettet.

##### 4.2.4.1 Fixierung, Einbettung und Markierung der Reparaturfaktoren mittels Immunfluoreszenz

Nach Bestrahlung und zu definierten Zeitpunkten nach Strahlenexposition (Lagerung im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>; Reparaturzeitpunkte: 0.1, 0.5, 5 und 24 h) wurden die Zellen, nach Entfernen des Nährmediums und Waschen mit 1x PBS, mit 2% PFA in 1x PBS für 15 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x PBS (Schüttler) für je 10 min konnten die Proben mit 0,2% Triton X 100 in 1x PBS permeabilisiert werden. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Proben nach erneutem Waschen (3 x mit 1x PBS) mit 2% BSA in 1x PBS geblockt. Daraufhin konnte der erste primäre AK in 2% BSA in 1x PBS bei 4°C über Nacht (ü. N.) inkubieren. Nach erneutem Waschen (3 x für 10 min mit 2% BSA in 1x PBS) inkubierten die Proben mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (in 2% BSA in 1x PBS, 1 h, RT). Anschließend wurde der ungebundene AK heruntergewaschen (3 x für 10 min mit 2% BSA in 1x PBS) und die Proben mit dem zweiten primären AK (in 2% BSA in 1x PBS) für 1 h bei 37°C inkubiert, wieder gewaschen (3 x für 10 min mit 2% BSA in 1x PBS) und mit dem zweiten sekundären Fluorochrom-gekoppelten AK (in 2% BSA in 1x PBS, 1 h, RT) markiert. Zuletzt konnten die Proben, nach einem abschließenden Waschdurchgang (3 x für 10 min in 2% BSA in 1x PBS), in Einbettmedium mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), welches spezifisch an die Nukleinsäuren der DNA bindet (interkaliert in die Doppelhelix), eingebettet werden. Die weitere Bearbeitung fand am Immunfluoreszenzmikroskop statt. Bilder von Negativkontrollen der Immunfluoreszenz-Markierungen, bei der nur die sekundären AK, ohne spezifische Bindung, gezeigt wurden, sind im Anhang angefügt.

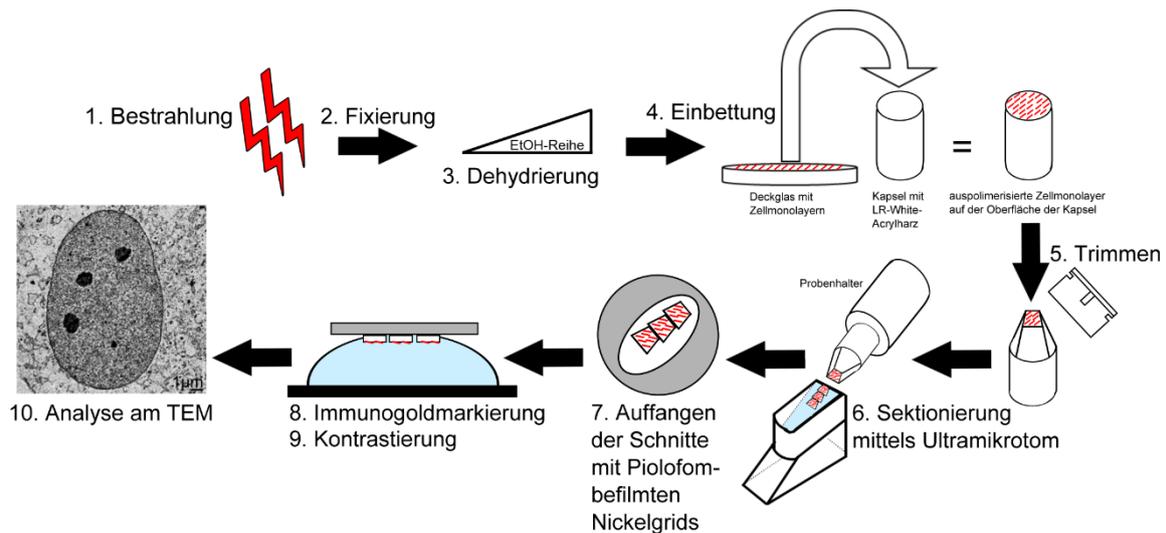
##### 4.2.4.2 Lichtmikroskopischer Nachweis von Reparaturfaktoren: Quantifizierung, Messung und Auswertung von Reparaturfoci

Zur Ermittlung der Foci-Anzahl wurden mindestens dreimal 50 Foci und/oder 50 Zellen per Auge quantifiziert. Der berechnete Wert an Foci pro Zelle und pro Probe konnte über die Replikate gemittelt und der Standardfehler berechnet werden. Die Foci-Fläche bzw. Foci-Größe wurde mithilfe der Software NIS Elements (Nikon) erfasst, die die Signalintensität misst und sowohl Flächen, als auch Längenangaben auflistet. Die Vorgaben, pro Zeitpunkt dreimal 50 Zellen mit mindestens einem Fokus zu vermessen und aus den Mittelwerten den Standardfehler zu berechnen, galten ebenfalls bei der Vermessung der Foci-Flächen. In einem weiteren Teilexperiment wurden Positivsignale (Pan-nukleär positiv, siehe Abbildung 9) ausgezählt, wobei ebenfalls die Mittelwerte von drei Replikaten mit mindestens 50 positiven Zellen pro Untersuchungszeitpunkt in die Auswertung aufgenommen und der Standardfehler berechnet wurde. Mithilfe des Lichtmikroskops (Eclipse Ni, Nikon) und der zugehörigen Kamera (DS-Qi2, Nikon) mit den integrierten Filtern ND16, ND8 und ND4, als auch mit den Programmen Excel (Microsoft, Version 2013), Inkscape (Version 0.48.5), OriginPro (Version 8.6) und Photoshop (Adobe, CS3) konnten die Auswertungen und die graphischen Darstellungen durchgeführt werden. Für die statistische Auswertung, sowie zur Beurteilung potenzieller Unterschiede in den Foci-Zahlen zwischen unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten oder Proteinen wurde der Mann-Whitney-U-Test (unabhängige Stichproben, nicht normal verteilt, Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ) genutzt. Um die statistische Signifikanz zu beurteilen fand ebenfalls die Software OriginPro (Version 8.6) Verwendung.

##### 4.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Untersuchung von biologischen Proben mittels des Transmissionselektronenmikroskops erfordert eine aufwendige Probenvorbereitung mit verschiedenen präparativen Verfahren. Die Proben müssen isoliert, chemisch fixiert und entwässert, in Kunstharz getränkt und eingebettet werden. Im Anschluss erfolgt mit einem Diamantmesser die Herstellung von Ultradünnschnitten, welche abschließend eine Kontrastierung durchlaufen (Abbildung 12).

#### 4. Material und Methoden



**Abbildung 12: Probenvorbereitung für die TEM**

Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden bestrahlt (1.), fixiert (2.), dehydriert (3.) und in LR-White eingebettet (4.). Mithilfe einer Rasierklinge wurde die Probe auf die passenden Maße getrimmt (5.), um anschließend am Ultramikrotom sehr dünne Schnitte von ca. 80 nm anzufertigen (6.). Diese wurden mithilfe eines Pioloform-beschichteten Nickelgrids von der Wasseroberfläche aufgefangen (7.) und anschließend für verschiedene Reparaturproteine immunogoldmarkiert (8.). Nach erfolgter Kontrastierung (9.) konnte die transmissionselektronenmikroskopische Analyse und Quantifizierung der markierten Proteine durchgeführt werden (10.).

##### 4.2.5.1 Fixierung und Einbettung der Zellen

Nach Bestrahlung (Abbildung 12, 1.) und Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) erfolgte nach definierten Reparaturzeitpunkten (nach 0.1, 0.5, 5 und 24 h) die Fixierung der Zellen mit 2% PFA und 0,05% GA in 1x PBS für 15 min bei RT (Abbildung 12, 2.). Zuvor wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen einmalig mit 1x PBS gewaschen. Die Visualisierung von Reparaturproteinen innerhalb des Zellkerns setzt eine schonende Antigen-erhaltende Fixierung voraus. Aufgrund dessen wurde der prozentuale Anteil an reaktivem GA in der Fixierlösung gering gehalten. Das PFA (kurzkettiges Polymer) zerfällt unter Wärmezufuhr in wässriger Umgebung. Dadurch entsteht in PBS eine pH-neutrale Pufferlösung, die Proteine nicht denaturiert, aber dafür stabil vernetzt. Die fixierten Zellen durchliefen eine ansteigende Ethanol-Reihe (30%/ 50%/ 70%/ 95%/ 100%/ 100%) für je 5 min bei RT, um die Proben zu dehydrieren (Abbildung 12, 3.). Da biologische Proben zum Großteil aus Wasser bestehen, dieses allerdings im Hochvakuum des TEMs verdampfen würde und somit die Zellstruktur unwiderrufflich zerstört, muss eine Dehydrierung durchgeführt werden. Strukturelle Veränderungen, die mit der Dehydrierung einhergehen, wurden mit der vorherigen Fixierung unterbunden (Roos & Morgan, 1990). Anschließend inkubierten die Proben für 30 min mit einer Lösung aus Ethanol und LR-White (1:2). Bei LR-White handelt es sich um ein hydrophiles Acrylharz niedriger Viskosität (durchdringt gut das

#### 4. Material und Methoden

einzubettende Material), welches unter Wärme (50°C) und Zugabe eines Beschleunigers aushärtet. Nach Überführen in reines LR-White und zweimaligem Wechsel (je 1 h) verblieben die Proben ü. N. bei 4°C in frischem Einbettmedium. Am nächsten Tag wurde das LR-White erneut ausgetauscht (RT). Für die endgültige Einbettung der auf den Deckgläschen vorbereiteten Zellen wurde eine Kapsel (Größe 6) in einen Tropfen Beschleuniger gestellt und daraufhin mit LR-White bis zur oberen Kante befüllt. Das Deckgläschen konnte mit der Zell-Seite in das LR-White gelegt und auf einem Parafilm abgestellt werden. Die Proben härteten bei 50°C über 24 h aus. Durch das Einfrieren der Proben für 10 min (-80°C) konnten die Deckgläschen von den nun im LR-White eingebetteten Zellen, oben auf den Kapseln, gelöst werden (Abbildung 12, 4.).

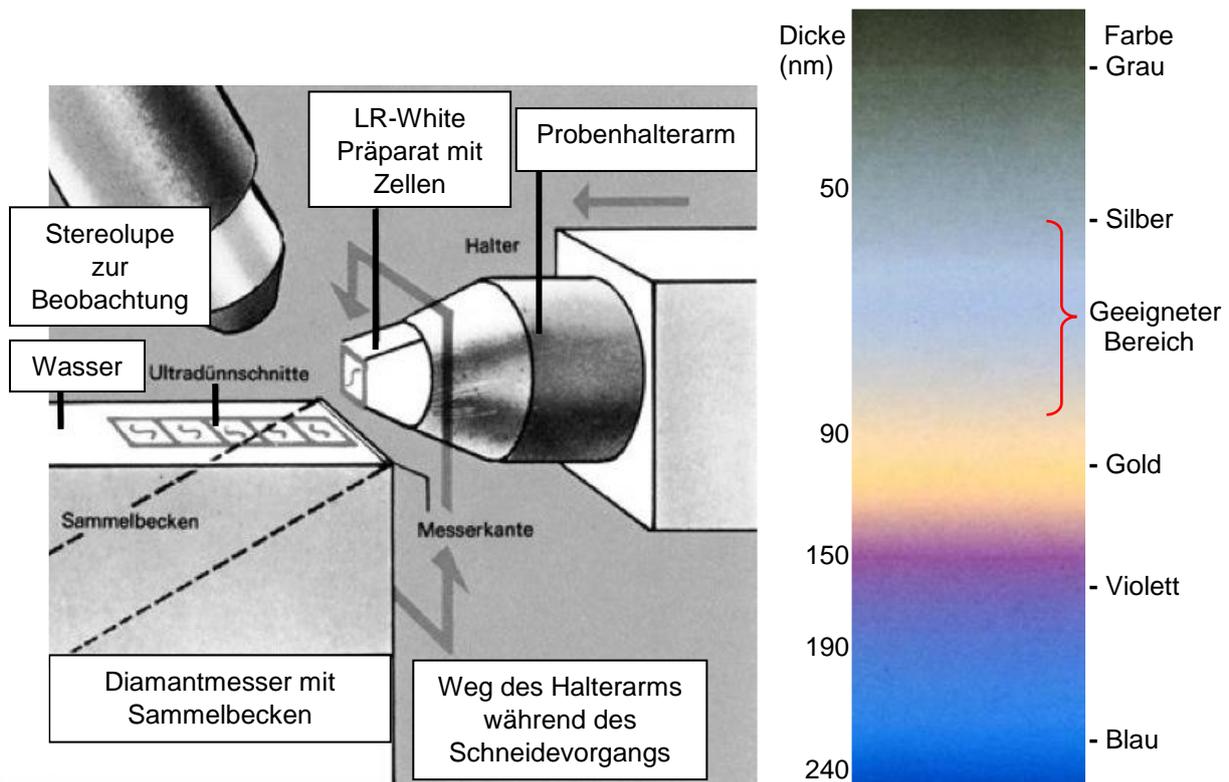
##### 4.2.5.2 Beschichtung von Nickel-Grids mit Pioloform

Um die eingebetteten Präparate im Transmissionselektronenmikroskop zu untersuchen, müssen davon Ultradünnschnitte (ca. 70 bis 80 nm) angefertigt werden. Als Objektträger für diese Schnitte werden sogenannte Grids genutzt. Für die Experimente dieser Arbeit wurden, mit einer Pioloformfolie ( $\leq 30\text{nm}$  dick), beschichtete Nickel-Grids mit einer Schlitzöffnung (1 mm x 2 mm) verwendet. Die Befilmung erfolgte genauso, wie es in der Doktorarbeit von Yvonne Lorat beschrieben und etabliert wurde (Lorat, 2012). Mithilfe einer Eigenkonstruktion, welche aus einem Scheidetrichter mit Ablassventil und einem Erlenmeyerkolben als Auffanggefäß bestand, konnten die Folien hergestellt werden. In den Trichter wurde das in Chloroform gelöste Pioloform (1,2% Pioloform (w/v)) ca. 6 cm hoch eingefüllt, ein zuvor mit Kernseife sorgfältig gereinigter Glasobjektträger mittels Pinzette hineingestellt und daraufhin die Lösung langsam und mit konstanter Geschwindigkeit abgelassen. Nach dem Verdampfen des Chloroforms blieb eine Folie auf der Oberfläche des Objektträgers zurück, deren Dicke je nach Ablaufgeschwindigkeit 20 bis 30 nm beträgt. Unter einer, als Staubschutz dienenden, Haube aus Plexiglas wurde eine pneumatische Wanne mit destilliertem Wasser gefüllt und die Oberfläche mit einem Glasstab abgezogen, um kleine Partikel zu entfernen. Zum Abflottieren der Pioloformfilme wurden diese mit einer Rasierklinge entlang der Objektträgerkante angeritzt und langsam, unter leichtem Winkel, in das Wasser eingetaucht. Der Film löste sich von dem Objektträger und schwamm auf der Wasseroberfläche auf. Mithilfe einer Schreibtischlampe, die seitlich auf die Folien gerichtet war, konnte die Foliendicke anhand der Interferenz und der daraus resultierenden Farbe abgeschätzt werden. Genutzt wurden nur Filme, die auf der

Wasseroberfläche Silbergrau erschienen. Die Grids konnten daraufhin vorsichtig mit einer Pinzette, möglichst eng nebeneinander aber nicht überlappend, auf den Film gelegt werden. Mithilfe eines kleinen Stücks Parafilm-papiers konnten die befilmten Grids durch Auflegen und Herausheben von der Wasseroberfläche geborgen und zum Trocknen auf dem Papier unter eine Petrischale abgelegt werden. Anschließend wurden diese mittels Tesafilm in den Petrischalen befestigt und im Exsikkator aufbewahrt.

##### 4.2.5.3 Sektionierung der Präparate mittels Ultramikrotom

Die Anfertigung von Ultradünnschnitten setzt die passende Form bzw. passende Größe des Präparats voraus. Dafür wurde die Schneidefläche der LR-White Kapsel mithilfe einer Rasierklinge getrimmt, d.h. die Fläche minimiert und in Trapezform gebracht, sodass optimale Schnitte angefertigt werden konnten (Abbildung 12, 5.). Unter dem Lichtmikroskop wurde die Probe in einem Halter platziert und überflüssiges Material mittels der Rasierklinge vorsichtig pyramidenförmig abgetragen, bis das Trapez herausgearbeitet war, welches im besten Fall mittig vorlag. Dabei galt die Form des Trapezes als Orientierung, die auf der Folie des Grids später bei der Betrachtung identifiziert werden konnte. Die kurze, parallele Seite definiert oben, während die lange Seite unten darstellt. Da es sich bei diesen Proben um eingebettete Zell-Monolayer handelte, die nur in der obersten Schicht im LR-White eingebettet vorlagen, musste äußerst sparsam und präzise geschnitten werden. Ansonsten wurde schnell durch die Monolayerschicht durchgeschnitten, sodass kein Zellmaterial mehr vorhanden war. Zur Anfertigung der Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von ca. 80 nm fand ein Diamantmesser (45° Messerwinkel, Diatome AG, Biel, Schweiz) Verwendung (Abbildung 12, 6.). Die Probe wurde im Halter des Ultramikrotoms (Typ Ultracut, Leica, Wetzlar) zum Diamantmesser passend ausgerichtet (d.h. die parallelen Seiten waren horizontal zum Messer ausgerichtet und die Schneidefläche winkelgenau planar eingestellt). Die mit Wasser gefüllte Wanne des Messers diente als Sammelbecken für die Schnitte. Der eingespannte Probenhalter bewegte sich an der Messerkante entlang und die Schnitte wurden auf der Wasseroberfläche in das Becken transportiert. Dabei glitt der Mikrotomarm mit der Probe immer genau um die eingestellte Schnittdicke pro Schnitt näher an das Messer heran (Abbildung 13, links). Die Schnitte konnten mittels der befilmten Nickelgrids, unter Zuhilfenahme einer Dumontpinzette aus dem Sammelbecken geborgen (Abbildung 12, 7.) und zum Trocknen in einer Gridbox verstaut werden.



**Abbildung 13: Sektionierung am Ultramikrotom**

Mithilfe eines Ultramikrotoms konnten Ultradünnschnitte angefertigt werden. Dabei wurde die Probe im Probenhalterarm fixiert und der Arm gleitet am Diamantmesser, immer um die eingestellte Schnittdicke vorwandernd, entlang. Die Schnitte sammelten sich an der Messerkante und glitten auf die Wasseroberfläche des Sammelbeckens. Je nach Schnittdicke bildeten sie sich im unterschiedlich sichtbarem Farbspektrum ab (rechtes Bild), welches durch das Mikroskop erkennbar war. Somit war es möglich die Schnitte mit geeigneter Dicke zu selektieren. Modifizierte Abbildung (Brechner, Dinkelaker, & Dreesmann, 2003).

Die Markierung mit Immuno-Gold konnte lediglich an Schnitten erfolgen, die sich auf der Oberfläche des Wassers silber bis hellgold darstellten, also ca. eine Schnittdicke von 50 nm bis 90 nm besaßen (Abbildung 13, rechts). In Summe mit der Dicke des Pioloformträgerfilms (ca. 30 nm) ist das Material für die Elektronen durchlässig und somit für die Transmission im Elektronenmikroskop geeignet.

#### 4.2.5.4 Immuno-Gold-Markierung

Die Immuno-Gold-Markierung fand in einer Feuchtekammer statt, in der Parafilm auf den Stegen der Kammer mittels Adhäsion angehaftet und als Trägermaterial genutzt wurde. Mithilfe einer Pinzette konnten die Grids, mit den Zellschnitten nach unten, in kleinen Tropfen (ca. 30 µl), die zuvor auf den Parafilm pipettiert wurden, platziert und nach jedem Inkubationsschritt von Tropfen zu Tropfen weitergesetzt werden (Abbildung 12, 8.). Wenn es nicht anders angegeben wird, fanden alle Schritte bei RT statt. Zu Beginn der Markierung mussten Aldehydgruppen durch eine 20 minütige Inkubation in Glyzin-Tropfen (50 mM Glyzin in PBS, pH 7.4) abgesättigt werden. Um unspezifische Bindungen zu blocken, folgte daraufhin eine Inkubation für 30 min in

#### 4. Material und Methoden

einer gebrauchsfertigen Blocklösung (Aurion, Wageningen). Während der Verdünnung des entsprechenden AK im Inkubationspuffer (0,1% BSA-c in 1x PBS, pH 7,4) durchliefen die Grids mit den Schnitten einen dreimaligen Waschschrift für je 5 min im Inkubationspuffer. Um eine möglichst spezifische Bindung zu gewährleisten, erfolgte die Antikörperinkubation ü. N. bei 4°C. Am darauffolgenden Tag, nachdem die Schnitte auf den Grids sechsmal mit Inkubationspuffer (je 5 min) gewaschen wurden, konnten sie für 1,5 h mit dem goldmarkierten Sekundärantikörper (1:30 verdünnt mit Inkubationspuffer) inkubieren und anschließend erneut sechsmal mit Inkubationspuffer gewaschen werden. Erfolgte eine Doppelmarkierung, inkubierten die Proben mit dem zweiten primären AK für 1 h bei 37°C, woraufhin wieder ein sechsmaliger Waschschrift mit Inkubationspuffer folgte. Nach erneuter 1,5 h Inkubation mit dem goldmarkierten Sekundärantikörper anderer Größe und den finalen Waschschriften mit Inkubationspuffer (6 x für je 5 min) und 1x PBS (3 x für je 5 min) erfolgte die Fixierung der markierten Probe mit 2% GA in 1x PBS (30 min). Nach finalem, dreimaligem Waschen in destilliertem Wasser wurde zurückgebliebene Flüssigkeit mittels eines Filterpapiers entfernt und die Proben konnten vollends in einer Gridbox trocknen. Bevor die Betrachtung am Transmissionselektronenmikroskop erfolgte, mussten die Proben noch kontrastiert werden (siehe Kapitel 4.2.5.5). Bilder von Negativkontrollen, bei denen nur die sekundären Goldantikörper, ohne spezifische Bindung, gezeigt wurden, sind im Anhang angefügt.

##### 4.2.5.4.1 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

Mithilfe der TUNEL-Methode (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling*) kann fragmentierte DNA nachgewiesen werden, die von einer Endonuklease gespalten wurde. Die Endonuklease spaltet die DNA an spezifischen Stellen (internukleosomale Linkerstellen zwischen den Nukleosomen), wobei charakteristische Bruchstücke mit einer Größe von ca. 180 bis 200 bp entstehen (Wyllie, 1980). Die DNA-Fragment-Enden, also die 3`OH-Bruchenden, lassen sich ebenfalls über eine Antigen-AK-Reaktion detektieren (Gavrieli, Sherman, & Ben-Sasson, 1992; Schmitz, Walter, Seibl, & Kessler, 1991). Mittels des „*DermaTACS™ II In Situ Apoptosis Detection Kit*“ (Trevigen) konnte die TUNEL-Methode methodisch analog zu der Immuno-Gold-Markierung durchgeführt werden (Kapitel 4.2.5.4). Die Grids mit den Ultradünnschnitten wurden in Tropfen, die auf Parafilm in einer Feuchtekammer aufgetragen waren gewaschen (1x PBS, 2 x 5 min), permeabilisiert und die 3`OH-Enden freigelegt, indem die Proteine zum Teil denaturiert wurden

#### 4. Material und Methoden

(Proteinase K in 1x PBS, Inkubationszeit ist Protein-abhängig). Um Proteine und Hydroxygruppen visualisieren zu können, musste die Zeit für die Denaturierung der Proteine (hier pKu80: 15 min) so gewählt werden, dass sowohl die 3`OH-Bruchenden frei lagen, als auch noch Proteine vorhanden waren. Diese Methodik ist demnach ausschließlich zur Visualisierung von Verteilungen der Hydroxygruppen und Proteinen zu verwenden. Unspezifische Bindungen wurden mit einer Blocklösung (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in A. dest. mit pH 7,5; 1 x 5 min) abgesättigt. Nach erneutem Waschen (1x PBS, 3 x 5 min) erfolgte die Markierung der Bruchenden durch die Inkubation mit dem „*Labeling-Reaction-Mix*“ (50 ml TdT Puffer, je 1 µl TdT *Biotinylated nucleotide* Nukleosidtriphosphat (B-dNTP) -Mix und TdT Enzym; 30 min bei 37°C), wobei anschließend der „TdT-Stop-Puffer“ (1 x 5 min) die Reaktion beendete. Die Visualisierung der markierten Bruchenden erfolgte über die Avidin-Biotin-Complex (ABC)- Methode. An das Biotin der B-dNTPs band ein spezifischer AK (Anti-BrdU (Bromdesoxyuridin); 1 h bei 37°C) an den wiederum Streptavidin-Gold (in Inkubationspuffer für 1,5 h bei RT) band. Nach erneutem Waschen (1x PBS, 3 x 5 min) konnte anschließend eine Immuno-Gold-Markierung mit einem Goldantikörper anderer Größe, wie zuvor beschrieben (Kapitel 4.2.5.4), durchgeführt werden.

##### 4.2.5.5 Kontrastierung und Analyse am TEM (Quantifizierung am TEM)

Aufgrund ihrer Elemente mit niedriger Ordnungszahl (C, O, N) stellen sich biologische Proben in der TEM nur mit minimalem Kontrast dar. Deshalb musste nach der Immuno-Gold-Markierung eine Schnittkontrastierung mit Uranylacetat stattfinden. Die Schwermetallionen des Uranylacetats werden von der Probe unterschiedlich stark absorbiert, sodass sie sich als unterschiedlich intensiv, markierte Strukturen darstellen. Dabei bindet Uranylacetat (positiv geladen) bevorzugt an Nukleinsäuren (negativ geladen). Der Schwärzungsgrad im späteren Bild spiegelt die Elektronendichte im durchstrahlten Präparat wieder. Das bedeutet, dass Bereiche in denen die Elektronen mit der Probe wechselwirken, somit also gestreut oder absorbiert werden, sich im Bild dunkel darstellen (grau bis schwarz). Die Bereiche, die keine Wechselwirkung erfahren bilden sich im späteren Bild hell (hellgrau bis weiß) ab (Lange & Blödorn, 1981).

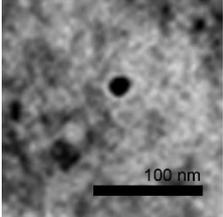
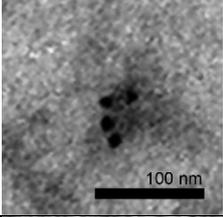
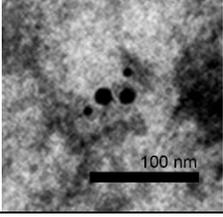
Für die Kontrastierung wurden die zuvor markierten Zellschnitte auf den Grids in kleinen Tropfen mit Uranylacetat (2% in A. dest.) platziert (Abbildung 12, 9.). Mithilfe von Parafilm, der auf den Stegen der Feuchtkammer gespannt war, konnten die Tropfen aufgebracht werden. Die Grids wurden mit den Schnitten nach unten in die

#### 4. Material und Methoden

Uranylacetat-Tropfen gelegt (5 min, RT) und daraufhin dreimalig in destillierten Wassertropfen gewaschen. Mithilfe eines Filterpapiers konnte abschließend überflüssige Flüssigkeit entfernt und die Grids in Gridboxen gelagert werden.

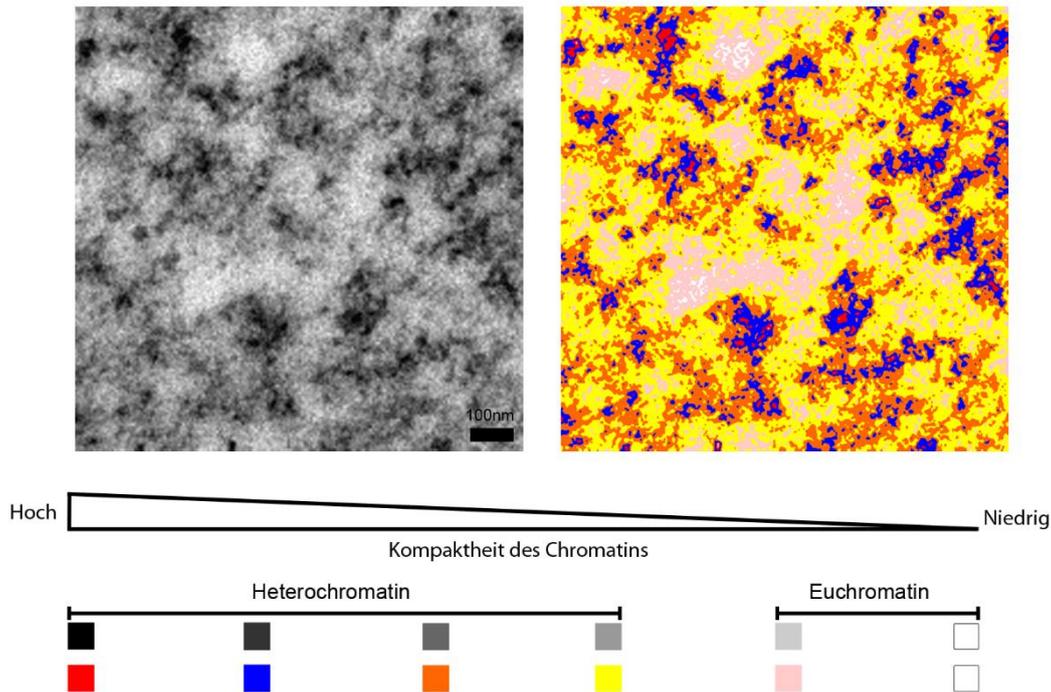
Für die Auswertung jedes Untersuchungszeitpunktes war eine Mindestanzahl von 25 Zellkernanschnitten nötig. Dabei wurden die Doppelmarkierungen für pKu70 (10 nm) und 53BP1 (6 nm), als auch pKu80 (10 nm) und pDNA-PKcs (6 nm) quantitativ, mit den in Tabelle 6 erklärten, Parametern erfasst.

**Tabelle 6: Parameter der Quantifizierung am TEM**

| Parameter      | Erläuterung   | Bilder  |
|----------------|---|---|
| Bead           | Ein Goldpartikel (10 nm oder 6 nm)  |    |
| Cluster        | Anhäufung von Goldpartikeln in räumlicher Nähe zueinander, unter Berücksichtigung des Abstand von 28 nm (Herstellerangabe: Abstand vom Antigen bis zum Mittelpunkt des Goldantikörpers) |   |
| Kolokalisation | 10 nm und 6 nm Beads in räumlicher Nähe zueinander, unter Berücksichtigung des Abstand von 28 nm (Herstellerangabe: Abstand vom Antigen bis zum Mittelpunkt des Goldantikörpers)        |  |
| Lokalisation   | Zugehörigkeit zu Eu- (hell) bzw. Heterochromatin (dunkel)   | Siehe Abbildungen 14 und 17   |

Die Zuordnung zum EC oder HC fand auf der Grundlage der verschiedenen Graustufen (Ermittlung mithilfe der Software Analysis und Photoshop), die durch die Wechselwirkungen (Absorption oder Streuung) der Elektronen mit der Probe entstehen und in sechs Stufen unterteilt waren, statt (Abbildung 14). Des Weiteren wurden festgestellte Veränderungen der Chromatinstruktur (dekondensierte Chromatin-Regionen) ausgezählt und vermessen sowie die Abstände der Beads und Cluster zu diesen dekondensierten Chromatinbereichen ausgemessen und dokumentiert.

#### 4. Material und Methoden

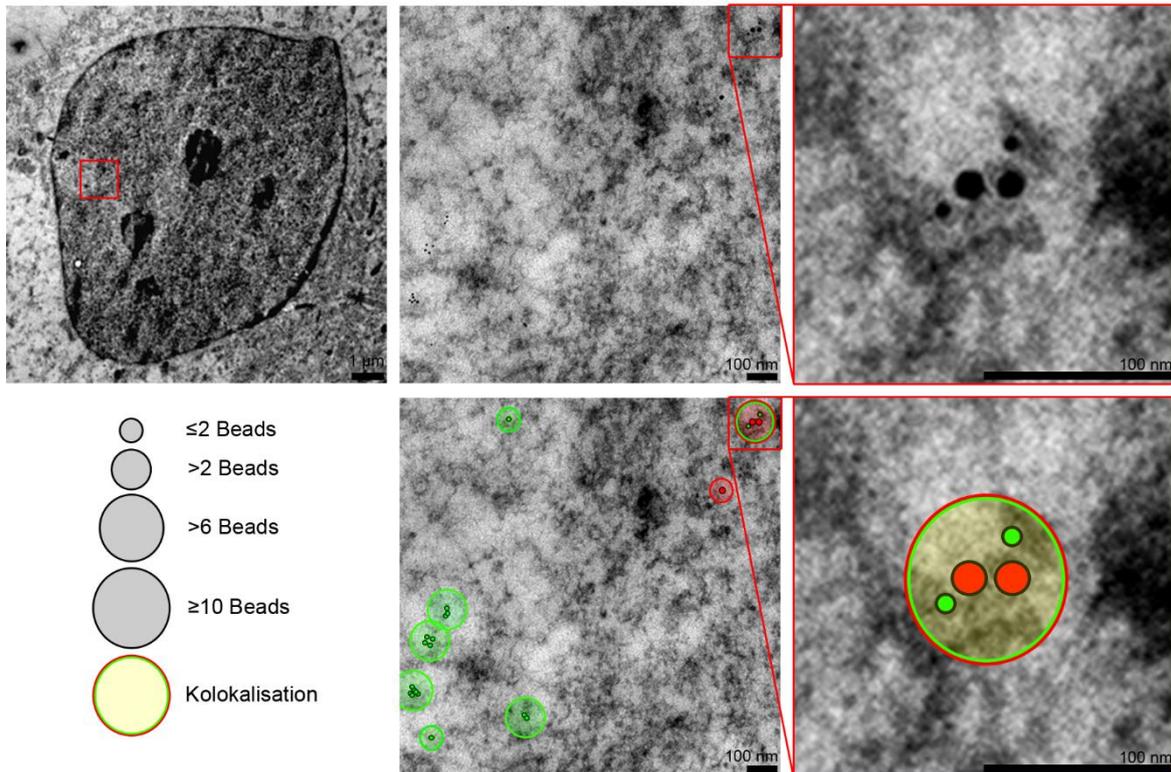


**Abbildung 14: Chromatindichte im TEM**

Das Chromatin stellt sich, je nach Dichte (Kompaktheit), in der TEM mit unterschiedlichen Graustufen dar. Mithilfe der Programme Analysis sowie Photoshop konnten sechs Graustufen definiert werden, die den beiden morphologischen Zuständen (EC und HC) des Chromatins zugeordnet werden konnten. Durch Falschfarbendarstellung ist eine bessere Unterscheidung möglich.

Die TEM Analysen fanden an einem Tecnai G<sup>2</sup> Biotwin der Firma FEI statt (Abbildung 12, 10.). Zur Dokumentation wurden Bilder mit einer Kamera der Firma Gatan (Mega View II) aufgenommen, wobei der Transfer in ein PC-kompatibles Format durch die Software Analysis (Version 3.1) erfolgte. Die Auswertungen und graphischen Darstellungen konnten mithilfe der Programme Excel (Microsoft, Version 2013), OriginPro (Version 8.6), Inkscape (Version 0.48.5) sowie Photoshop (Adobe, CS3) ausgeführt werden. Um die Beads, die sich zum Teil nur schwer vom grau oder schwarz der Chromatinstruktur im Bild unterscheiden ließen, besser erkennen zu können, wurden über diese farbige Kreise gelegt, die sie, entsprechend ihrer Goldantikörpergröße, markierten. Damit die unterschiedlichen Proteine gut zu unterscheiden waren, fanden verschieden farbige Kreise Verwendung. Cluster wurden ebenfalls mit Kreisen entsprechend zur Clustergröße, umrahmt und farblich unterlegt sowie Kollokationen mit den Farben beider Proteine hervorgehoben (Abbildung 15).

#### 4. Material und Methoden



**Abbildung 15: Markierung der Gold-Beads und -Cluster**

Um die Gold-Beads und -Cluster im, zum Teil sehr dunklen, Chromatin gut erkennen zu können wurden sie mit farblichen Kreisen überlagert. Entsprechend der Clustergröße und zur Markierung von Kolokalisationen wurden die Beads und Cluster zum Teil mit farbigen Kreisen umrahmt. Die Relation der Kreise kann variieren, je nach Maßstab des gewählten Bereiches und ist für jede Abbildung in sich zu vergleichen.

Die Beurteilung potenzieller Unterschiede in den ausgezählten Daten konnte mittels des Mann-Whitney-U-Tests (unabhängige Stichproben, nicht normal verteilt) durchgeführt werden, um die statistische Signifikanz zu beurteilen. Verwendet wurde hierfür die Software OriginPro (Version 8.6), wobei das Signifikanzniveau dabei mit  $p \leq 0,05$  definiert war.

## 5. Ergebnisse

Immer noch wird darüber diskutiert, inwieweit welche Strahlenqualität ein bestimmtes DNA-Schadensmuster induziert und wie die Zelle auf den induzierten DNA-Schaden reagiert. Dabei scheint, neben der Schwere und Komplexität des Schadens, die Chromatinstruktur eine sehr wichtige und beeinflussende Bedeutung im Rahmen der DNA-Schadensantwort einzunehmen. Die Umstrukturierung des Chromatins ist im Zuge der DNA-Schadensantwort erforderlich, um Zugang zu der geschädigten DNA zu erhalten, damit der Schaden erkannt und repariert werden kann (Dabin & Polo, 2017). Inwieweit sich das DNA-Schadensmuster sowie die Chromatinveränderungen in Abhängigkeit von der Strahlenqualität darstellen und den zeitlichen Ablauf der Reparatur beeinflussen ist weitestgehend noch unklar und wird in dieser Arbeit detaillierter untersucht.

### 5.1 Identifizierung und Charakterisierung der Chromatinstruktur in HSF1-Zellen

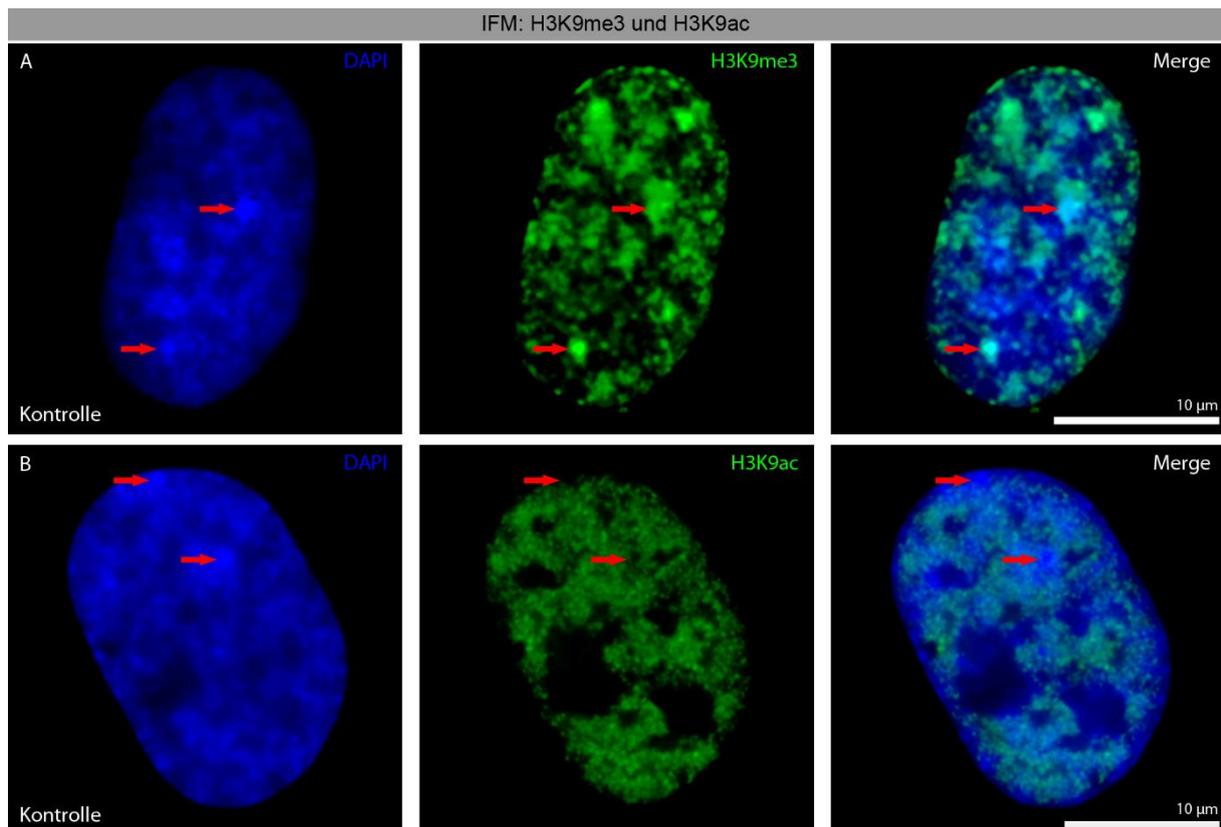
Für die Untersuchungen von strahleninduzierten DSBs im Kontext des Chromatins ist es von erheblicher Bedeutung, die Chromatinstruktur klar identifizieren und charakterisieren zu können. Die HSF1-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, zeichnen sich durch eine gleichmäßig verteilte Chromatinstruktur aus, in der strukturelle Auffälligkeiten gut charakterisierbar sind. Die Unterscheidung zwischen euchromatischen und heterochromatischen Schäden stellt dabei eine wichtige Grundlage der Untersuchungen dar.

#### 5.1.1 Untersuchung der Chromatinstruktur: Euchromatische und heterochromatische Chromatinmodifikationen in HSF1-Zellen

Die Kompaktheit des Chromatins wird vor allem durch spezifische Histonmodifikationen definiert. Um den Einfluss der Chromatinstruktur im Kontext der Signaltransduktionskaskade und der Reparatur von DSBs zu untersuchen, wurden zunächst in unbestrahlten Kontrollen verschiedene Histonmodifikationen Immunfluoreszenz-markiert. Die Histonmodifikation H3K9me3 steht für stark kondensiertes und transkriptionell inaktives HC. Als Marker für locker gepacktes, transkriptionell aktives EC wurde die Histonmodifikation H3K9ac verwendet. Durch Markierungen von EC- und HC-spezifischen Histonmodifikationen konnten die Verteilungen der beiden morphologischen Zustände des Chromatins (EC und HC) in HSF1-Zellen dargestellt werden. Mithilfe des DNA-Farbstoffes DAPI ließen sich verschiedene DNA-Strukturen fluoreszenzmikroskopisch visualisieren. Die geringe

## 5. Ergebnisse

Dichte des diffusen, locker gepackten, transkriptionell aktiven EC erscheint nur schwach blau, wohingegen das kondensierte, dicht gepackte und inaktive HC eine intensivere Blaufärbung zeigt. In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass die Histonmodifikation H3K9me3 besonders in stark DAPI-positiven Regionen ausgeprägt war (Abbildung 16 A). Für H3K9ac war ein gegenläufiges Signal zu beobachten. Dort, wo ein starkes DAPI-Signal zu beobachten war, konnte nur ein schwaches oder gar kein Signal für H3K9ac erkannt werden (Abbildung 16 B).



**Abbildung 16: Histonmodifikationen in der IFM**

Immunfluoreszenzmarkierung der Histonmodifikationen H3K9me3 und H3K9ac (jeweils grün) in unbestrahlten HSF1-Zellen (Kontrollen). Die beiden Modifikationen sind spezifisch für dichtes Chromatin (H3K9me3) und offenes Chromatin (H3K9ac). DNA-reiche, stark heterochromatische Bereiche sind anhand des intensiven DAPI-Signals (blau) zu erkennen. Die verschiedenen Fluoreszenzen (blau und grün) sind sowohl getrennt voneinander (links und mittig) als auch überlagert (Merge, rechts) dargestellt. A: Die Regionen, die ein stark positives Signal für den DNA-Farbstoff DAPI aufwiesen, zeigten ebenfalls ein starkes Signal für H3K9me3 (rote Pfeile). B: Die stark positiven DAPI-Bereiche waren negativ oder nur schwach positiv für H3K9ac (rote Pfeile).

## 5. Ergebnisse

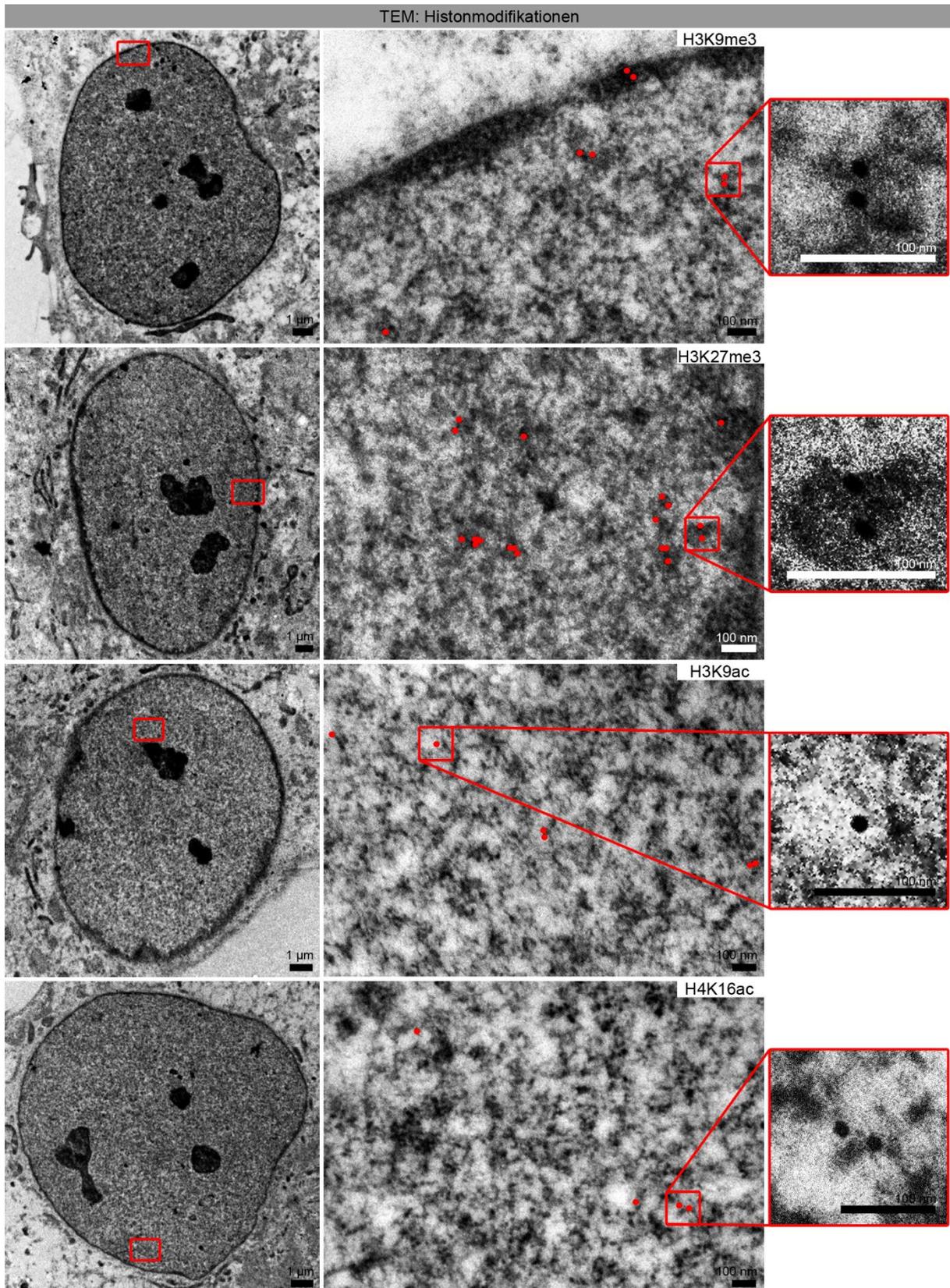
Die hohe Auflösung der TEM ermöglichte eine wesentlich detailliertere Darstellung der Chromatinstruktur. Mithilfe der Kontrastierung (Kapitel 4.2.5.5), bei der an die negativ geladene DNA positiv geladenes Uranylacetat gebunden wurde, ließ sich die DNA-Dichte durch die TEM in unterschiedlichen Graustufen darstellen (siehe Abbildung 14). Die Bereiche, die dunkel erscheinen sind sehr kompakt, wohingegen Bereiche die hell erscheinen locker gepackt sind.

Zusätzlich zu H3K9me3 und H3K9ac wurden als weitere Modifikationen, H3K27me3 für das HC und für eine offenerere Chromatinstruktur H4K16ac markiert.

Die Verteilung der Goldbeads zeigte, dass H3K9me3 sowie H3K27me3 ausschließlich in dunkelgrauen bis schwarzen Bereichen des Chromatins zu beobachten waren, wohingegen die acetylierten Histone H3K9ac und H4K16ac überwiegend in weißen bis hellgrauen Bereichen des Chromatins vorkamen (Abbildung 17).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden sechs Graustufen mithilfe der Software Analysis und Photoshop den beiden Zuständen des Chromatins zugeordnet (Abbildung 14). Somit war es möglich, die Beads und Cluster anhand ihrer Lokalisation dem EC und HC zuzuordnen. Beads und Cluster, die in weißen bis hellgrauen Bereichen lokalisiert waren, wurden dem EC zugeordnet, wohingegen alle anderen Beads und Cluster, die in dunkleren Abstufungen zu beobachten waren, dem HC zugeordnet wurden. Wenn ein Cluster mit mehreren Beads in Randbereichen zwischen den beiden Chromatinzuständen zu erkennen war, wurde es dem Zustand zugeordnet, in dem mehr Beads vorlagen.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 17: Chromatinstruktur und Histonmodifikationen visualisiert mittels TEM**

Chromatinstruktur und Immuno-Gold-Markierung (10 nm, rot) verschiedener Histonmodifikationen in unbestrahlten HSF1-Zellen (Kontrollen). In den Zellen war eine gleichmäßig über den gesamten Zellkern verteilte Chromatinstruktur zu beobachten. Durch den immunologischen Nachweis der Histonmodifikationen H3K9me3 und H3K27me3 war zu erkennen, dass die Beads und Cluster ausschließlich in dunkleren, dichteren Bereichen (grau bis schwarz) des Chromatins (heterochromatische Domänen) zu beobachten waren, wohingegen die Histonmodifikationen H3K9ac

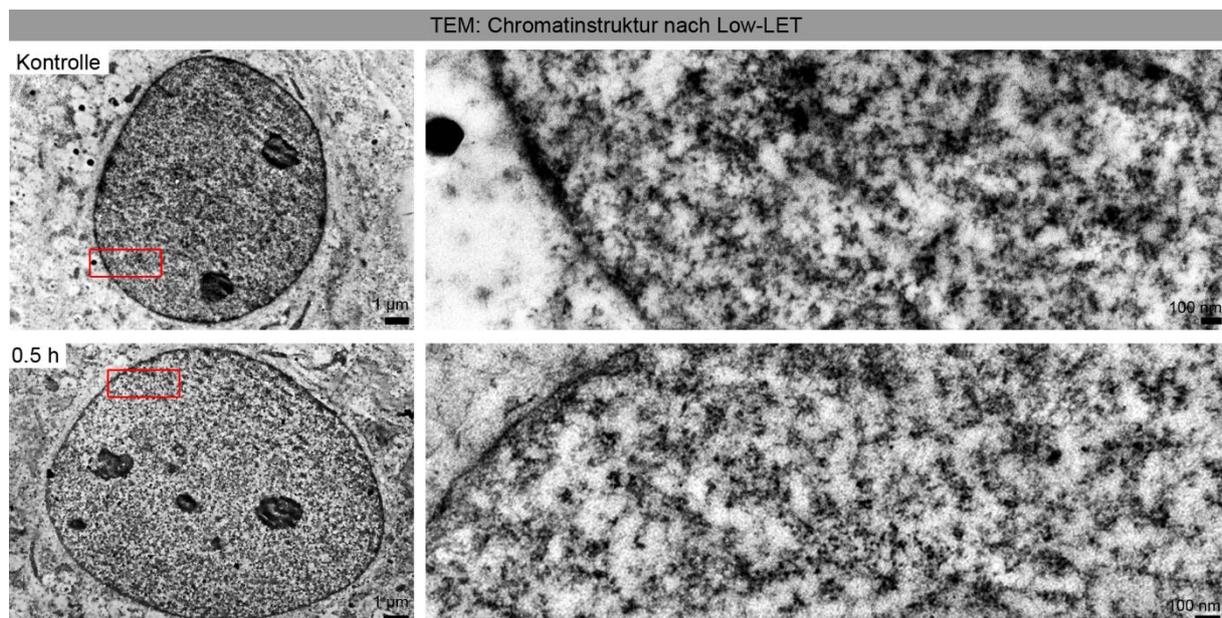
## 5. Ergebnisse

sowie H4K16ac in helleren, weniger dichten Bereichen (hellgrau bis weiß, euchromatische Regionen) detektierbar waren. Die roten Kästen markieren vergrößerte Bereiche des jeweiligen Übersichtsbildes.

### 5.2 Die Chromatinstruktur nach Bestrahlung

Während der strahleninduzierten DNA-Schadensantwort stellt die Struktur des Chromatins einen wichtigen, über Histonmodifikationen kontrollierten Parameter für die Reparatur dar. Sie ist eine natürliche Barriere für die Anlagerung der Reparaturfaktoren. Ein induzierter DNA-Schaden muss zunächst im Kontext der vorherrschenden Chromatinstruktur detektiert und freigelegt werden, bevor eine Reparatur stattfinden kann. Aus diesem Grund wurde die Ultrastruktur des Chromatins nach Bestrahlung mittels Markierung der für EC und HC spezifischen Histonmodifikationen näher untersucht.

Wie schon in Abbildung 17 gezeigt wurde, besitzen die humanen, dermalen Fibroblasten eine gleichmäßig verteilte Chromatinstruktur, die es möglich macht Auffälligkeiten in der Chromatindichte im Rahmen der DNA-Schadensantwort zu erkennen. Nach der Low-LET Bestrahlung mit 10 Gy Photonen wurde die Chromatinverteilung, nach den definierten Reparaturzeitpunkten (0.1, 0.5, 5 und 24 h), mittels der TEM näher betrachtet. Dabei konnten keine deutlichen Veränderungen im Vergleich zu Passage-entsprechenden Kontrollen (unbestrahlt) festgestellt werden. Die Zellen zeigten weiterhin an allen Reparaturzeitpunkten eine homogene Chromatinstruktur (Abbildung 18).



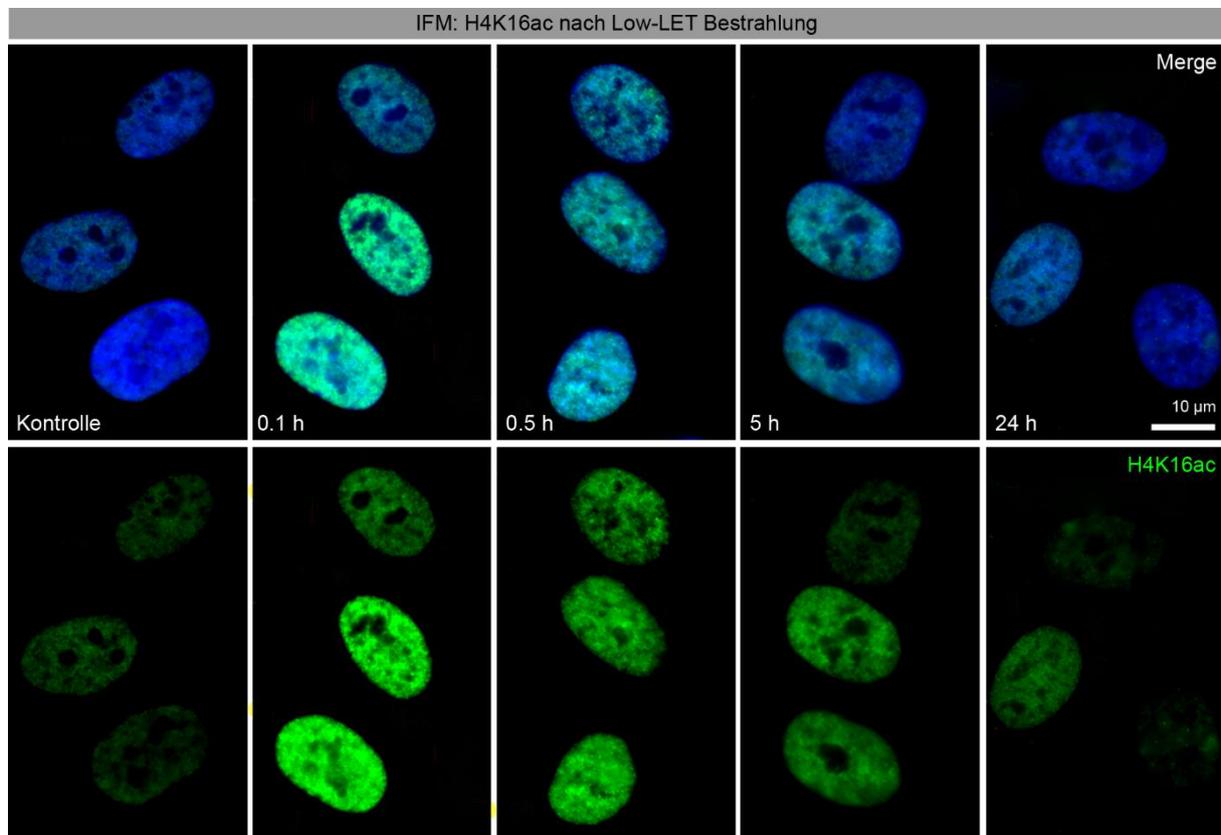
**Abbildung 18: Chromatinstruktur nach Low-LET Bestrahlung**

Repräsentative Bilder der Chromatinstruktur (Kontrolle und 0.5 h) nach Low-LET Bestrahlung mit 10 Gy Photonen in HSF1-Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle konnten keine Veränderungen in der Chromatindichte nach Low-LET Bestrahlung beobachtet werden. Die roten Kästen markieren den vergrößerten Bereich des jeweiligen Übersichtsbildes.

## 5. Ergebnisse

Obwohl mittels TEM keine Chromatinveränderungen nach Low-LET Bestrahlung visuell detektierbar waren, kann es trotzdem zu Umstrukturierungen im Rahmen der DNA-Schadensantwort kommen. Diese sind abhängig von Histonmodifikationen, wie H4K16ac (Bird et al., 2002; Rea, Xouri, & Akhtar, 2007).

Die Markierung von H4K16ac nach Bestrahlung mit 10 Gy Photonen zeigte im zeitlichen Verlauf einen Anstieg des H4K16ac-Signals. Bereits 0.1 h nach der Bestrahlung konnte ein sehr intensives Signal beobachtet werden, welches nach 0.5 h ebenfalls noch deutlich erhöht war. Bis 5 h nach der Bestrahlung nahm das Signal wieder ab und zeigte nach 24 h eine ähnliche Intensität wie die Kontrolle (Abbildung 19). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine Öffnung des Chromatins über H4K16ac unmittelbar nach Bestrahlung induziert wurde.



**Abbildung 19: Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von H4K16ac nach Low-LET Bestrahlung**

Immunfluoreszenz-Markierung von H4K16ac (grün) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) der HSF1-Zellen, 0.1, 0.5, 5 und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy Photonen. Das Intensitätssignal für H4K16ac nahm direkt (0.1 h) nach Bestrahlung zu. Erst nach 24 h hatte die Signalintensität wieder Kontrollniveau. Das H4K16ac-Signal wurde im unteren Bildbereich getrennt vom DAPI-Signal dargestellt.

## 5. Ergebnisse

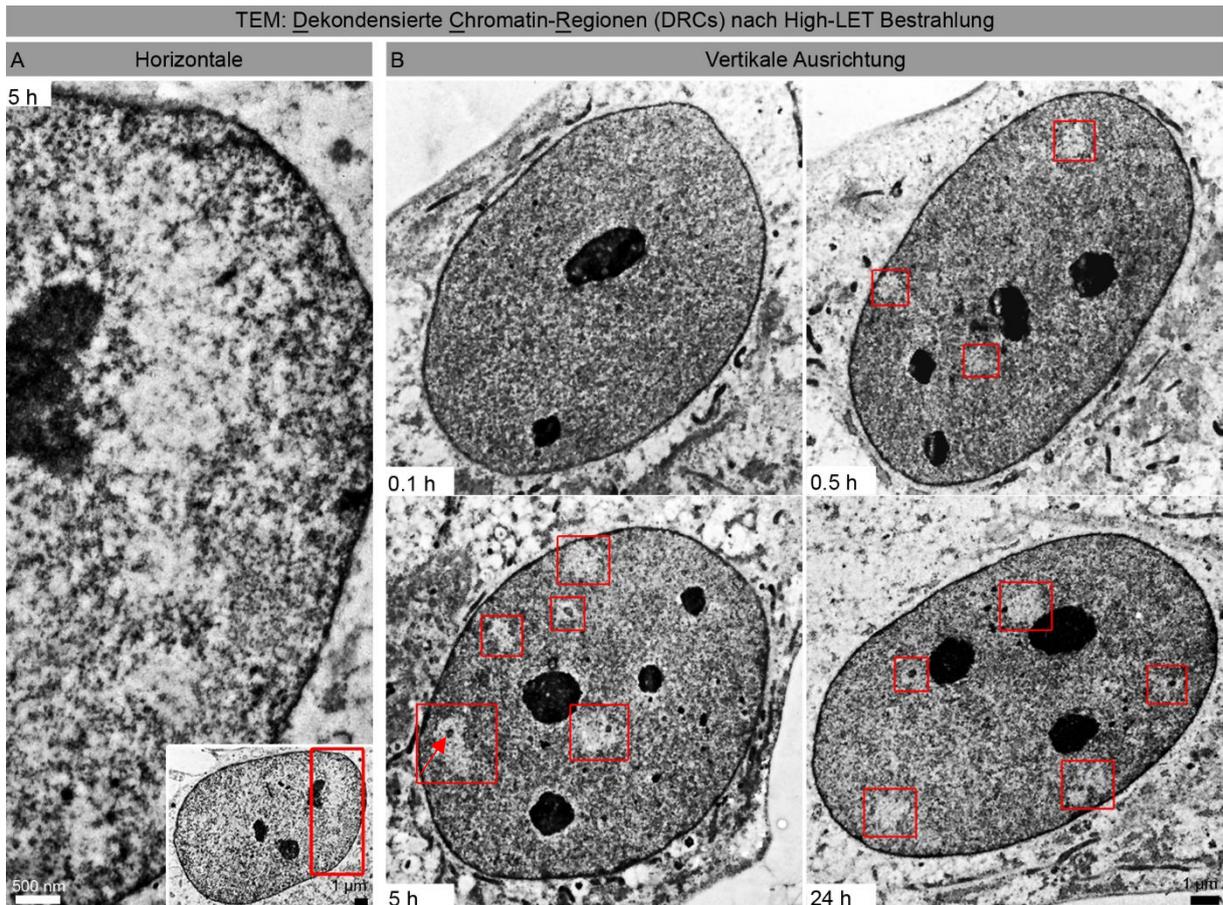
Im Gegensatz zu der Bestrahlung mit Low-LET, bei der die Photonen zufällig verteilt den Zellkern durchdrangen, konnte die High-LET Bestrahlung mit Schwerionen (Calcium oder Carbon) aus zwei verschiedenen Winkeln erfolgen. Das bedeutet, dass die Probe zum Teilchenstrahl unterschiedlich ausgerichtet (horizontal oder vertikal) werden konnte (siehe Abbildung 10).

In Abhängigkeit von der angewandten Ausrichtung der Zellen zum Teilchenstrahl konnten massive Veränderungen in der Chromatindichte beobachtet werden, die sich erheblich von entsprechenden Kontrollen unterschieden (Abbildung 20). Diese Bereiche bildeten sich als deutlich sichtbare, helle Regionen (durchlässiger für Elektronen) von der restlichen Chromatinstruktur ab.

Nach High-LET Bestrahlung mit Calciumionen in horizontaler Ausrichtung stellten sich diese Bereiche als lineare Spuren mit dekondensiertem Chromatin, welche den gesamten Zellkern durchzogen, dar (Abbildung 20 A).

Nach High-LET Bestrahlung mit Carbonionen in vertikaler Ausrichtung konnten die Veränderungen als in unterschiedlicher Anzahl auftretende, Elektronen-durchlässigere Regionen beobachtet werden (Abbildung 20 B). Diese Bereiche wurden als dekondensierte Chromatin-Regionen (DCRs) definiert. Zum Teil konnten im Inneren der DCRs oder auch randständig stark kondensierte Chromatinbereiche lokalisiert werden (Pfeil in Abbildung 20 B). Während 0.1 h nach High-LET Bestrahlung noch keine DCRs zu erkennen waren, konnten diese erstmalig nach 0.5 h beobachtet werden. Nach 5 h erschienen sie größer, waren deutlich erkennbar und wurden sogar nach 24 h noch nachgewiesen (Abbildung 20 B).

## 5. Ergebnisse

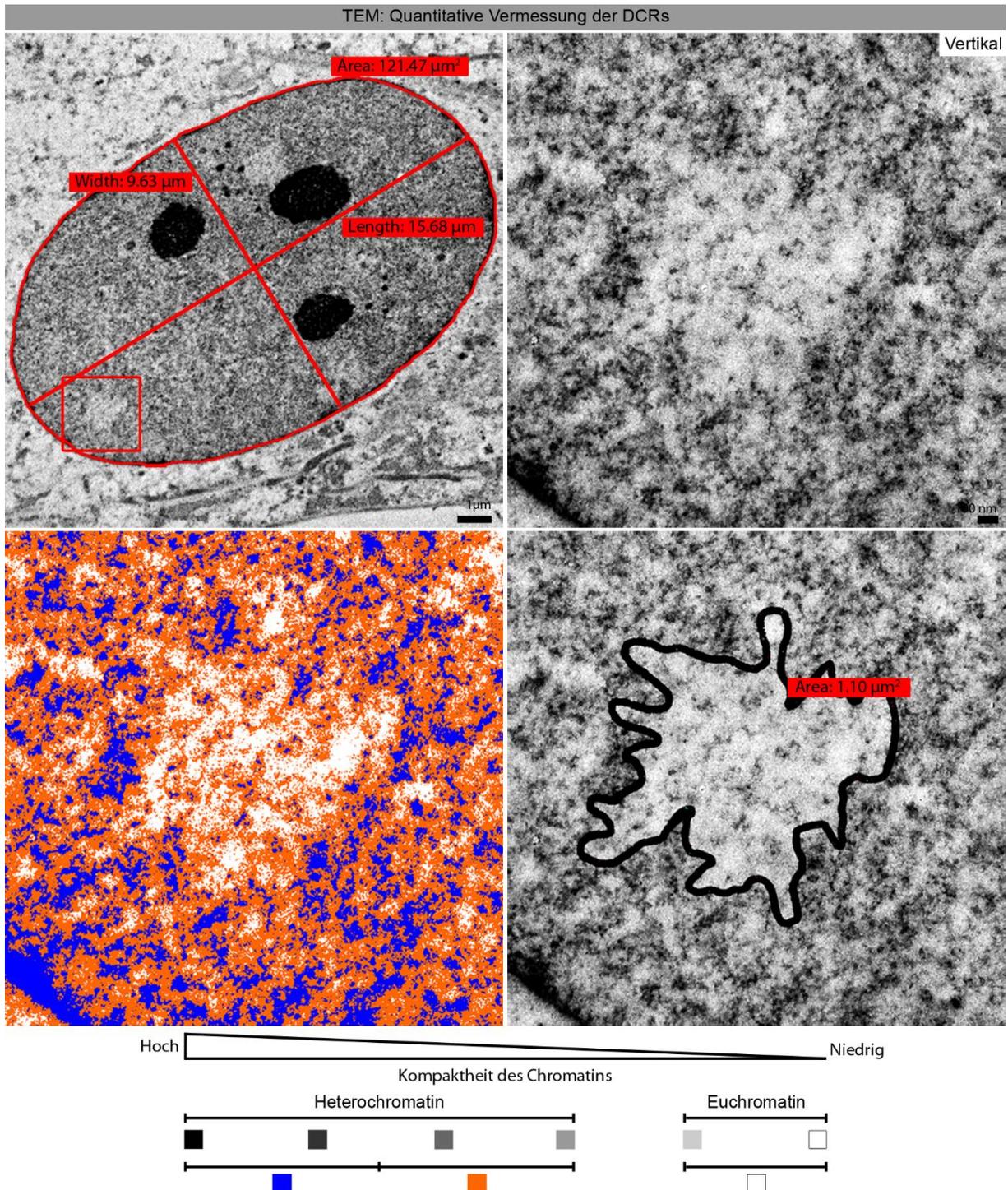


**Abbildung 20: Dekondensierte Chromatin-Regionen (DCRs) nach High-LET Bestrahlung**

A: Chromatinstruktur im Bereich einer Ionenspur, 5 h nach High-LET Bestrahlung mit Calciumionen (horizontal) in HSF1-Zellen. Eine deutlich sichtbare Spur, die sich über die Breite des gesamten Zellkerns erstreckte, war zu beobachten. Zum Teil waren kondensierte Bereiche innerhalb oder am Rand dieser zu erkennen. Der rote Kasten markiert die vergrößerte Darstellung des Bereiches aus der Zellkernübersicht (rechts unten). B: Die Chromatinstruktur 0.1, 0.5, 5 und 24 h nach High-LET Bestrahlung mit Carbonionen (vertikal) in HSF1-Zellen. Während die Chromatinstruktur nach 0.1 h noch keinerlei Veränderungen zeigte, waren nach 0.5 h deutlich sichtbare, aufgehellte Bereiche, die in Anzahl und Größe bis 5 h zunahmten und sogar noch nach 24 h zu beobachten waren, zu erkennen. Die Chromatinveränderungen wurden als dekondensierte Chromatin-Regionen (DCRs) bezeichnet. Zum Teil enthielten die DCRs stark kondensierte Chromatinbereiche (siehe roter Pfeil). Die roten Kästen markieren Bereiche in denen DCRs zu erkennen waren.

Unter Zuhilfenahme der Software Analysis wurden die DCRs genauer charakterisiert. Die Anzahl an DCRs pro Zelle wurde gezählt und anhand von Graustufen die zugehörige Fläche der DCRs definiert, vermessen und dokumentiert. Für die Zellen wurden die Flächen, als auch die Durchmesser dokumentiert.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 21: Prinzip der quantitativen Erfassung und Vermessung der DCRs**

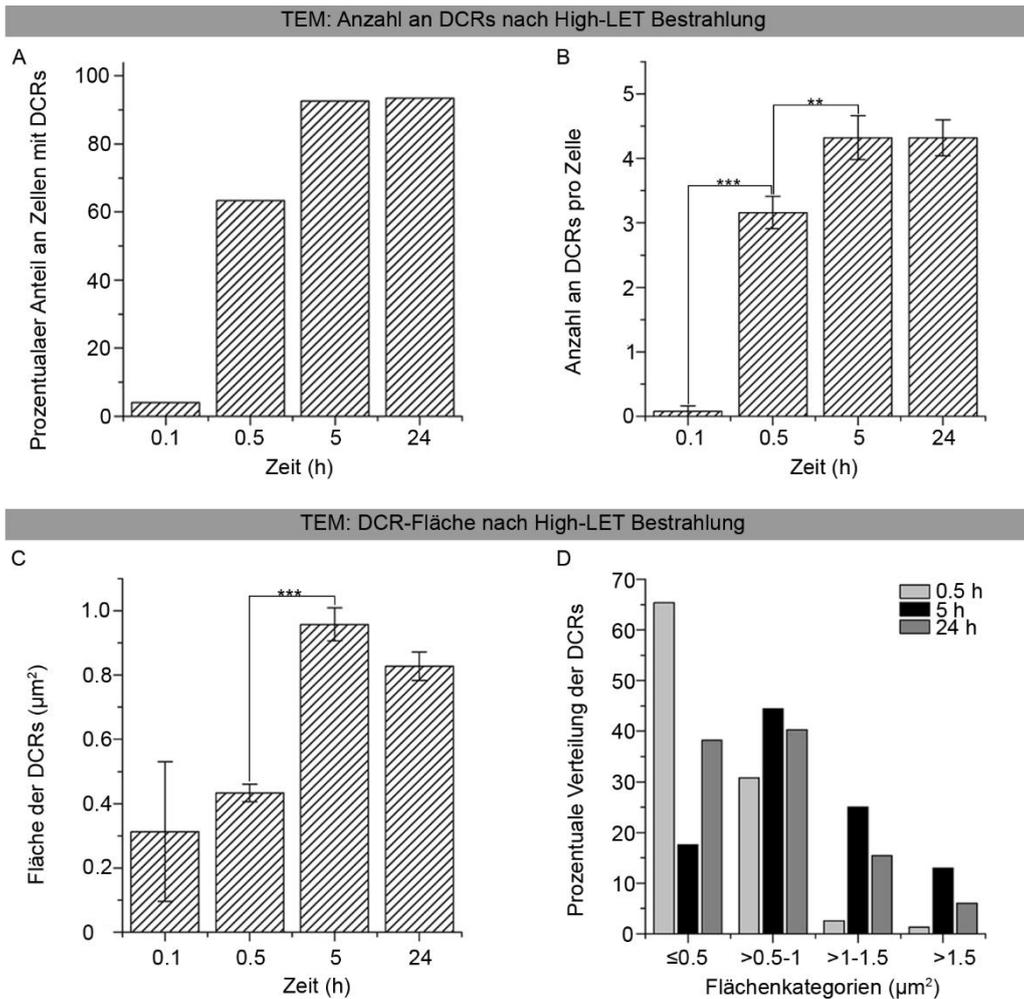
Mithilfe der TEM-Software Analysis konnten die Zellkernanschnitte vermessen (oben links, rote Markierungen) und mittels zugeordneter Graustufen (repräsentieren Kompaktierungsstufen des Chromatins (unten mittig)) die DCRs Nanometer-genau definiert, quantifiziert und ausgemessen (oben und unten rechts) werden. Zur eindeutigeren Visualisierung wurde ein Beispiel in Falschfarben dargestellt (unten links). Der rote Kasten (oben links) markiert den vergrößerten Bereich der anderen Bilder.

Die quantitative Auswertung der Charakterisierung der DCRs ist in Abbildung 22 dargestellt. Nach 0.1 h konnten in nur einer einzigen Zelle DCRs (4,00%) festgestellt werden, wohingegen nach 0.5 h schon 63,41% der Zellen DCRs aufwiesen und nach 5 h nahezu alle Zellen mindestens eine DCR zeigten (92,59%). Selbst 24 h nach High-LET Bestrahlung waren in einem Großteil der Zellen immer noch DCRs zu beobachten (93,55%) (Abbildung 22 A).

Dementsprechend nahm ebenfalls die Anzahl der DCRs pro Zelle mit der Zeit bis 5 h (5 h:  $4,32 \pm 0,34$  DCRs/Zelle) zu und blieb bis 24 h ( $4,32 \pm 0,28$  DCRs/Zelle) (Abbildung 22 B) konstant. Diese Beobachtungen korrelieren mit der berechneten Fluenz (Anzahl an durchdringenden Teilchen pro Fläche) von  $5 \times 10^6$  Partikeln pro  $\text{cm}^2$ . Diese Fluenz sollte, bei einer durchschnittlichen Zellkernfläche von  $91,99 \mu\text{m}^2$  (HSF1-Zellen) und einer Poisson-Verteilung, im Mittel zu fünf Treffer pro Zellkern führen und konnte somit auf Chromatinebene nachvollzogen werden (Abbildung 20 und 22 B).

Die Fläche der DCRs nahm ebenfalls mit der Zeit zu. Zunächst waren kleine DCRs (0.1 h:  $0,31 \pm 0,21 \mu\text{m}^2$ , 0.5 h:  $0,43 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ ) zu erkennen. Nach 5 h ( $0,96 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ ) konnten die größten DCRs beobachtet werden, die nach 24 h ( $0,83 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$ ) nur geringfügig in ihrer Fläche abnahmen (Abbildung 22 C). Durch das Einteilen der DCR-Flächen in Kategorien war erkennbar, dass 0.5 h nach der High-LET Bestrahlung die meisten DCRs noch sehr klein waren ( $\leq 0,5$ : 65%,  $> 0,5$  bis 1: 31%,  $> 1$  bis 1,5: 3% und  $> 1,5$ : 1%). Nach 5 h konnten die meisten DCRs den größeren Flächenkategorien zugeordnet werden ( $\leq 0,5$ : 18%,  $> 0,5$  bis 1: 44%,  $> 1$  bis 1,5: 25% und  $> 1,5$ : 13%), wohingegen nach 24 h nur noch einzelne größere DCRs zu erkennen waren. Die meisten DCRs konnten nach 24 h den kleineren Flächenkategorien zugeordnet werden ( $\leq 0,5$ : 38%,  $> 0,5$  bis 1: 40%,  $> 1$  bis 1,5: 15% und  $> 1,5$ : 6%) (Abbildung 22 D).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 22: Quantitative Charakterisierung der DCRs nach High-LET Bestrahlung in vertikaler Ausrichtung**

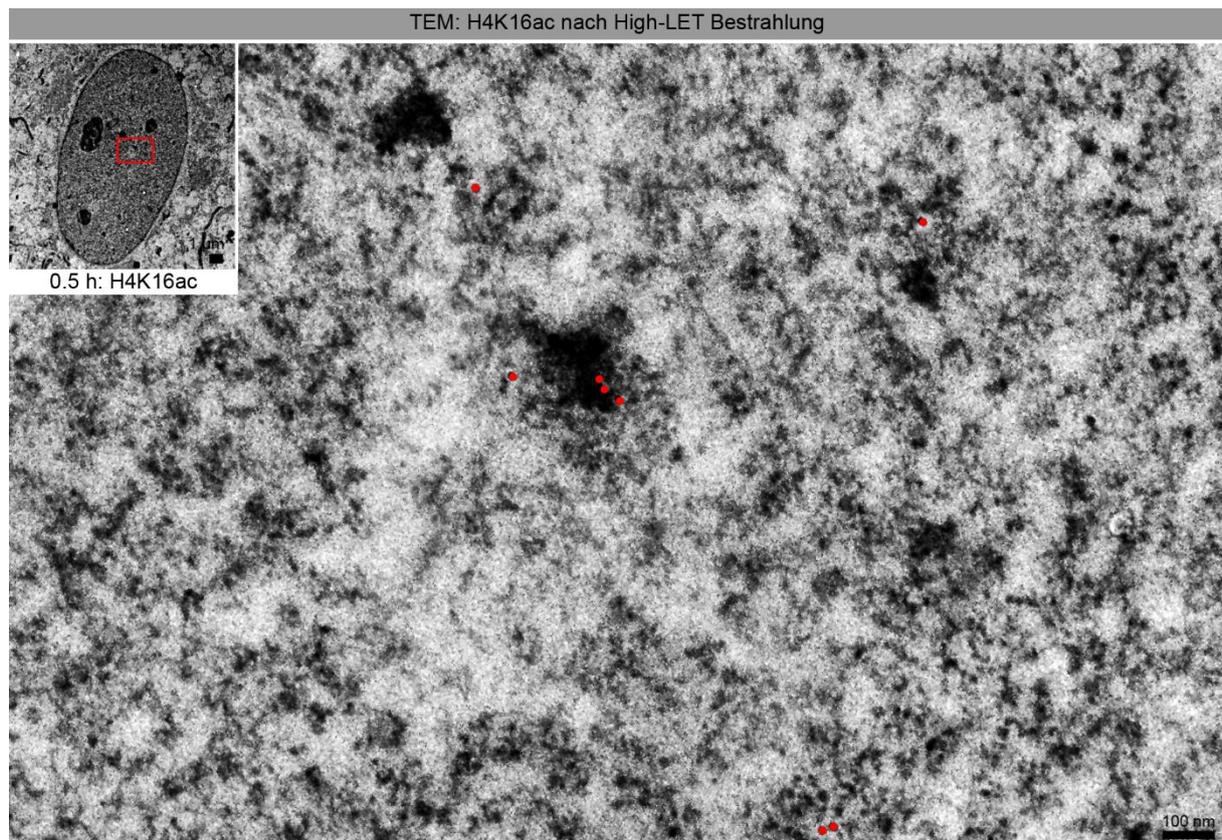
Erfassung des prozentualen Anteils an Zellen, die mindestens eine DCR zeigten, der Anzahl an DCRs pro Zelle sowie der Flächen der DCRs, 0,1, 0,5, 5 und 24 h nach High-LET Bestrahlung mit Kohlenstoffionen bei vertikaler Ausrichtung der HSF1-Zellen zur Stahlquelle. A: Die Erfassung des prozentualen Anteils an Zellen, die mindestens eine DCR zeigten, stieg bis 24 h nach Bestrahlung an. Aufgrund der prozentualen Verteilung war keine Angabe des Standardfehlers und der Signifikanzen möglich. B: Die Anzahl an DCRs pro Zelle stieg bis 5 h an und blieb bis 24 h konstant. \*: Signifikant ( $p$  liegt zwischen  $>0,01 - 0,05$ ). \*\*: Hoch signifikant ( $p$  liegt zwischen  $>0,001 - 0,01$ ). \*\*\*: Höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte von 25 ausgezählten Zellkernanschnitten. C: Die Werte der Flächenmessung der DCRs stiegen bis 5 h nach Bestrahlung an. \*: Signifikant ( $p$  liegt zwischen  $>0,01 - 0,05$ ). \*\*: Hoch signifikant ( $p$  liegt zwischen  $>0,001 - 0,01$ ). \*\*\*: Höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte von 25 ausgezählten Zellkernanschnitten. D: Die Kategorisierung der Flächenwerte zeigte, dass die meisten größeren Werte nach 5 h auftraten und nach 24 h nur noch vereinzelt größere Flächenwerte zu beobachten waren. Aufgrund der prozentualen Verteilung ist keine Angabe des Standardfehlers und der Signifikanzen möglich.

Diese Ergebnisse deuten auf eine DCR-Ausbildung innerhalb von 5 h hin, bei der diese sich im weiteren zeitlichen Verlauf (24 h) nur geringfügig in Anzahl und Größe veränderten. 48 h nach der High-LET Bestrahlung waren keine Zellen mehr vorhanden.

## 5. Ergebnisse

Um nachweisen zu können, dass es sich bei den DCRs um offenes Chromatin handelt, wurden die spezifisch für EC und HC stehenden Histonmodifikationen im Kontext der DCRs visualisiert.

Die Histonmodifikation H4K16ac trat in höherer Anzahl nur 0.5 h nach High-LET Bestrahlung in und um die DCRs auf. Dabei waren die Beads und Cluster sowohl in euchromatischen Domänen, als auch dem HC zugeordneten Bereichen zu beobachten (Abbildung 23). Zu späteren Zeitpunkten (5 h und 24 h) konnten nur noch sehr vereinzelt Beads detektiert werden.

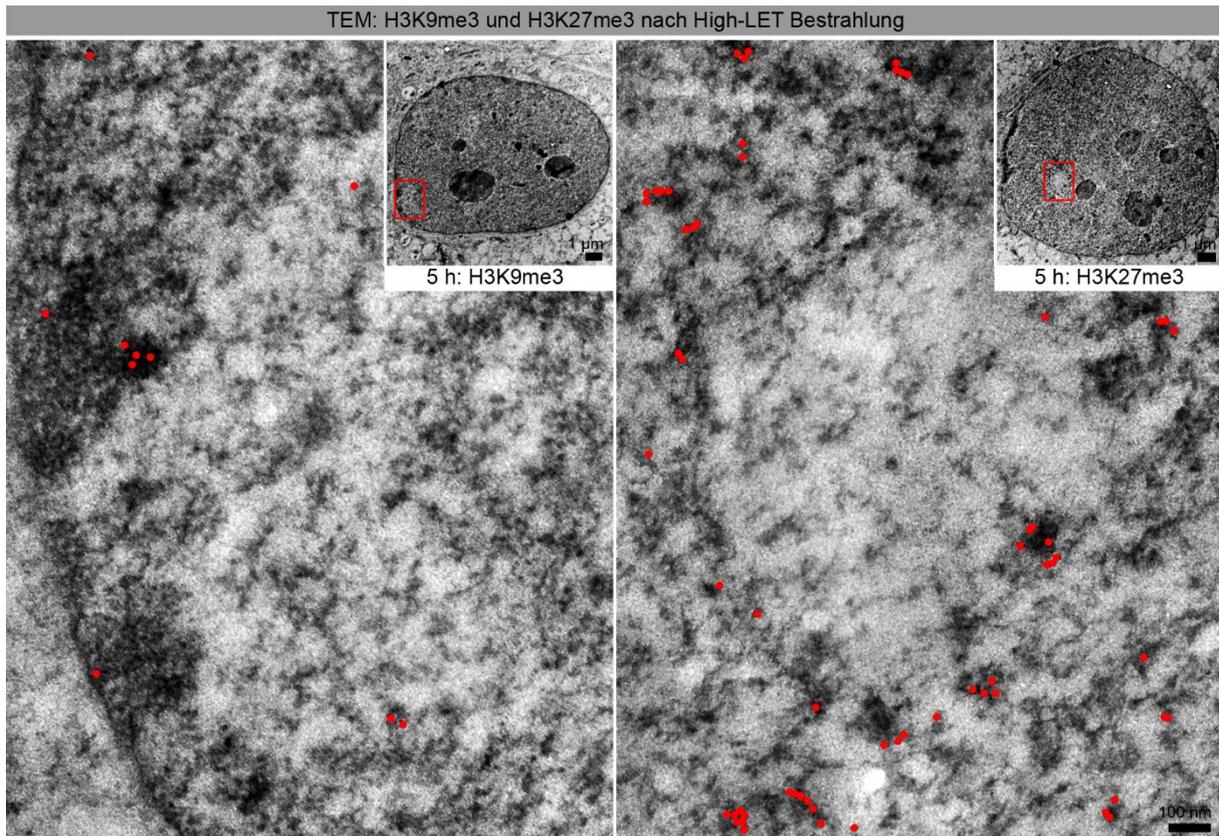


**Abbildung 23: Die Histonmodifikation H4K16ac nach High-LET Bestrahlung**

Repräsentative Darstellung der Histonmodifikation H4K16ac (10 nm, rot) 0.5 h nach High-LET Bestrahlung im Kontext der sich ausbildenden DCR. Die Beads traten in euchromatischen sowie heterochromatischen Bereichen in und um die DCR auf. Der rote Kasten in der Zellkernübersicht (oben links) entspricht dem vergrößerten Bereich im Bild.

Die repräsentativen Bilder der markierten Histonmodifikationen H3K9me3 und H3K27me3 zeigten sowohl nach 0.5 h als auch nach 5 h der High-LET Bestrahlung annähernd dasselbe Verteilungsmuster. Beide Modifikationen waren nicht in den euchromatischen Domänen der DCRs vorhanden, sondern nur im HC zu beobachten (Abbildung 24).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 24: Die Histonmodifikationen H3K9me3 und H3K27me3 nach High-LET Bestrahlung**  
Immuno-Gold-Markierung der Histonmodifikationen H3K9me3 (10 nm, rot, links) und H3K27me3 (10 nm, rot, rechts) 5 h nach High-LET Bestrahlung mit Carbonionen in vertikaler Ausrichtung im Kontext der DCRs. Die Histonmodifikationen waren nicht innerhalb der DCRs lokalisiert. Die roten Kästen in den Zellkernübersichten (je oben rechts) markieren den vergrößerten Bildbereich.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Gegensatz zu H4K16ac innerhalb der DCRs keine dem HC zugeordneten Histonmodifikationen nachweisbar waren.

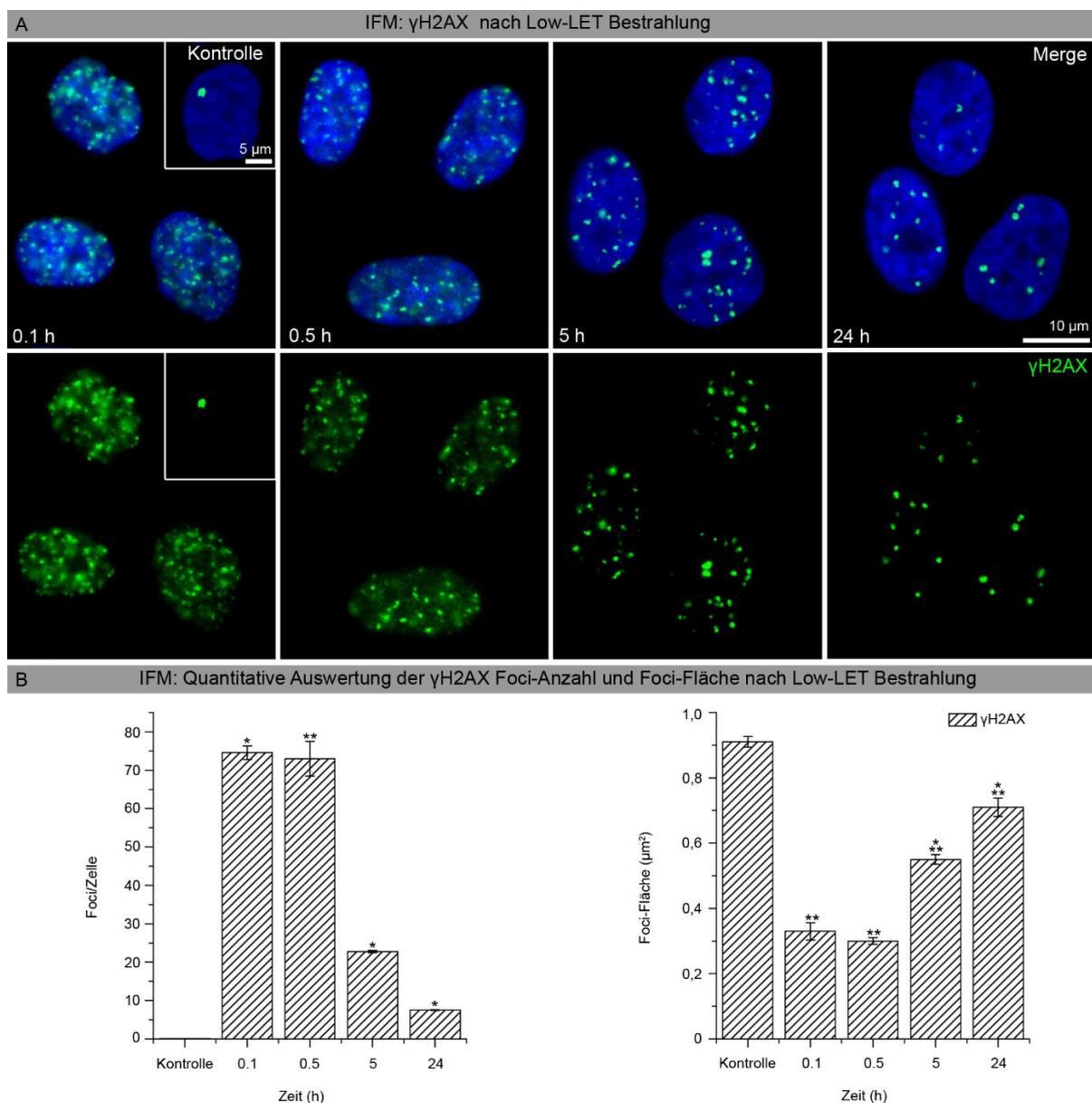
### 5.3 Chromatinveränderungen stehen in Verbringung mit der Akkumulation verschiedenster Reparaturfaktoren

Nachdem die Chromatinstruktur im Rahmen einer Bestrahlung näher betrachtet wurde, stellt sich die Frage, welche Proteine der Signaltransduktionskaskade zu welchem Zeitpunkt und in welcher Anzahl im Zellkern akkumulieren und wie sich das DNA-Schadensmuster darstellt. Deshalb wurden die Zellen nach Low- sowie High-LET Bestrahlung und nach festgelegten Reparaturzeitpunkten (0.1, 0.5, 5 und 24 h) fixiert, verschiedene Proteine immunologisch markiert, mikroskopisch detektiert und/oder die Proteinverteilungen quantifiziert. Des Weiteren konnten durch Doppelmarkierungen mögliche Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen herausgestellt werden.

## 5. Ergebnisse

### 5.3.1 Globale Verteilung und spezifische Akkumulation von Reparaturfaktoren nach Low-LET Bestrahlung

Im zeitlichen Verlauf nach einer Bestrahlung mit 10 Gy Photonen konnte für die Histonmodifikation  $\gamma$ H2AX, welche in Verbindung mit der DNA-Schadensantwort steht, schon nach 0.1 h ( $74,57 \pm 1,75$  Foci/Zelle) eine zunehmende Foci-Anzahl im Vergleich zur Kontrolle ( $0,11 \pm 0,01$  Foci/Zelle) beobachtet werden, die bis 24 h ( $7,54 \pm 0,12$  Foci/Zelle) wieder zurückging. Die Foci-Fläche hingegen nahm mit zunehmender Reparaturzeit zu (0.1 h:  $0,33 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ , 0.5 h:  $0,30 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ , 5 h:  $0,55 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ , 24 h:  $0,71 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ ) (Abbildung 25 B). Die Ergebnisse zeigten nach Low-LET Bestrahlung eine unmittelbare Akkumulation (0.1 h) von  $\gamma$ H2AX.



**Abbildung 25: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von  $\gamma$ H2AX nach Low-LET Bestrahlung**

A: Immunfluoreszenz-Markierung von  $\gamma$ H2AX (grün) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) in HSF1-Zellen, 0.1, 0.5, 5 und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy Photonen sowie in der Kontrolle (Inset bei 0.1

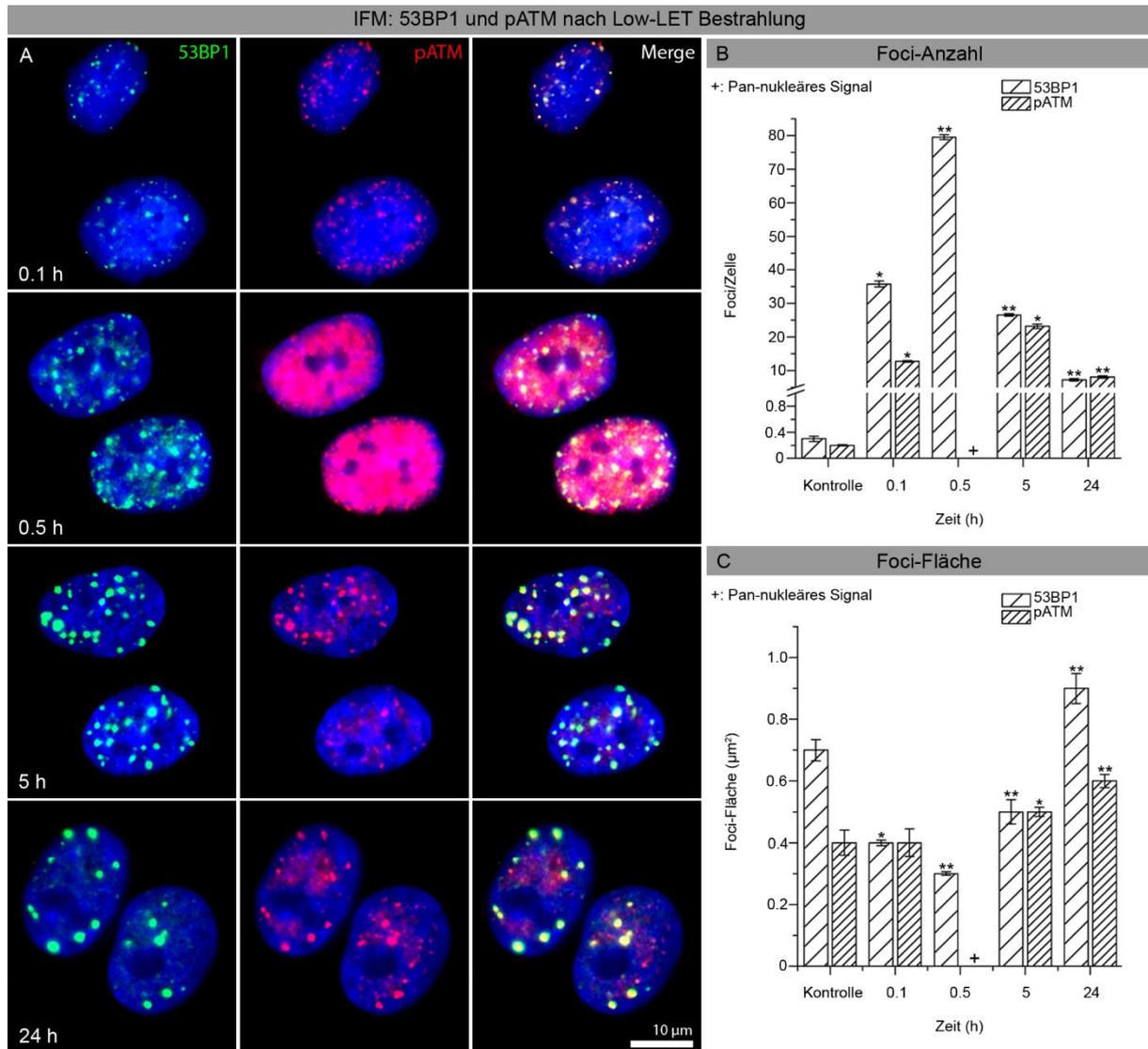
## 5. Ergebnisse

h). Bereits nach 0.1 h war eine zunehmende Foci-Anzahl und ab 0.5 h eine zunehmende Foci-Fläche erkennbar. Das  $\gamma$ H2AX-Signal wurde im unteren Bildbereich getrennt vom DAPI-Signal dargestellt. B: Quantitative Daten der Foci-Anzahl und Foci-Fläche. \*: Signifikant im Bezug zur Kontrolle und dem vorherigen Untersuchungszeitpunkt, ( $p \leq 0,05$ ). \*\*: Signifikant im Bezug zur Kontrolle, ( $p \leq 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes von drei Auswertungen dar.

Neben  $\gamma$ H2AX werden die Proteine ATM und 53BP1 mit der DNA-Schadensantwort in Verbindung gebracht. Um den Einfluss dieser Proteine im Bereich des induzierten Schadens zu charakterisieren, wurden die Proteinverteilungen in den HSF1-Zellen mittels Doppelmarkierungen untersucht.

In Abbildung 26 (A) sind repräsentative Bilder für die Markierung von 53BP1 (grün) und pATM (rot) nach 10 Gy Bestrahlung mit Photonen dargestellt. Darüber hinaus wurden die quantitativen Daten der Foci-Anzahl (B) und Foci-Fläche (C) innerhalb der Zeitkinetik erfasst. Es konnten für die beiden Proteine über die Zeit größtenteils kolokalisierende Foci beobachtet werden. Für pATM war nach 0.5 h ein pan-nukleäres Signal zu erkennen, welches eine Auszählung der Foci für diesen Zeitpunkt verhinderte. Die Auszählung der pATM Foci ergab sehr niedrige Werte für die Kontrolle ( $0,2 \pm 0,01$  Foci/Zelle) und eine steigende Foci-Anzahl bis 5 h ( $23,2 \pm 0,63$  Foci/Zelle), welche bis 24 h ( $8,1 \pm 0,32$  Foci/Zelle) wieder etwas zurückging. Die Werte der 53BP1 Foci-Auszählung zeigten für die Kontrolle ebenfalls ein sehr niedriges Foci-Level ( $0,3 \pm 0,04$  Foci/Zelle), welches sein Maximum nach 0.5 h ( $79,5 \pm 0,72$  Foci/Zelle) erreichte, wonach es bis 24 h ( $7,3 \pm 0,35$  Foci/Zelle) wieder absank. Die Foci-Flächen stiegen, sowohl für pATM als auch 53BP1 signifikant von 0.1 h ( $0,4 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$ ) für pATM und 0.5 h ( $0,3 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ ) für 53BP1 bis 24 h (pATM:  $0,6 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ , 53BP1:  $0,9 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ ) an.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 26: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von 53BP1 und pATM nach Low-LET Bestrahlung**

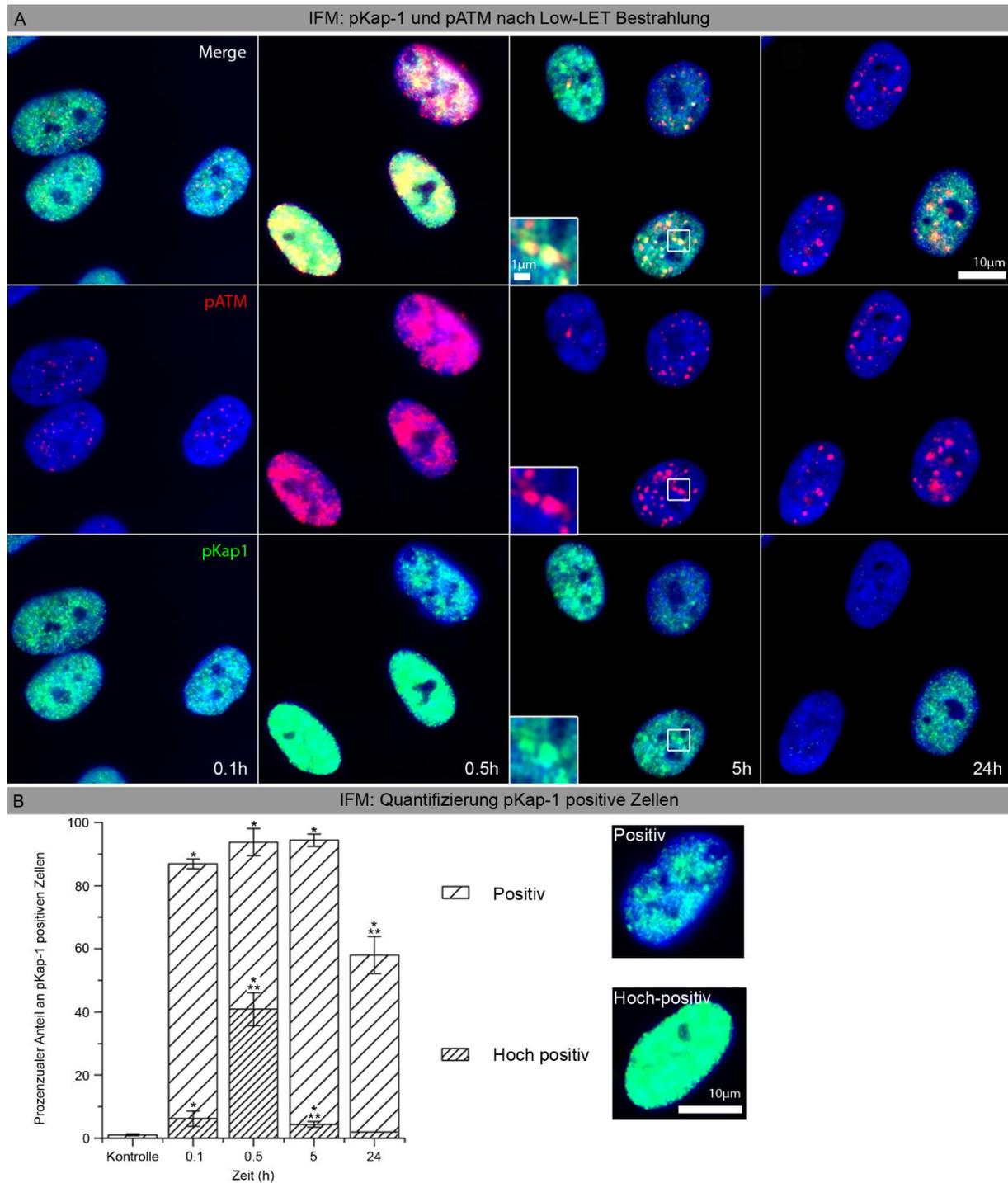
A: Doppelmarkierung von 53BP1 (grün) und pATM (rot) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) der humanen, dermalen Zellen, 0,1, 0,5, 5 und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy Photonen. Die verschiedenen Fluoreszenzen (grün und rot) sind sowohl getrennt voneinander (links und mittig) als auch überlagert (Merge, rechts) dargestellt. B: Quantitative Auswertung der 53BP1 und pATM Foci pro Zelle. \*: Signifikant im Bezug zur Kontrolle ( $p \leq 0,05$ ), \*\*: Signifikant im Bezug zur Kontrolle und dem vorherigen Untersuchungszeitpunkt ( $p \leq 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes von drei Auswertungen dar. C: Mittlere Foci-Flächen für 53BP1 und pATM. \*: Signifikant im Bezug zur Kontrolle ( $p \leq 0,05$ ), \*\*: Signifikant im Bezug zur Kontrolle und dem vorherigen Untersuchungszeitpunkt ( $p \leq 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes von drei Auswertungen dar.

Das nach 0,5 h zu beobachtende pan-nukleäre pATM Signal, welches mit dem Maximalwert der 53BP1 Foci korrelierte, sowie die kolocalisierenden Foci, deuten eine Abhängigkeit der beiden Proteine im Rahmen der DNA-Schadensantwort an.

Im weiteren Verlauf der heterochromatischen DNA-Schadensantwort wird über pATM die Dekondensation der Chromatinstruktur, mit Beteiligung von Kap-1, welches phosphoryliert wird, induziert (Fischle, 2009; Goodarzi & Jeggo, 2012; Ziv et al., 2006). Die Detektion der phosphorylierten Form von Kap-1 kann somit als Nachweis für die dekondensierte Chromatinstruktur genutzt werden.

Abbildung 27 zeigt, dass sobald in einer Zelle 0.1 h nach der Bestrahlung pATM Foci (rot) zu beobachten waren, ebenfalls ein pan-nukleäres Signal für pKap-1 (grün) detektierbar war (Abbildung 27 A). Zu diesem Zeitpunkt zeigten  $80,7\% \pm 1,53\%$  der Zellen ein pan-nukleäres Positivsignal für pKap-1 und  $6,2\% \pm 2,40\%$  ein hoch-positives Signal. Das pan-nukleäre pATM Signal, welches nach 0.5 h zu erkennen war, ging einher mit dem Positivsignal von pKap-1 ( $52,9\% \pm 4,26\%$ ), welches oftmals sogar hoch-positiv ( $40,9\% \pm 5,24\%$ ) war. Nach 5 h konnten zusätzlich zum pan-nukleären pKap-1 Signal (positiv:  $90,0\% \pm 2,00\%$ , hoch-positiv:  $4,4\% \pm 0,88\%$ ) ebenfalls pKap-1-Foci beobachtet werden, die mit den pATM-Foci kolokalisierten. Die Anzahl von pan-nukleär pKap-1 positiven Zellen ging 24 h nach Bestrahlung zurück (positiv:  $56,0\% \pm 5,86\%$ , hoch-positiv:  $2,05\% \pm 0,01\%$ ) (Abbildung 27 B). Des Weiteren waren ebenfalls noch pATM Foci zu beobachten (Abbildung 27 A).

## 5. Ergebnisse



### Abbildung 27: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von pKap-1 und pATM nach Low-LET Bestrahlung

A: Doppelmarkierung von pKap-1 (grün) und pATM (rot) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) der HSF1-Zellen, 0,1, 0,5, 5 und 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy Photonen. Die verschiedenen Fluoreszenzen (grün und rot) sind sowohl getrennt voneinander (links und mittig) als auch überlagert (Merge, rechts) dargestellt. Die transienten pan-nukleären Signale von pATM und pKap-1 korrelierten nach 0,5 h. Nach 5 h konnten kolokalisierende pKap-1 und pATM Foci beobachtet werden (Insets). B: Die quantitative Auswertung von positiven und hoch positiven Zellen zeigte eine Zunahme bis 0,5 h nach Bestrahlung. Selbst nach 24 h waren noch über die Hälfte der Zellen positiv für pKap-1. Die beiden dargestellten Zellen stehen exemplarisch für die Intensitäten nach denen zwischen positiv und hoch-positiv unterschieden wurde. Die Auswertung fand per Auge statt. \*: Signifikant im Bezug zur Kontrolle ( $p \leq 0,05$ ), \*\*: Signifikant im Bezug zur Kontrolle und dem vorherigen Untersuchungszeitpunkt ( $p \leq 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes von drei Auswertungen dar.

## 5. Ergebnisse

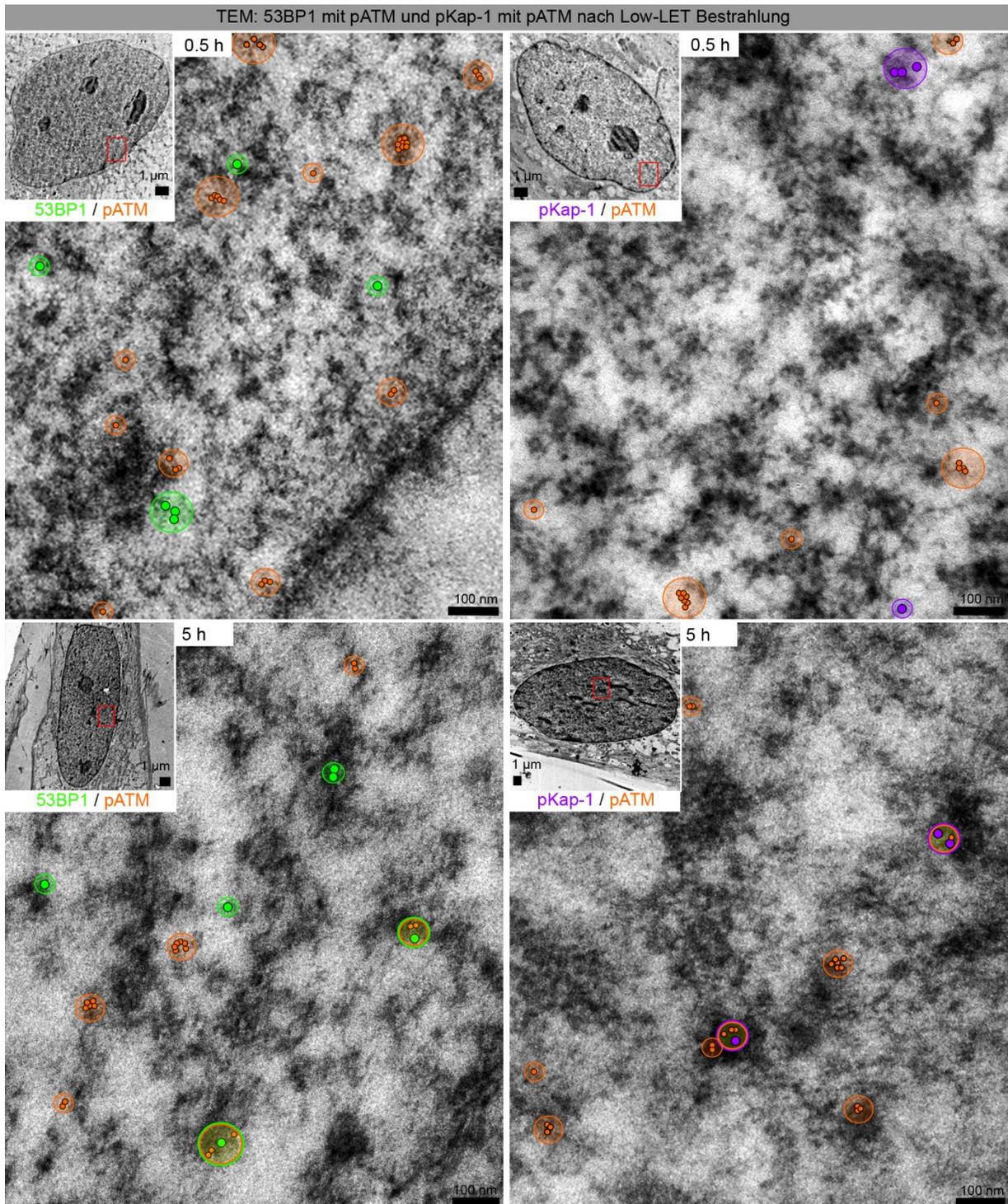
Die transient pan-nukleären Signale nach 0.5 h deuten auf eine globale Dekondensation des Chromatins hin, welche sich nach 5 h in den für beide Proteine kolokalisierenden Foci konzentriert.

Nachdem die Ergebnisse der IFM eine Beteiligung von 53BP1 und pATM sowie pKap-1 an Veränderungen im Chromatin vermuten ließen, wurden im Folgenden diese Proteine mittels der hochauflösenden TEM untersucht.

Die im Kontext der Chromatinstruktur visualisierten Proteine 53BP1 (10 nm, grün) und pATM (6 nm, orange) zeigten 0.5 h nach Bestrahlung mit 10 Gy Photonen über den gesamten Zellkern verteilte Beads und Cluster, die sowohl in euchromatischen, als auch in heterochromatischen Bereichen zu beobachten waren. Entgegen der zuvor beschriebenen lichtmikroskopischen kolokalisierenden Foci (Abbildung 26) war allerdings zu erkennen, dass die Cluster ultrastrukturell nicht kolokalisierten (Abbildung 28, links oben). Nach 5 h zeigten sich lokal auftretende 53BP1 und pATM Beads und Cluster, die oftmals in heterochromatischen Bereichen lokalisiert waren und zum Teil kolokalisierten (Abbildung 28, links unten).

Die transient pan-nukleären IFM-Signale von pATM und pKap-1, 0.5 h nach Low-LET Bestrahlung (Abbildung 27), waren elektronenmikroskopisch als über den gesamten Zellkern verteilte Beads und Cluster darstellbar, die sowohl euchromatischer als auch heterochromatischer DNA zuzuordnen waren und nicht kolokalisierten (Abbildung 28, rechts oben). Nach 5 h gab es Bereiche in denen mehrere Beads und Cluster in räumlicher Nähe zueinander lagen sowie Bereiche ohne diese. Des Weiteren konnten in diesen Regionen oftmals kolokalisierende Cluster von pKap-1 und pATM beobachtet werden, die sich dabei zumeist in heterochromatischen Domänen des Chromatins befanden (Abbildung 28, rechts unten).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 28: Ultrastrukturelle Darstellung der Proteinverteilung von pATM mit 53BP1 und mit pKap-1 nach Low-LET Bestrahlung**

Während die Proteine 53BP1 (10 nm, grün), pATM (6 nm, orange) und pKap-1 (6 nm, lila) nach 0.5 h im EC und HC, im gesamten Zellkern, in nicht kolokalisierenden Beads und Clustern verteilt vorkamen, ließen sich nach 5 h vermehrt konzentrierte, heterochromatische, oftmals kolokalisierende Cluster beobachten. Die roten Kästen in den Zellkernübersichten (je oben links) markieren den vergrößerten Bildbereich.

Zusammenfassend konnte nach Low-LET Bestrahlung eine Akkumulation der Reparaturfaktoren  $\gamma$ H2AX, 53BP1 und pATM sowie pKap-1 festgestellt werden. Dabei scheinen sich die Proteine, ausgehend von einer globalen Verteilung im gesamten

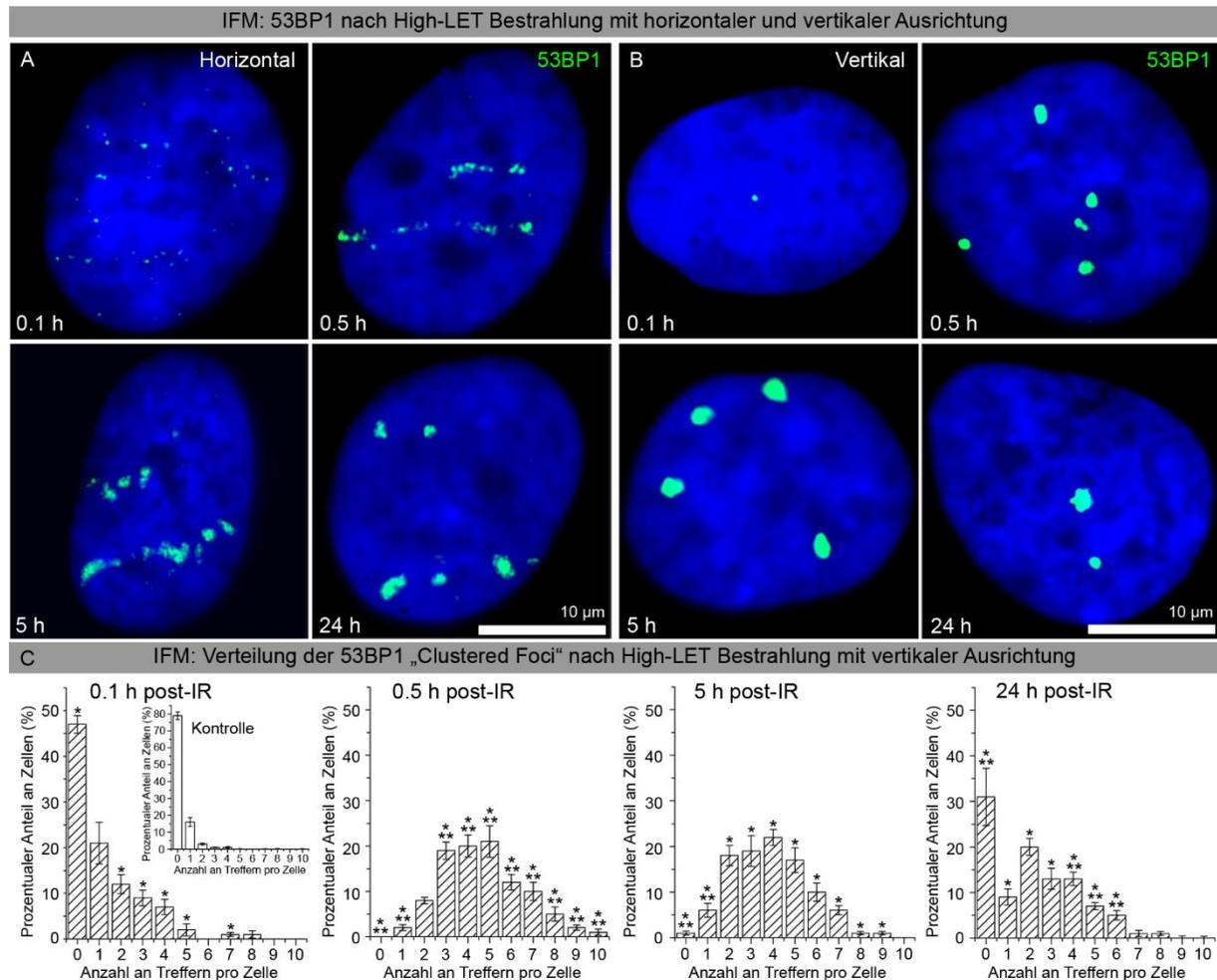
Zellkern (0.1 h oder 0, 5 h), ab 5 h nach der Bestrahlung in heterochromatischen Bereichen des Chromatins zu positionieren.

### 5.3.2 Die Reparaturfaktoren der DNA-Schadensantwort vermitteln nach High-LET Bestrahlung die Ausbildung der DCRs

Um festzustellen, ob die gleichen Proteine, die nach Low-LET Bestrahlung die DNA-Schadensantwort und somit die Dekondensation des Chromatins vermitteln, auch nach High-LET Bestrahlung an der massiven Chromatinstrukturierung (DCRs) beteiligt sind, wurden 53BP1, pATM sowie pKap-1 nach verschiedenen Reparaturzeitpunkten (0.1, 0.5, 5 und 24 h) untersucht.

Schon 0.1 h nach High-LET Bestrahlung konnten erste, kleine 53BP1 Foci sowohl für die horizontale (Abbildung 29, links) als auch für die vertikale (Abbildung 29, rechts) Ausrichtung der Zellen mittels IFM beobachtet werden, die sich nach 0.5 h zu einem deutlich sichtbarem „Track“ (horizontal) bzw. „Clustered Foci“ (vertikal) ausbildeten. Die Fläche der „Clustered Foci“ nahm mit der Zeit bis 5 h nach der Bestrahlung zu. Selbst nach 24 h waren noch einige größere „Clustered Foci“ erkennbar, was auf einen verbliebenen DNA-Schaden hindeuten könnte. Die mit  $5 \times 10^6$  Partikeln pro  $\text{cm}^2$  berechnete Fluenz (führt im Mittel zu fünf Treffern pro Zellkern, siehe auch Kapitel 5.2, Abbildung 20 und 22) konnte hier erneut nachvollzogen werden. Die berechnete Anzahl an Treffern korrelierte größtenteils mit der Anzahl an sichtbaren „Clustered Foci“ 0.5 h bzw. 5 h nach High-LET Bestrahlung mit vertikaler Ausrichtung (Abbildung 29 C).

## 5. Ergebnisse



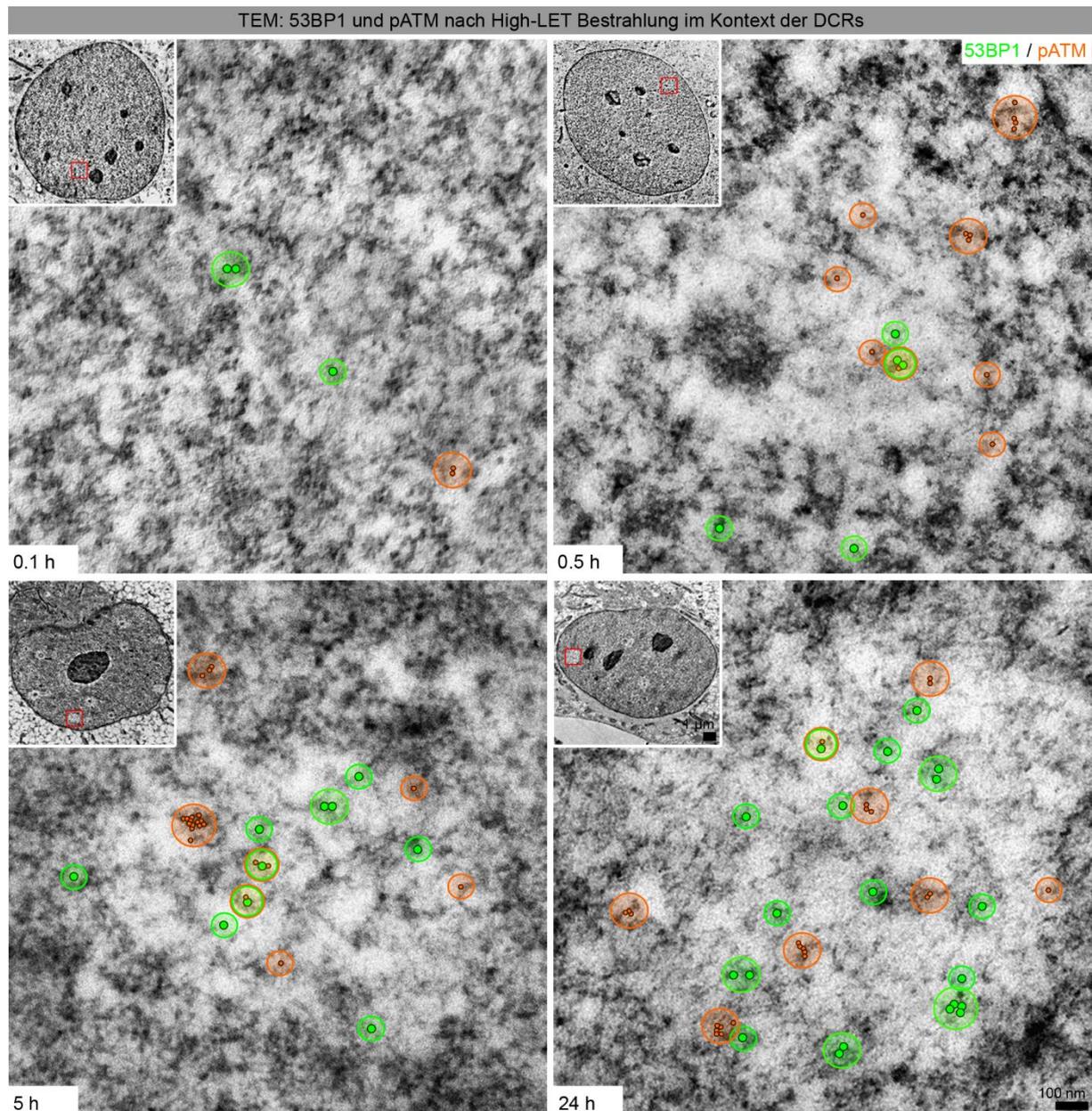
**Abbildung 29: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von 53BP1 nach High-LET Bestrahlung mit unterschiedlichen Ausrichtungen**

A: Markierung von 53BP1 (grün) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) von HSF1-Zellen, 0.1, 0.5, 5 und 24 h nach High-LET Bestrahlung mit Carbonionen in horizontaler Ausrichtung. Der Weg des Ions war anhand des 53BP1 Signals, nach 0.5 h, als auch 5 h in Form eines „Tracks“ zu erkennen. Selbst 24 h nach der Bestrahlung war noch immer ein 53BP1 Signal vorhanden. B: Repräsentative Bilder der 53BP1-Markierung (grün) von HSF1-Zellen 0.1, 0.5, 5 und 24 h nach vertikaler Bestrahlung mit Carbonionen in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau). Nach 0.5 h waren deutlich sichtbare „Clustered Foci“, die mit der Fluenz  $5 \times 10^6$  Partikeln pro  $\text{cm}^2$  übereinstimmen, zu erkennen. Diese nahmen bis 5 h in ihrer Größe zu und waren selbst nach 24 h noch nachweisbar. C: Mittelwerte der prozentualen Verteilung von 53BP1 „Clustered Foci“ 0.1, 0.5, 5 und 24 h nach High-LET Bestrahlung in vertikaler Ausrichtung, im Vergleich zur Kontrolle (Inset). \*: Signifikant im Bezug zur Kontrolle ( $p \leq 0,05$ ), \*\*: Signifikant im Bezug zur Kontrolle und dem vorherigen Untersuchungszeitpunkt ( $p \leq 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes von fünf Auswertungen dar.

Über die Visualisierung von 53BP1 (10 nm, grün) mit pATM (6 nm, orange) mittels TEM konnten nach 0.1 h vereinzelt 53BP1 und pATM Beads oder kleinere Cluster, ohne sichtbare DCRs, detektiert werden (Abbildung 30, oben links). Nach 0.5 h zeigten sich vermehrt 53BP1 und pATM Cluster innerhalb und am Randbereich der sich ausbildenden DCRs, welche zum Teil kolokalisierten (Abbildung 30, oben rechts). Darüber hinaus traten nach 5 h zusätzlich größere heterochromatische pATM Cluster innerhalb der DCRs auf (Abbildung 30, unten links). 24 h nach der High-LET Bestrahlung konnten immer noch zahlreiche 53BP1 Beads und Cluster im Bereich der

## 5. Ergebnisse

DCRs nachgewiesen werden, wohingegen die pATM Cluster in ihrer Anzahl und Größe augenscheinlich (qualitativ) abnahmen (Abbildung 30, unten rechts).

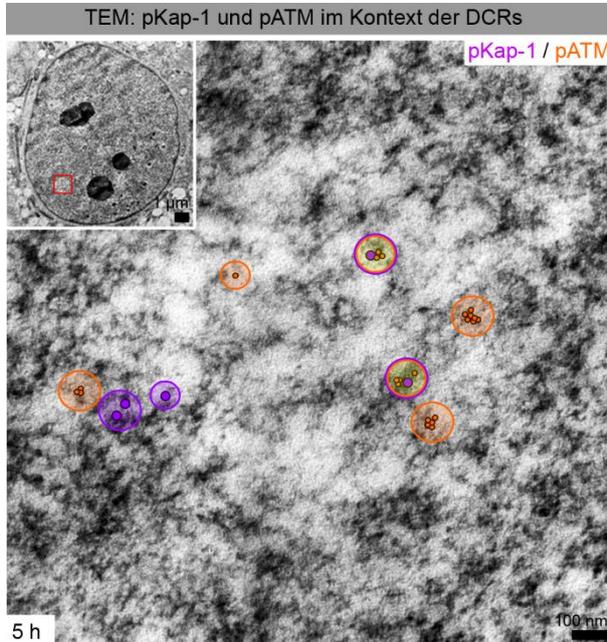


**Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Visualisierung von 53BP1 und pATM nach High-LET Bestrahlung im Kontext der DCRs**

Doppelmarkierung von 53BP1 (grün) und pATM (orange) im Kontext der DCRs, 0,1, 0,5, 5 und 24 h nach High-LET Bestrahlung mit Carbonionen in vertikaler Ausrichtung. Die Cluster-Anzahl und –Größe nahm sowohl für 53BP1 als auch pATM bis 5 h zu. Während die pATM Cluster innerhalb von 24 h wieder kleiner wurden, blieben die Cluster-Anzahl und –Größe für 53BP1 konstant. Zum Teil kolokalisierten 53BP1 und pATM. Die Beads und Cluster traten sowohl in euchromatischen als auch heterochromatischen Bereichen der DCRs auf, wobei zu späteren Reparaturzeitpunkten die Beads und Cluster eher in HC zugeordneten Domänen vorlagen. Die roten Kästen in den Zellkernübersichten (je oben links) markieren den vergrößerten Bildbereich.

## 5. Ergebnisse

Die Abbildung 31 zeigt die Detektion der phosphorylierten Formen von Kap-1 (10 nm, lila) und pATM (6 nm, orange). 5 h nach High-LET Bestrahlung wird pKap-1 durch Beads und Cluster in heterochromatischen Randbereichen der DCRs visualisiert. Die Beads und Cluster kolokalisierten zum Teil mit pATM (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Visualisierung pKap-1, pATM, 53BP1 und pKu70 im Kontext der DCRs**

Doppelmarkierung von pKap-1 (10 nm, lila) mit pATM (6 nm, orange) im Kontext der DCRs, 5 h nach High-LET Bestrahlung mit Carbonionen in vertikaler Ausrichtung. Die Beads und Cluster verteilen sich in und um die DCRs und kolokalisierten zum Teil. Der rote Kasten in der Zellkernübersicht (oben links) markiert den vergrößerten Bildbereich.

Zusammenfassend kann durch den Nachweis einer Akkumulation von 53BP1, pATM und pKap-1, vorwiegend in den heterochromatischen DCR-Bereichen, eine Beteiligung dieser Proteine an der Ausbildung der DCRs vermutet werden.

#### 5.4 Die Chromatinöffnung steht in Verbindung mit der Reparatur

Nachdem die Akkumulation der Proteine der Signaltransduktionskaskade der DNA-Schadenantwort herausgestellt werden konnte, stellt sich die Frage, wie sich die DNA-Schäden (DSBs) in Abhängigkeit von der genutzten Strahlenqualität darstellen. Dabei war die Reparaturkapazität in Abhängigkeit von der Strahlenqualität von besonderem Interesse.

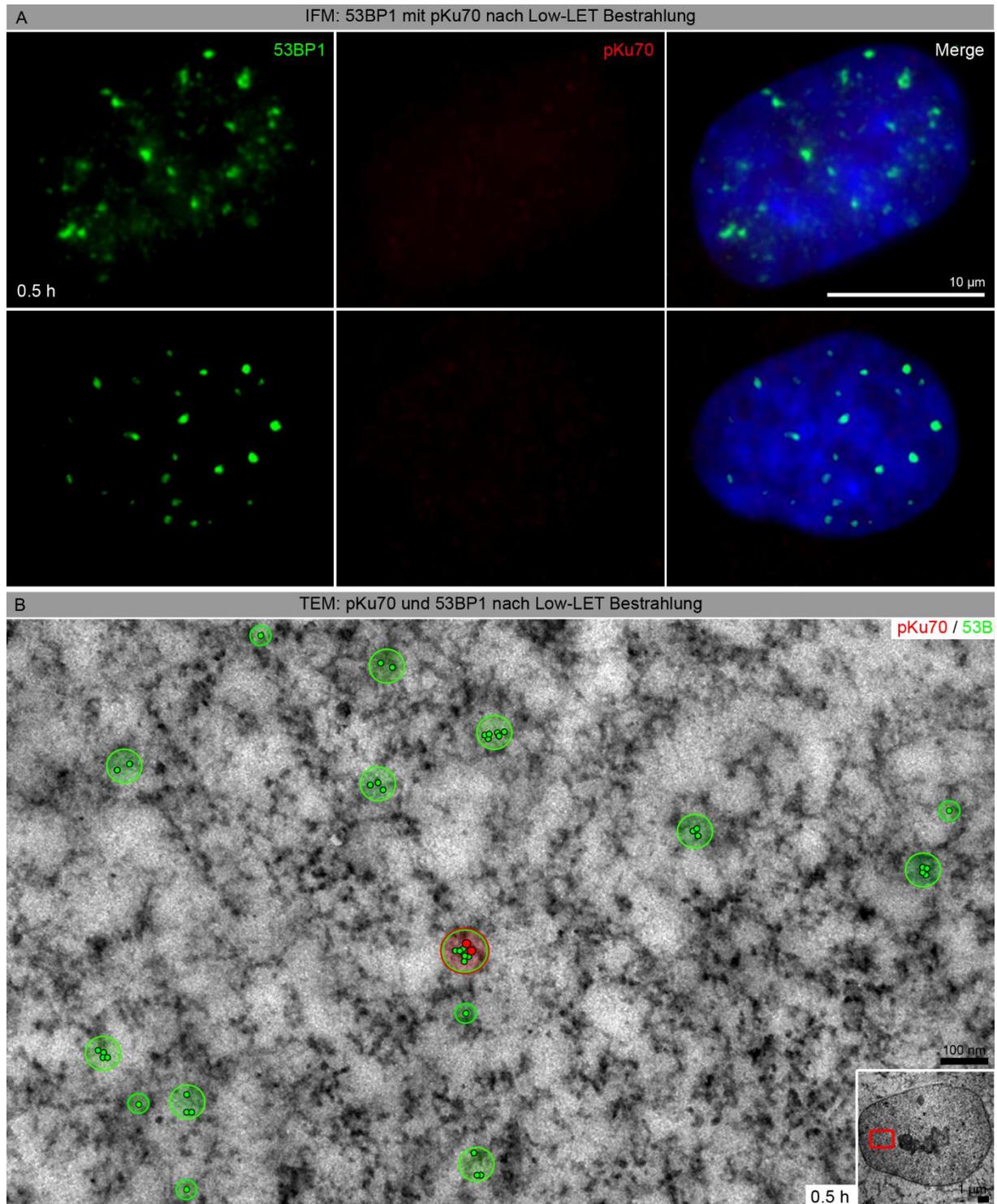
##### 5.4.1 Die Proteine pKu70, pKu80 und pDNA-PKcs als Marker für DSBs

Im Rahmen des NHEJ lagert sich das Heterodimer, bestehend aus Ku70 und Ku80, direkt an die Enden eines DSB an. Dabei wird angenommen, dass an den freien DNA-Bruchenden je ein Ku70 und Ku80 Protein bindet (Lieber, 2010). Durch die anschließende Bindung von DNA-PKcs an das Heterodimer, erfolgt die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der Proteine. Um den DSB direkt zu detektieren, wurden die aktiven, also phosphorylierten Formen, von Ku70 und Ku80 sowie DNA-PKcs markiert. Dafür wurden je ein Primärantikörper gegen eine am Serin 6 phosphorylierte Form von Ku70 (pKu70), eine am Threonin 715 phosphorylierte Form von Ku80 (pKu80) und eine am Threonin 2609 phosphorylierte Form von DNA-PKcs (pDNA-PKcs) verwendet.

Nach Low-LET Bestrahlung mit 10 Gy Photonen konnte mittels IFM für pKu70 (rot), im Gegensatz zu 53BP1 (grün), kein Signal beobachtet werden (Abbildung 32 A, Positivkontrolle siehe Abbildung 36 A). Nach keinem der untersuchten Reparaturzeitpunkte (0.1, 0.5, 5 und 24 h) wurden für pKu70 Foci detektiert.

Mithilfe der hochauflösenden TEM, war es hingegen möglich pKu70 im Kontext des Chromatins zu visualisieren. Die Doppelmarkierung von pKu70 (10 nm, rot) und 53BP1 (6 nm grün) 0.5 h nach Low-LET Bestrahlung zeigte, dass pKu70, neben einigen Einzelbeads, in Dimeren (visualisiert durch zwei Goldbeads) zu beobachten war. Waren diese pKu70 Beads (Einzel- und Doppelbeads) im HC lokalisiert, konnte eine Kolokalisation mit 53BP1, welches über den gesamten Zellkern verteilt zu beobachten war, festgestellt werden (Abbildung 32 B).

## 5. Ergebnisse



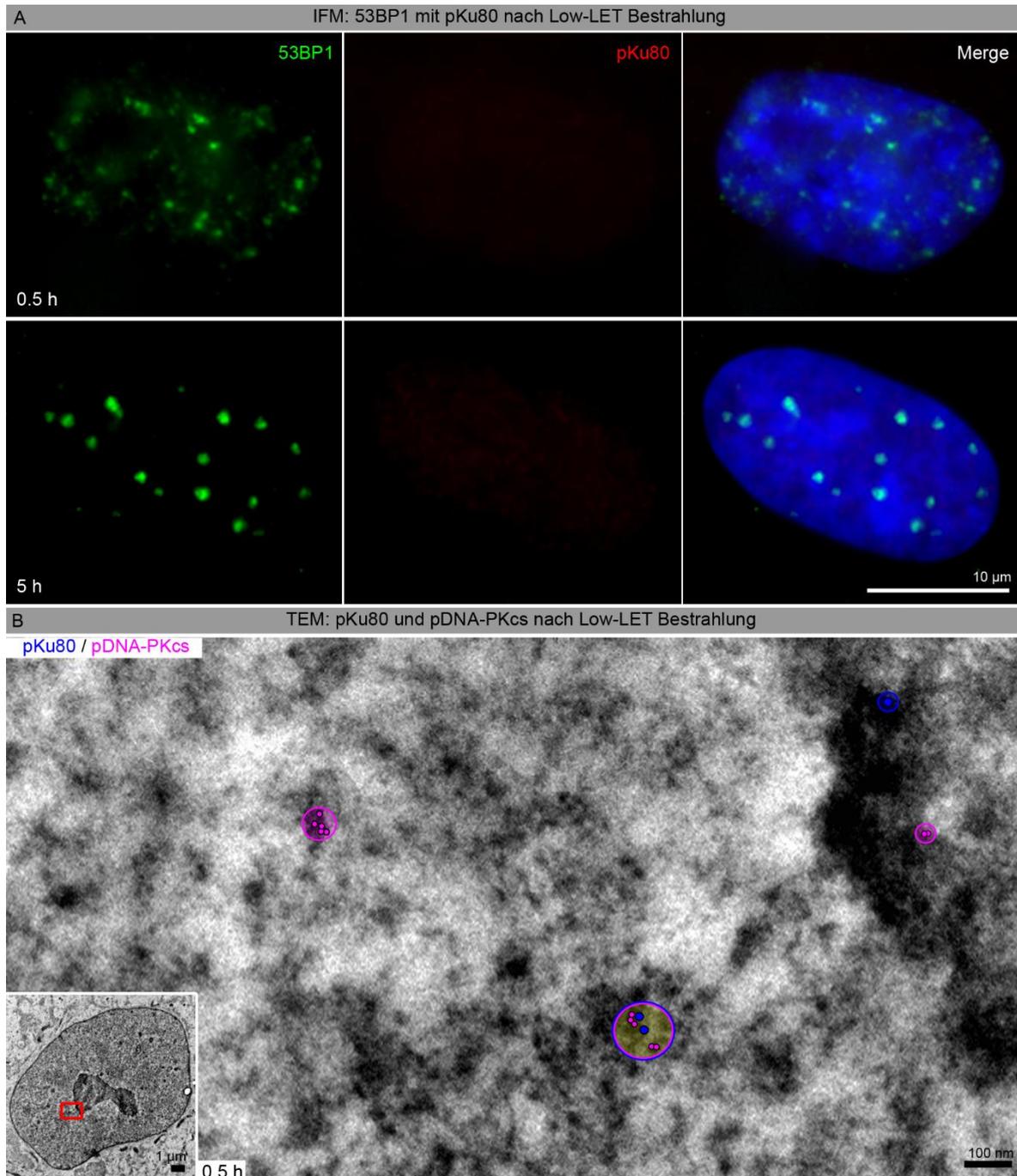
**Abbildung 32: Immunfluoreszenzmikroskopische sowie elektronenmikroskopische Visualisierung von 53BP1 mit pKu70 nach Low-LET Bestrahlung**

A: Repräsentative Bilder der Doppelmarkierung von 53BP1 (grün) und pKu70 (rot) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) von HSF1-Zellen, 0,5 und 5 h nach Bestrahlung mit 10 Gy Photonen. Die verschiedenen Fluoreszenzen (grün und rot) sind sowohl getrennt voneinander (links und mittig) als auch überlagert (Merge, rechts) dargestellt. Während die 53BP1 Foci gut zu erkennen waren, ließ sich für pKu70 kein Signal detektieren. B: Die Doppelmarkierung von pKu70 (10nm, rot) und 53BP1 (6 nm, grün) 0,5 h nach Low-LET Bestrahlung mit Photonen zeigte für 53BP1 vorwiegend im HC lokalisierte Beads und Cluster, die über den gesamten Zellkern verteilt vorlagen. Die in heterochromatischen Arealen lokalisierten pKu70 Einzelbeads oder Doppelbeads kolokalisierten mit 53BP1. Der rote Kasten in der Zellkernübersicht (unten rechts) markiert den vergrößerten Bildbereich.

## 5. Ergebnisse

Wie für pKu70 konnte ebenfalls für pKu80 (rot) kein Signal mittels IFM detektiert werden (Abbildung 33 A, Positivkontrolle siehe Abbildung 34 A und 36 A).

Mittels TEM konnten für pKu80 annähernd die gleichen Verteilungsmuster, wie für pKu70 festgestellt werden. 0.5 h nach Low-LET Bestrahlung traten oftmals pKu80 Dimere (10 nm, blau) und einige Einzelbeads auf. Die Doppelmarkierung zeigte zum Teil Kolokalisationen mit pDNA-PKcs (6 nm, magenta), welche in euchromatischen sowie heterochromatischen Bereichen nachgewiesen wurden (Abbildung 33 B).



**Abbildung 33: Immunfluoreszenzmikroskopische und elektronenmikroskopische Visualisierung von 53BP1 mit pKu80 sowie pDNA-PKcs nach Low-LET Bestrahlung**

A: Repräsentative Bilder der Doppelmarkierung von 53BP1 (grün) und pKu80 (rot) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) von HSF1-Zellen, 0,5 und 5 h nach Bestrahlung mit 10 Gy Photonen. Während die

## 5. Ergebnisse

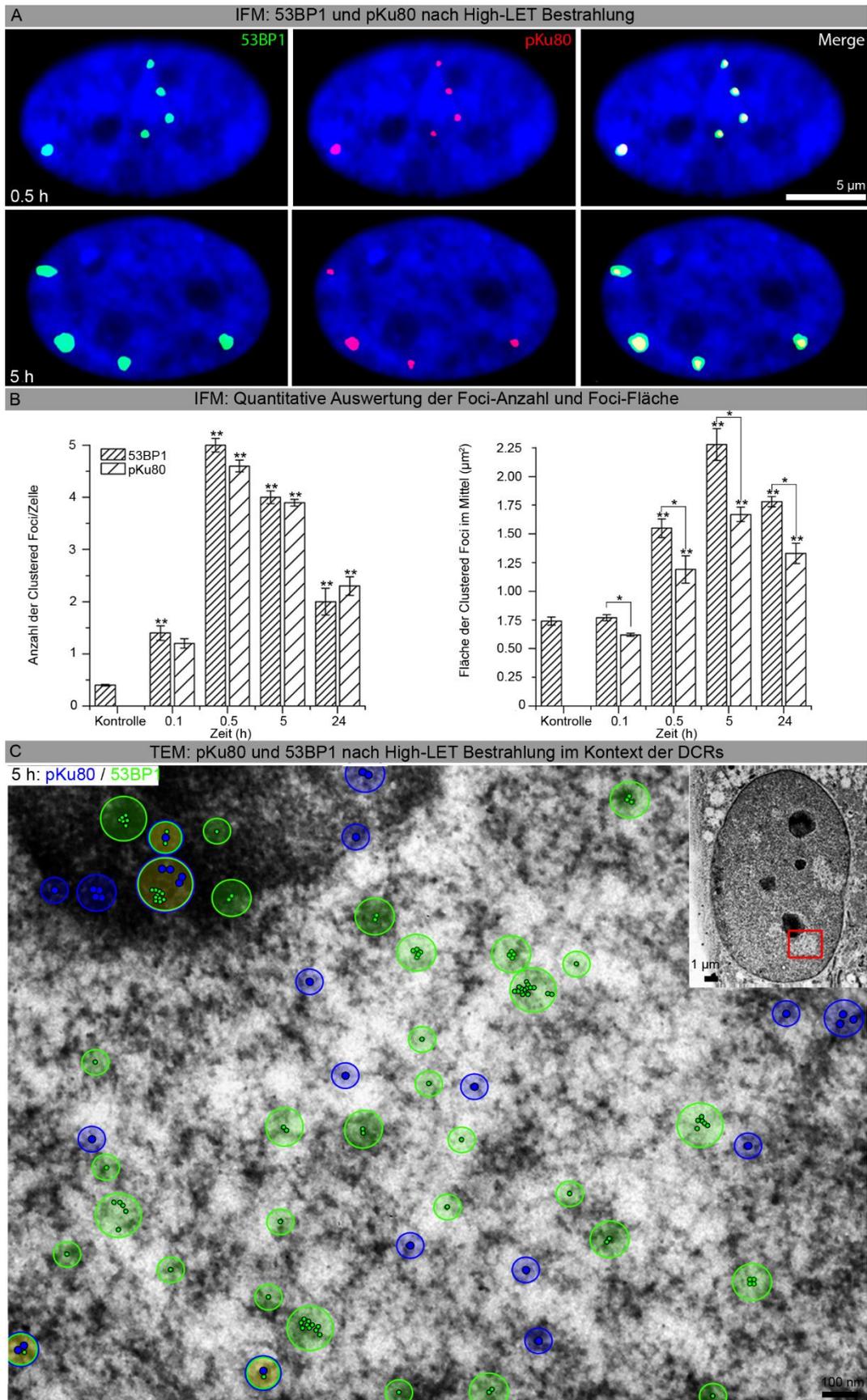
53BP1 Foci gut zu erkennen waren, ließ sich für pKu80 kein Signal detektieren. Die verschiedenen Fluoreszenzen (grün und rot) sind sowohl getrennt voneinander (links und mittig) als auch überlagert (Merge, rechts) dargestellt. B: Die Doppelmarkierung von pKu80 (10 nm, blau) und pDNA-PKcs (6 nm, magenta) zeigte 0.5 h nach Low-LET Bestrahlung mit 10 Gy Photonen vermehrt Dimere sowie einige Einzelbeads für pKu80, die oftmals mit pDNA-PKcs kolokalisierten. Des Weiteren kamen pDNA-PKcs Beads und Cluster in räumlicher Nähe zu den pKu80 Beads und Clustern vor. Der rote Kasten in der Zellkernübersicht (unten links) markiert den vergrößerten Bildbereich.

Die mittels IFM nicht zu detektierenden Signale für pKu70 und pKu80 weisen darauf hin, dass diese Proteine nur in geringer Anzahl am DSB binden. Mittels TEM konnte festgestellt werden, dass es sich dabei um alleinständige Dimere (zwei Goldbeads ohne Kolokalisation) handelte, die im gesamten Zellkern verteilt waren und isolierte DSBs darstellen könnten. Beide Proteine (pKu70 und pKu80) waren dabei mit einer ähnlichen Verteilung vorhanden. Dies weist darauf hin, dass sie in ungefähr gleicher Anzahl am Bruch auftraten. Die zum Teil nicht kolocalisierenden Cluster von pDNA-PKcs, die im Umfeld von pKu80 Dimeren zu beobachten waren, deuten auf weitere Funktionen, neben der direkten DSB Reparatur hin.

Im Gegensatz zur Low-LET Bestrahlung konnte nach High-LET Bestrahlung (vertikal) mittels IFM für pKu80 ein Signal detektiert werden. Für pKu80 konnten „*Clustered Foci*“, welche mit denen von 53BP1 kolokalisierten, beobachtet werden (Abbildung 34 A). Die pKu80-Foci traten in geringerer Anzahl auf und waren signifikant kleiner als die 53BP1 „*Clustered Foci*“. Wie in Abbildung 34 B dargestellt, konnte die höchste Anzahl an „*Clustered Foci*“ sowohl für 53BP1 ( $5,0 \pm 0,13$  Foci/Zelle), als auch pKu80 ( $4,6 \pm 0,11$  Foci/Zelle) 0.5 h nach der High-LET Bestrahlung beobachtet werden. Diese Werte nahmen bis 5 h (53BP1:  $4,0 \pm 0,12$  Foci/Zelle, pKu80:  $3,9 \pm 0,06$  Foci/Zelle) nach der Bestrahlung nur geringfügig ab. Erst nach 24 h sanken die Werte (53BP1:  $2,0 \pm 0,26$  Foci/Zelle, pKu80:  $2,3 \pm 0,18$  Foci/Zelle) auf ein immer noch signifikant erhöhtes Niveau im Vergleich zur Kontrolle (53BP1:  $0,4 \pm 0,02$  Foci/Zelle). Die Foci-Fläche nahm sowohl für 53BP1 als auch für pKu80 bis 5 h (53BP1:  $2,3 \pm 0,14 \mu\text{m}^2$ , pKu80:  $2,1 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$ ) zu und gingen erst 24 h (53BP1:  $1,8 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$ , pKu80:  $1,3 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$ ) nach High-LET Bestrahlung zurück. Dabei waren die 53BP1 „*Clustered Foci*“ signifikant größer, als die für pKu80.

Die ultrastrukturelle Darstellung mittels TEM in Abbildung 34 C zeigt, dass innerhalb der DCRs pKu80 (10 nm, blau) und 53BP1 (6 nm, grün) in unterschiedlich großen Clustern auftraten. Es konnten zahlreiche pKu80 und 53BP1 Beads und Cluster, die zum Teil auch kolokalisierten, beobachtet werden (Abbildung 34 C).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 34: Immunfluoreszenzmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchung von 53BP1 und pKu80 nach High-LET Bestrahlung in vertikaler Ausrichtung**

A: Doppelmarkierung von 53BP1 (grün) und pKu80 (rot) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) von HSF1-Zellen, 0,5 und 5 h nach High-LET Bestrahlung mit Carbonionen in vertikaler Ausrichtung. Die verschiedenen Fluoreszenzen (grün und rot) sind sowohl getrennt voneinander (links und mittig) als

## 5. Ergebnisse

auch überlagert (Merge, rechts) dargestellt. Es waren kolokalisierende „*Clustered Foci*“ zu beobachten. B: Quantitative Auswertung der Foci-Anzahl und Foci-Fläche für 53BP1 und pKu80. Die Foci-Anzahl und Foci-Flächen stiegen sowohl für 53BP1 als auch pKu80 bis 0.5 h bzw. 5 h an, wobei für 53BP1 höhere Werte beobachtet werden konnten, als für pKu80. \*: Signifikant im Bezug zum anderen Protein des gleichen Zeitpunkts ( $p \leq 0.05$ ), \*\*: Signifikant im Bezug zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt ( $p \leq 0.05$ ). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes von drei Auswertungen dar. C: Doppelmarkierungen von pKu80 (10 nm, blau) mit 53BP1 (6 nm, grün) 5 h nach High-LET Bestrahlung mit Kohlenstoffionen in horizontaler Ausrichtung der HSF1-Zellen im Kontext der DCRs. Sowohl 53BP1 als auch pKu80 konnten in den DCR-Bereichen beobachtet werden. Dabei kolokalisierten die Beads und Cluster zum Teil. Der rote Kasten in der Zellkernübersicht (oben rechts) markiert den vergrößerten Bildbereich.

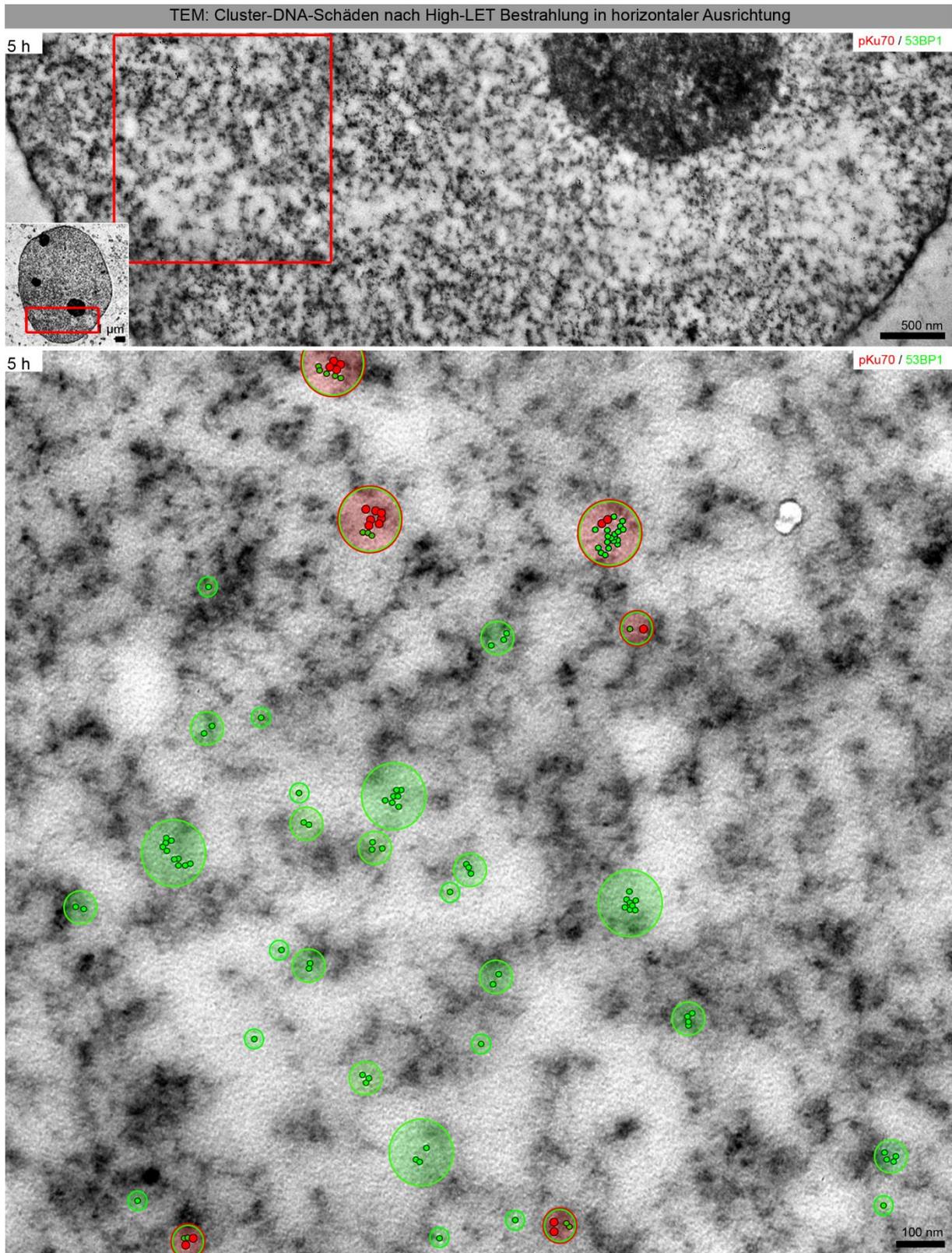
Die beschriebene Proteinverteilung von pKu80 konnte durch die Doppelmarkierung von pKu70 (10 nm, rot) und 53BP1 (6 nm, grün) ebenfalls mittels TEM nach High-LET Bestrahlung in vertikaler Ausrichtung nachvollzogen werden. Größere pKu70 Cluster, die mit 53BP1 kolokalisierten, konnten 5 h nach High-LET Bestrahlung im „*Track*“-Bereich beobachtet werden (Abbildung 35).

Da für pKu80 nach High-LET Bestrahlung, im Gegensatz zur Low-LET Bestrahlung, ein Signal in der IFM zu beobachten war und eine ähnliche Verteilung der beiden Proteine mittels TEM nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob ebenfalls für pKu70 ein IFM-Signal detektierbar ist.

Die in Abbildung 36 A mittels IFM analysierte Doppelmarkierung für pKu70 (grün) und pKu80 (rot) zeigte, dass schon 0.1 h nach High-LET Bestrahlung kleine, kolokalisierende „*Clustered Foci*“ zu beobachten waren. Nach 5 h nahmen die Anzahl sowie die Fläche der „*Clustered Foci*“ zu. Die TEM-basierte Betrachtung dieser Doppelmarkierung (pKu70 (10 nm, rot) und pKu80 (6 nm, blau)) zeigte überwiegend kolokalisierende Cluster in den Bereichen der DCRs. Diese bestanden oftmals aus dem mehrfachen von zwei Beads pro Protein (Abbildung 36 B).

Somit liefert die Akkumulation der beiden Proteine in DCR-Bereichen eine mögliche Erklärung für die nachweisbaren „*Clustered Foci*“ in der IFM.

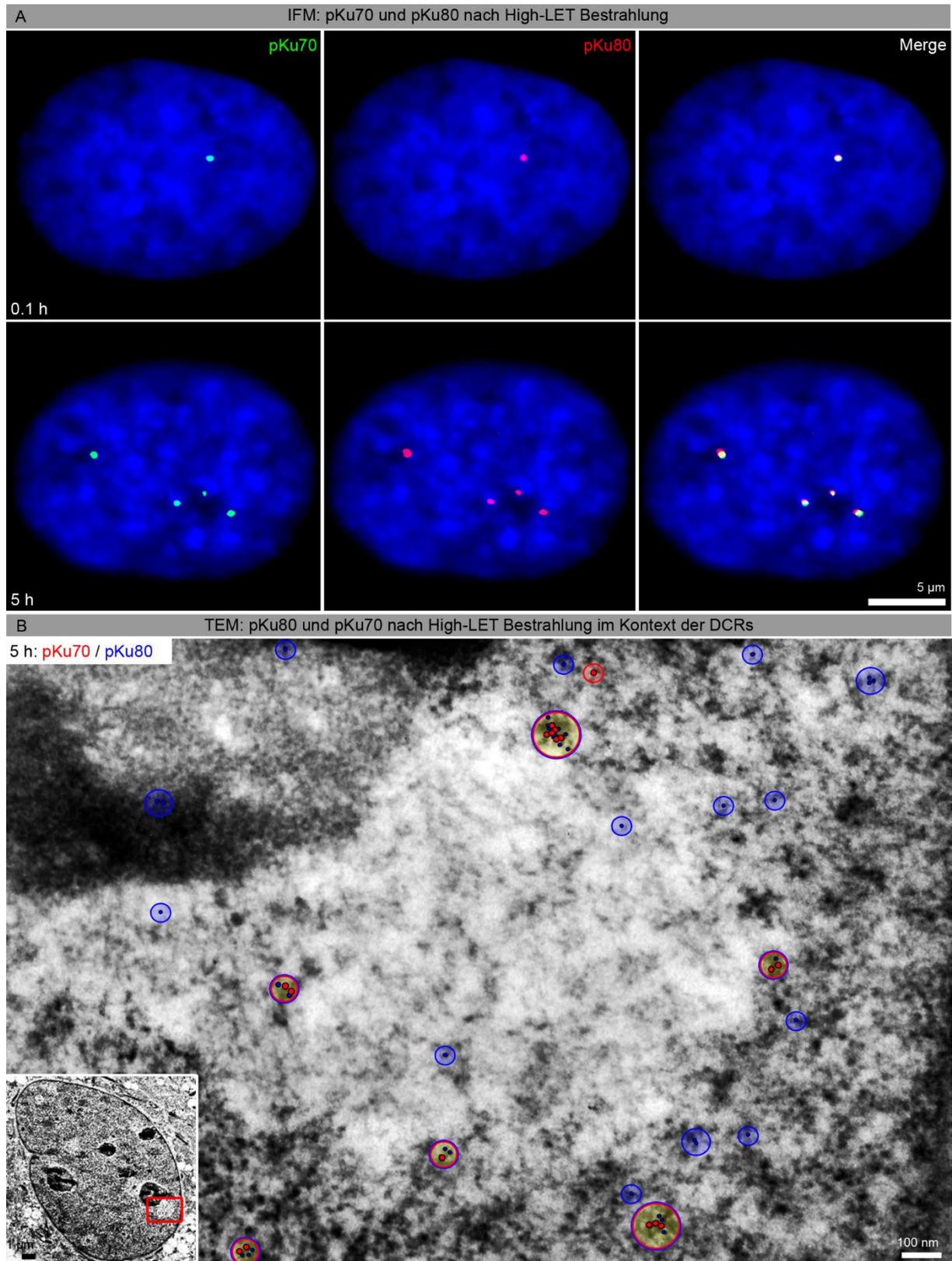
## 5. Ergebnisse



**Abbildung 35: Cluster-DNA-Schäden nach High-LET Bestrahlung in horizontaler Ausrichtung**

Doppelmarkierung von pKu70 (10nm, rot) und 53BP1 (6 nm, grün) 5 h nach High-LET Bestrahlung mit Calciumionen in vertikaler Ausrichtung. Die 53BP1 Beads und Cluster waren in euchromatischen sowie heterochromatischen Bereichen des „Tracks“ lokalisiert, wohingegen pKu70 in den heterochromatischen Randbereichen des „Tracks“ kolokalisierend mit 53BP1 auftrat. Die roten Kästen markieren den jeweils vergrößerten Bildbereich.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 36: Immunfluoreszenzmikroskopische und elektronenmikroskopische Visualisierung von pKu70 und pKu80 nach High-LET Bestrahlung**

A: Die Doppelmarkierung von pKu70 (grün) und pKu80 (rot) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) von HSF1-Zellen, 0.1 und 5 h nach High-LET Bestrahlung mit Carbonanionen in vertikaler Ausrichtung zeigt sehr kleine, kolokalisierende „Clustered Foci“. Die verschiedenen Fluoreszenzen (grün und rot) sind sowohl getrennt voneinander (links und mittig) als auch überlagert (Merge, rechts) dargestellt. B: Die Doppelmarkierungen von pKu70 (10 nm, rot) mit pKu80 (6 nm, blau) 5 h nach High-LET Bestrahlung mit Kohlenstoffanionen in vertikaler Ausrichtung der HSF1-Zellen im Bereich der DCRs. Die beiden

## 5. Ergebnisse

Proteine konnten in überwiegend kolokalisierenden Clustern in Bereichen der DCRs beobachtet werden. Der rote Kasten in der Zellkernübersicht (unten links) markiert den vergrößerten Bildbereich.

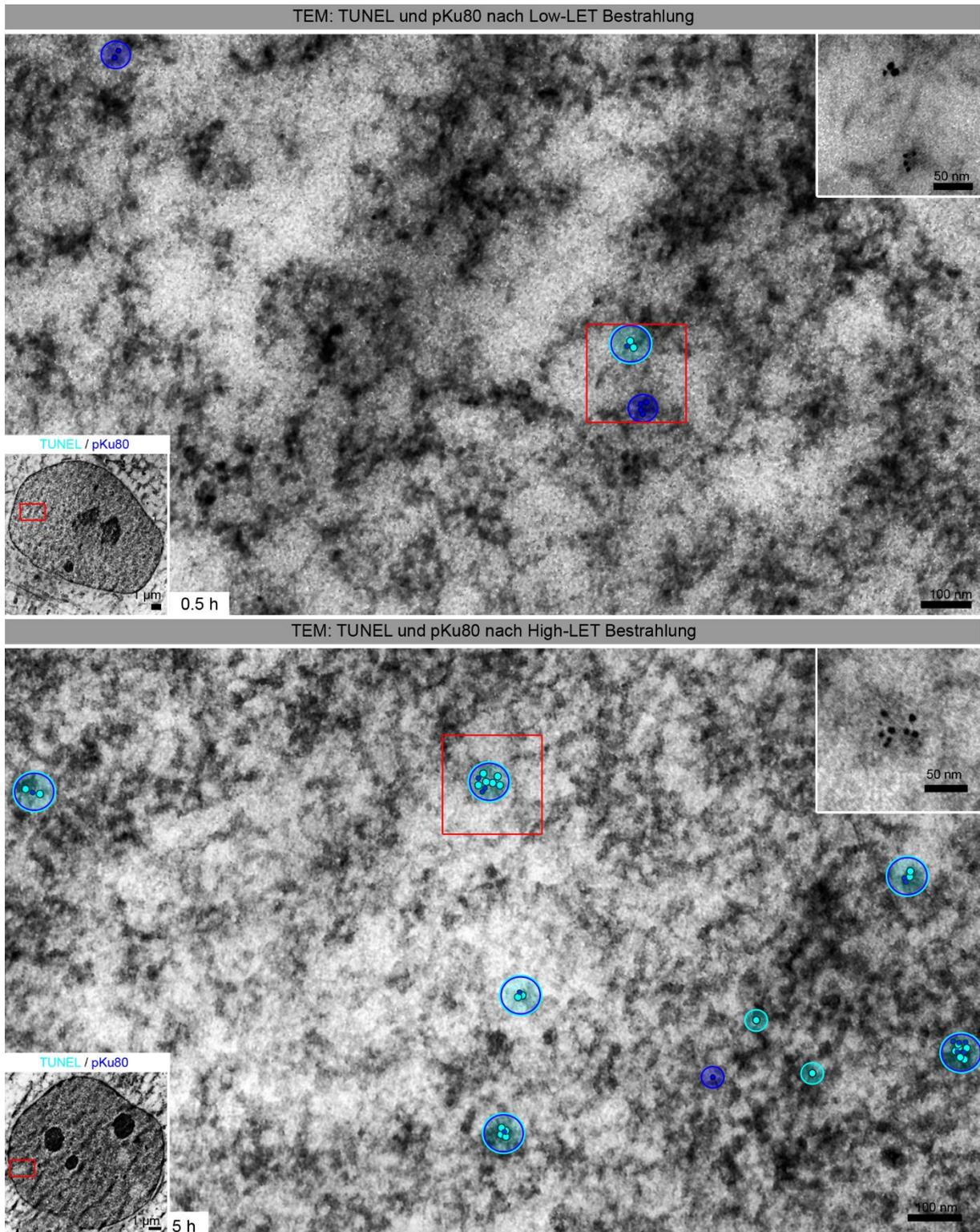
### 5.4.2 TUNEL

Um nachweisen zu können, dass die mittels pKu80 markierten DSBs reale, physikalische Brüche repräsentieren, wurde eine Visualisierung über die TUNEL-Methode in der TEM realisiert. Die TUNEL-Methode ermöglicht es, fragmentierte DNA, genauer die 3`OH-Bruchenden (durch Proteinverdau freigelegt), nachzuweisen. Da sowohl die Visualisierung der 3`OH-Bruchenden als auch des Reparaturproteins pKu80 im gleichen Zellkernanschnitt erfolgen sollte, musste die Denaturierung zeitlich so gewählt werden, dass neben den freigelegten 3`OH-Bruchenden ebenfalls noch Proteine (pKu80) vorhanden waren. Für die Visualisierung wurden, abhängig von der Strahlenqualität, die Reparaturzeitpunkte gewählt (Low-LET: 0.5 h und High-LET: 5 h), bei denen die stärksten Chromatinveränderungen festgestellt werden konnten.

Die Doppelmarkierung der physikalischen Brüche (TUNEL, 10 nm, türkis) und pKu80 (6 nm, blau) 0.5 h nach Low-LET Bestrahlung zeigte größtenteils kolokalisierende Beads und Cluster (Abbildung 37, oben). Nach High-LET Bestrahlung zeigten sich ebenfalls Kolokalisationen von TUNEL und pKu80 (Abbildung 37, unten). Im direkten Vergleich waren nach High-LET Bestrahlung mehr sowie größere Cluster zu erkennen als nach Low-LET Bestrahlung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die über TUNEL markierten 3`OH-Bruchenden mit den, über pKu80 markierten DSBs, größtenteils übereinstimmten, da weitestgehend Kolokalisationen zu beobachten waren.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 37: Elektronenmikroskopische Visualisierung von TUNEL mit pKu80 nach Low- und High-LET Bestrahlung**

Doppelmarkierung von TUNEL (10 nm, türkis) und pKu80 (6 nm, blau) 0.5 h nach Low-LET Bestrahlung und 5 h nach High-LET Bestrahlung (Carbonionen, vertikale Ausrichtung). Nach Low-LET Bestrahlung traten vereinzelt Kolokalisationen von pKu80 und TUNEL auf. Nach High-LET Bestrahlung waren vermehrt kolokalisierende Cluster in den heterochromatischen Bereichen der DCRs zu beobachten. Die roten Kästen in den Zellkernübersichten (jeweils unten links) und den Detailbildern (mittig) markieren den jeweils vergrößerten Bildbereich. Die Insets (jeweils oben rechts) zeigen ein exemplarisches Cluster (ohne farbige Markierung) nach Low-LET Bestrahlung (oben) und High-LET Bestrahlung (unten).

Werden alle Ergebnisse zusammenfassend betrachtet, kann festgehalten werden, dass pKu70 und pKu80 als Marker für DSBs genutzt werden können. Dadurch ist es möglich die unterschiedlichen biologischen Auswirkungen nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten im Chromatinkontext zu visualisieren.

### 5.4.3 Quantitativer Vergleich nach Low-LET und High-LET Bestrahlung mittels TEM

Um die vorherigen Beobachtungen quantitativ zu unterstützen, wurden Auszählungen verschiedener Proteine nach Low-LET und High-LET Bestrahlung vergleichend gegenübergestellt.

Die Quantifizierungen der Doppelmarkierungen von pKu70 (10 nm, rot) mit 53BP1 (6 nm, grün) sowie pKu80 (10 nm, blau) mit pDNA-PKcs (6 nm, magenta) wurden wie in Kapitel 4.2.5.5 beschrieben durchgeführt. Aufgeführt sind die Mittelwerte für das Gesamtchromatin, das EC und das HC nach verschiedenen Reparaturzeitpunkten. Des Weiteren wurden die Cluster-Anzahl und -Größen näher betrachtet. Dafür wurden die ausgezählten Beads sowie Cluster anhand ihrer Größe (Beads pro Cluster) verschiedenen Größenkategorien zugeordnet. Dabei entsprach jede Kategorie einer bestimmten Anzahl an Beads.

Für die mittlere Anzahl an 53BP1 Beads nach Low-LET Bestrahlung konnte ein signifikanter Anstieg bis 0.5 h ( $161,36 \pm 6,76$  Beads), gefolgt von einer signifikanten Abnahme der Bead-Anzahl bis 24 h ( $70,20 \pm 5,85$  Beads), festgestellt werden. Im Gegensatz zu den euchromatischen Domänen, die eine sofortige Abnahme der 53BP1 Bead-Anzahl zeigten, stiegen die Werte im HC bis 5 h ( $116,72 \pm 5,33$  Beads) signifikant an und erreichten erst nach 24 h annähernd Kontrollniveau ( $51,48 \pm 3,46$  Beads).

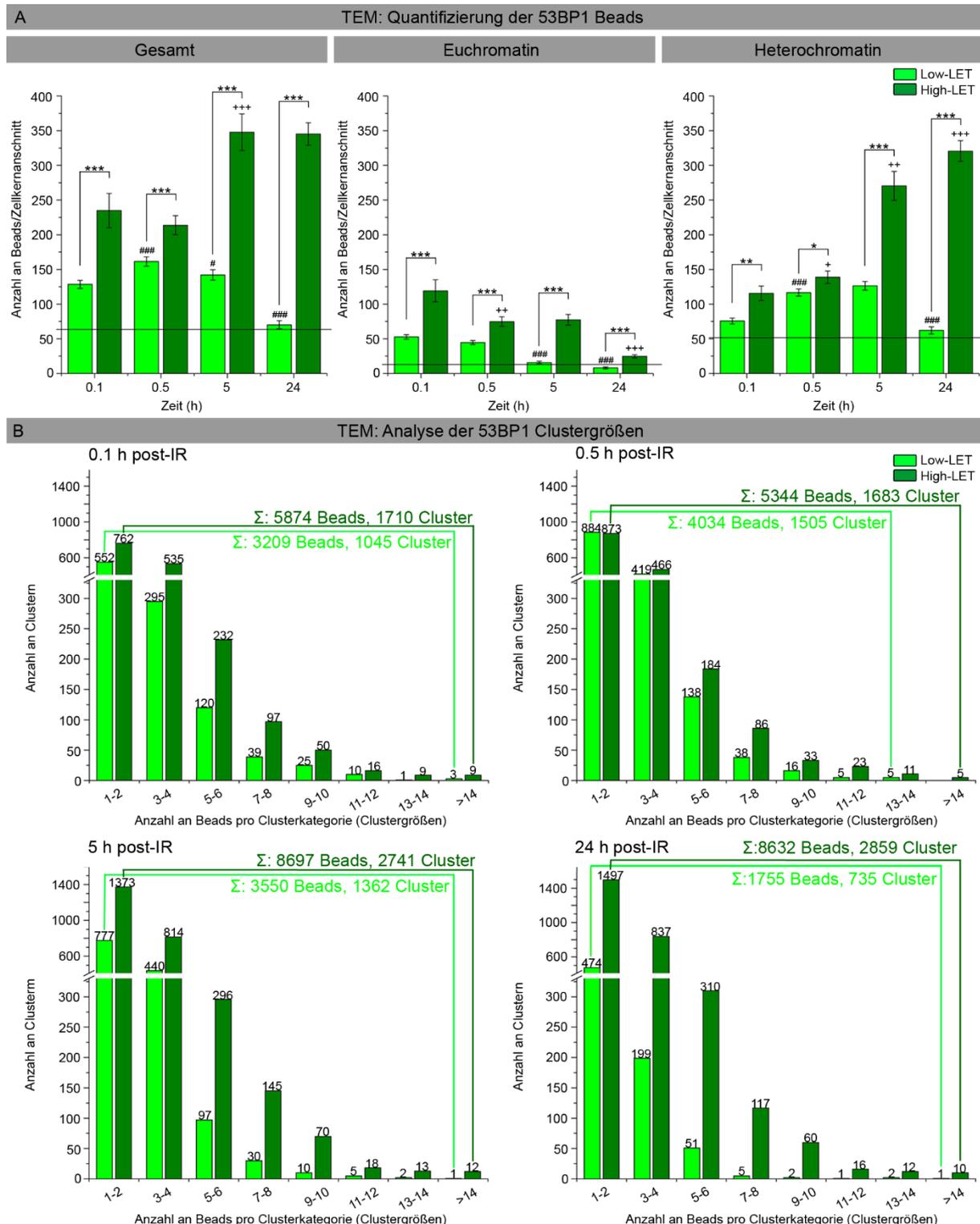
Die Anzahl der 53BP1 Beads nach High-LET Bestrahlung wiesen einen signifikanten Anstieg bis 5 h ( $347,88 \pm 26,38$  Beads) auf, der bis 24 h ( $345,28 \pm 16,14$  Beads) konstant blieb. In Abhängigkeit von der Chromatinstruktur zeigte sich, dass die fallenden Werte im EC den steigenden Werten im HC bis 24 h gegenüberstehen.

Im direkten Vergleich konnte nach Low-LET Bestrahlung eine stetige Abnahme der 53BP1 Beads festgestellt werden, während diese nach High-LET Bestrahlung präferentiell im HC mit fortlaufender Reparaturzeit zunahm (Abbildung 38 A).

Die Anzahl der 53BP1 Cluster nach Low-LET Bestrahlung nahm bis 0.5 h (Summe ( $\Sigma$ ): 1505 Cluster) zu, wobei die meisten größeren Cluster nach 5 h zu beobachten waren (Abbildung 38 B). Nach High-LET Bestrahlung hingegen stieg die Cluster-Anzahl bis

## 5. Ergebnisse

24 h ( $\Sigma$ : 2859 Cluster) an und die meisten größeren Cluster konnten erst nach 5 h festgestellt werden. Der Wert blieb sogar bis 24 h erhöht (Abbildung 38 B).



**Abbildung 38: Quantitativer Vergleich von 53BP1 nach Low- und High-LET Bestrahlung**

A: Quantitativer Vergleich der Mittelwerte der 53BP1 Beads nach Low- und High-LET (Calcium) Bestrahlung unterteilt in Gesamtchromatin, EC und HC in den HSF1-Zellen für die verschiedenen Zeitpunkte (0,1, 0,5, 5 und 24 h). Die Werte der Kontrolle wurden abgezogen. Als Referenz für das Grundlevel an 53BP1 Beads (ausgezählter Wert der 53BP1 Beads in der Kontrolle) wurde eine Kontrolllinie eingefügt. \*: Signifikant ( $p$  liegt zwischen  $>0,01 - 0,05$ ). \*\*: Hoch signifikant ( $p$  liegt zwischen  $>0,001 - 0,01$ ). \*\*\*: Höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ). #: Signifikant zum vorherigen Low-LET Zeitpunkt ( $p$

## 5. Ergebnisse

liegt zwischen  $> 0,01 - 0,05$ ), ##: Hoch signifikant zum vorherigen Low-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,001 - 0,01$ ), ###: Höchst signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p \leq 0,001$ ), +: Signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,01 - 0,05$ ), ++: Hoch signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,001 - 0,01$ ), +++: Höchst signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p \leq 0,001$ ). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte der 25 ausgezählten Zellkernanschnitte. B: Darstellung der Anzahl an Clustern (Summen der Werte aus 25 Zellkernanschnitten) für die verschiedenen Zeitpunkte (0.1, 0.5, 5 und 24 h) nach Bestrahlung, unterteilt in verschiedene Clustergrößenkategorien für die Low-LET und High-LET Bestrahlung. Die farbigen Klammern zeigen die jeweilige Bandbreite der Clustergrößen und sind mit den dazugehörigen Summen für die Gesamtbeadzahl und Clusteranzahl beschriftet. Die Zahlen über den Balken stellen die Summen der Cluster aus der jeweiligen Kategorie dar.

Um festzustellen, inwieweit die Reparaturkapazität sowie das DNA-Schadensmuster aufgrund der induzierten DSBs beeinflusst wurden, wurden im Folgenden die quantitativen Daten von pKu70 als Marker für DSBs näher betrachtet.

Nach Low-LET Bestrahlung nahm die mittlere Anzahl von strahleninduzierten pKu70 Beads bis 0.5 h ( $49,02 \pm 3,52$  Beads) signifikant zu, bevor der Wert signifikant bis 24 h ( $23,32 \pm 1,52$  Beads) zurückging. Dieser Verlauf konnte sowohl für das EC, als auch das HC beobachtet werden, wobei in heterochromatischen Bereichen im Mittel mehr Beads auftraten. Im Vergleich zur Low-LET Bestrahlung wurde für die mittlere Anzahl der pKu70 Beads im Gesamtchromatin nach High-LET Bestrahlung eine signifikante Zunahme bis 5 h ( $58,40 \pm 3,79$  Beads) beobachtet. Während im EC die Werte rückläufig waren, stiegen diese im HC bis 5 h ( $51,00 \pm 3,39$  Beads) an und waren nach 24 h ( $41,92 \pm 1,86$  Beads) noch immer signifikant erhöht, im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen ( $8,24 \pm 0,64$  Beads).

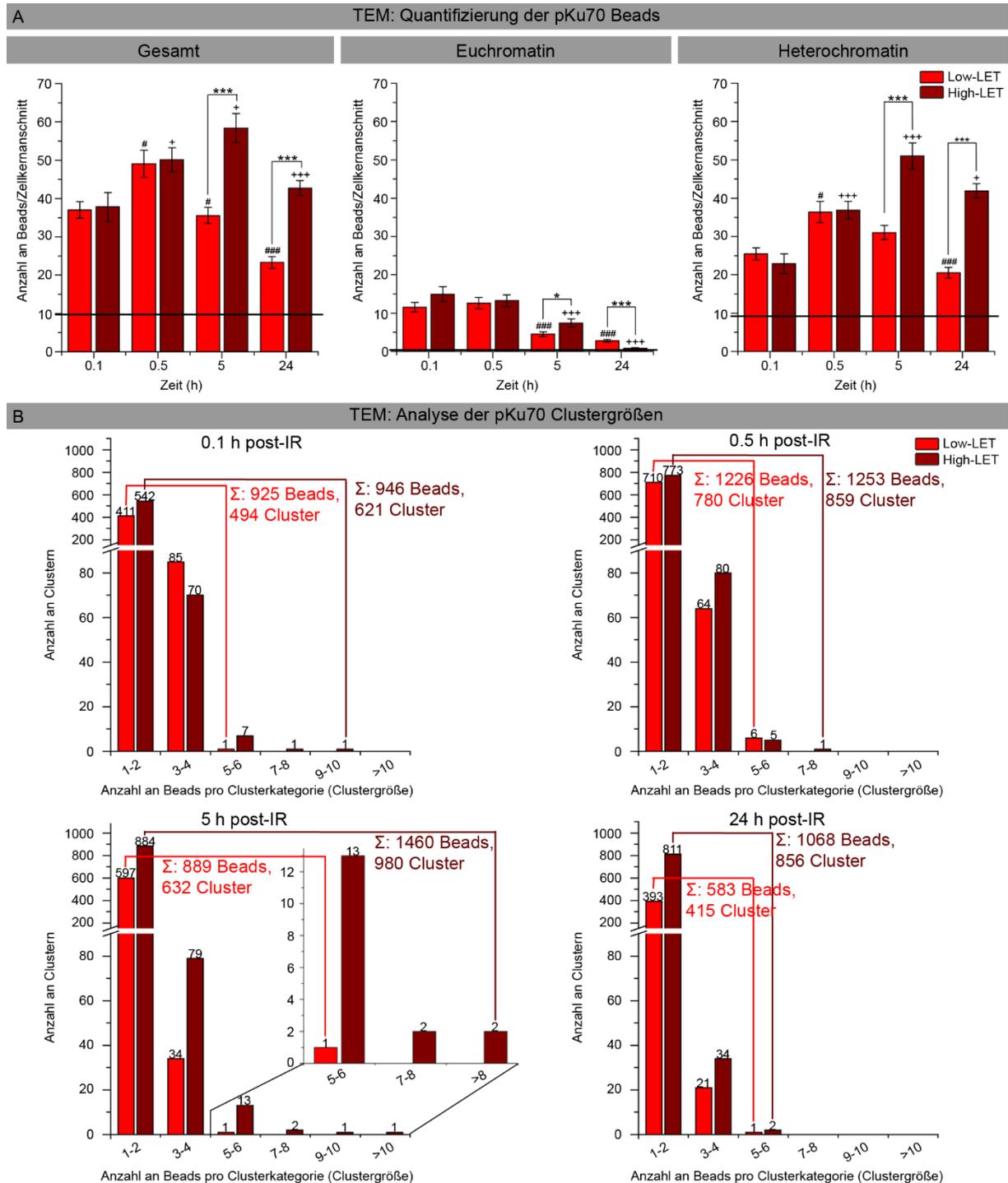
Der direkte Vergleich der beiden Strahlenqualitäten konnte nach Low-LET Bestrahlung eine Abnahme der pKu70 Beads nach 0.5 h aufzeigen, wohingegen die Werte nach High-LET Bestrahlung zu späten Reparaturzeitpunkten (5 und 24 h) im HC signifikant erhöht blieben (Abbildung 39 A).

Sowohl die Anzahl der Cluster, als auch die Größe der Cluster nahmen im zeitlichen Verlauf nach Low-LET Bestrahlung bis 0.5 h ( $\Sigma$ : 780 Cluster) zu, wohingegen diese nach High-LET Bestrahlung bis 5 h ( $\Sigma$ : 980 Cluster) zunahmen und im Allgemeinen größer waren (Abbildung 39 B).

Zusammenfassend zeigte sich nach Low-LET Bestrahlung eine schnellere Abnahme der pKu70-Werte. Während die euchromatischen Schäden recht schnell repariert wurden, zeigten die Schäden im HC eine etwas verzögerte Kinetik. Nach High-LET Bestrahlung war, im Vergleich zur Low-LET Bestrahlung, eine deutlich sichtbare, zeitlich verzögerte Akkumulation der pKu70 Beads zu beobachten. Während auch hier die euchromatischen Schäden bis 24 h nach Bestrahlung repariert wurden, zeigte sich

## 5. Ergebnisse

im HC ein sehr viel höheres Schadenslevel (pKu70-Beads), welches länger verblieb. Des Weiteren traten nach High-LET Bestrahlung sehr viel größere Cluster auf als nach Low-LET Bestrahlung, welche komplexere Schäden repräsentieren könnten.



**Abbildung 39: Quantitativer Vergleich von pKu70 nach Low- und High-LET Bestrahlung**

A: Quantitativer Vergleich der Mittelwerte der pKu70 Beads nach Low- und High-LET (Calcium) Bestrahlung unterteilt in Gesamtchromatin, EC und HC in den HSF1-Zellen für die verschiedenen Zeitpunkte (0.1, 0.5, 5 und 24 h). Die Werte der Kontrolle wurden abgezogen. Als Referenz für das Grundlevel an pKu70 Beads (ausgezählter Wert der pKu70 Beads in der Kontrolle) wurde eine Kontrolllinie eingefügt. \*: Signifikant ( $p$  liegt zwischen  $> 0,01 - 0,05$ ). \*\*: Hoch signifikant ( $p$  liegt zwischen  $> 0,001 - 0,01$ ). \*\*\*: Höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ). #: Signifikant zum vorherigen Low-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,01 - 0,05$ ), ##: Hoch signifikant zum vorherigen Low-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen

## 5. Ergebnisse

> 0,001 – 0,01), ####: Höchst signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p \leq 0,001$ ), +: Signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen > 0,01 – 0,05), \*\*: Hoch signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen > 0,001 – 0,01), \*\*\*: Höchst signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p \leq 0,001$ ). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte der 25 ausgezählten Zellkernanschnitte. B: Darstellung der Anzahl an Clustern (Summen der Werte aus 25 Zellkernanschnitten) für die verschiedenen Zeitpunkte (0,1, 0,5, 5 und 24 h) nach Bestrahlung, unterteilt in verschiedene Clustergrößenkategorien für die Low-LET und High-LET Bestrahlung. Die farbigen Klammern zeigen die jeweilige Bandbreite der Clustergrößen und sind mit den dazugehörigen Summen für die Gesamtbeadzahl und Clusteranzahl beschriftet. Die Zahlen über den Balken stellen die Summen der Cluster aus der jeweiligen Kategorie dar. Das Inset bei dem 5 h Wert zeigt eine detaillierte Darstellung der größeren Clusterkategorien.

Für pKu80 als weiteren Marker von DSBs konnte nach Low-LET Bestrahlung, unabhängig vom Chromatinstatus, ebenfalls eine Abnahme der Werte beobachtet werden (Abbildung 40 A). Die größten sowie meisten Cluster ließen sich erneut nach 0,5 h ( $\Sigma$ : 867 Cluster) feststellen (Abbildung 40 B).

Werden die Gesamtbeadzahlen für pKu70 und pKu80 (Tabelle 6) des jeweils selben Zeitpunktes nach Low-LET Bestrahlung miteinander verglichen, fällt auf, dass sich die Werte nur geringfügig unterscheiden. Dies bestätigt, dass beide Proteine annähernd im selben Verhältnis am Bruch auftraten und somit beide Proteine als Marker für DSBs genutzt werden können.

**Tabelle 7: Gesamtbeadzahlen der Quantifizierung von pKu70 und pKu80 nach Low-LET Bestrahlung**

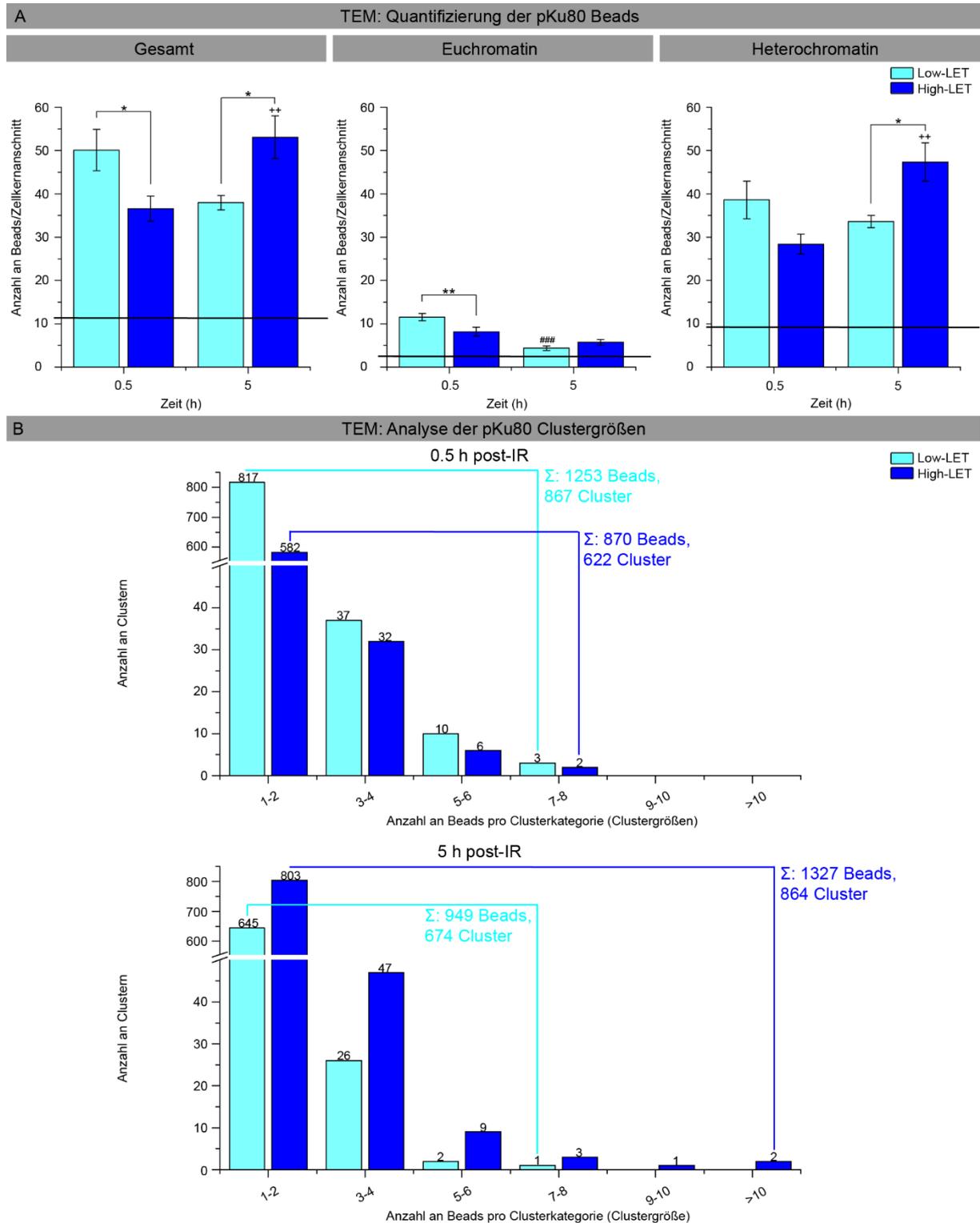
| Gesamtbeads (Summe) in 25 Zellkernanschnitten | Gesamtchromatin |       | Euchromatin |       | Heterochromatin |       |
|---|-----------------|-------|-------------|-------|-----------------|-------|
|   | pKu70           | pKu80 | pKu70       | pKu80 | pKu70           | pKu80 |
| <b>Kontrolle</b>                              | 244             | 284   | 38          | 58    | 206             | 226   |
| <b>0,5 h</b>                                  | 1226            | 1253  | 316         | 288   | 910             | 965   |
| <b>5 h</b>                                    | 989             | 949   | 113         | 109   | 776             | 840   |

Die Mittelwerte der ausgezählten pKu80 Beads nach High-LET Bestrahlung bestätigen ebenfalls die pKu70 Daten. Tendenziell konnten wieder signifikant höhere Werte im HC 5 h ( $53,08 \pm 4,92$  Beads) nach High-LET Bestrahlung, im Vergleich zur Low-LET Bestrahlung (HC, 5 h:  $33,6 \pm 1,39$  Beads) festgestellt werden (Abbildung 40 A). Des Weiteren konnten erneut die größten sowie meisten Cluster nach 5 h ( $\Sigma$ : 865 Cluster) beobachtet werden (Abbildung 40 B). Die quantitativen Daten, die eine höhere Anzahl sowie größere Cluster vornehmlich in heterochromatischen Bereichen zeigten, unterstützen die Annahme der verzögerten Reparatur nach High-LET Bestrahlung durch komplexere DSBs.

Werden die Daten der beiden High-LET Strahlenqualitäten miteinander verglichen, zeigten sich zwar dieselben Tendenzen, doch konnten Unterschiede bei der Anzahl der Beads beobachtet werden. Unter Berücksichtigung des LETs scheint es allerdings plausibel, dass die Werte für pKu80 (Carbonionen:  $\sim 190$  keV/ $\mu\text{m}$ ) etwas niedriger

## 5. Ergebnisse

ausfielen, als die für pKu70 (Calciumionen:  $\sim 1800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ). Je höher der LET eines Teilchens war, desto mehr Ionisationen fanden pro Wegstrecke statt und ließen sich mittels Markierung von pKu70 oder pKu80 visualisieren.



**Abbildung 40: Quantitativer Vergleich von pKu80 nach Low- und High-LET Bestrahlung**

A: Quantitativer Vergleich der Mittelwerte der pKu80 Beads nach Low- und High-LET (Carbon) Bestrahlung unterteilt in Gesamtchromatin, EC und HC in den HSF1-Zellen für die verschiedenen Zeitpunkte (0.5 und 5 h). Die Werte der Kontrolle wurden abgezogen. Als Referenz für das Grundlevel an pKu80 Beads (ausgezählter Wert der pKu80 Beads in der Kontrolle) wurde eine Kontrolllinie eingefügt. \*: Signifikant ( $p$  liegt zwischen  $> 0,01 - 0,05$ ). \*\*: Hoch signifikant ( $p$  liegt zwischen  $> 0,001 -$

## 5. Ergebnisse

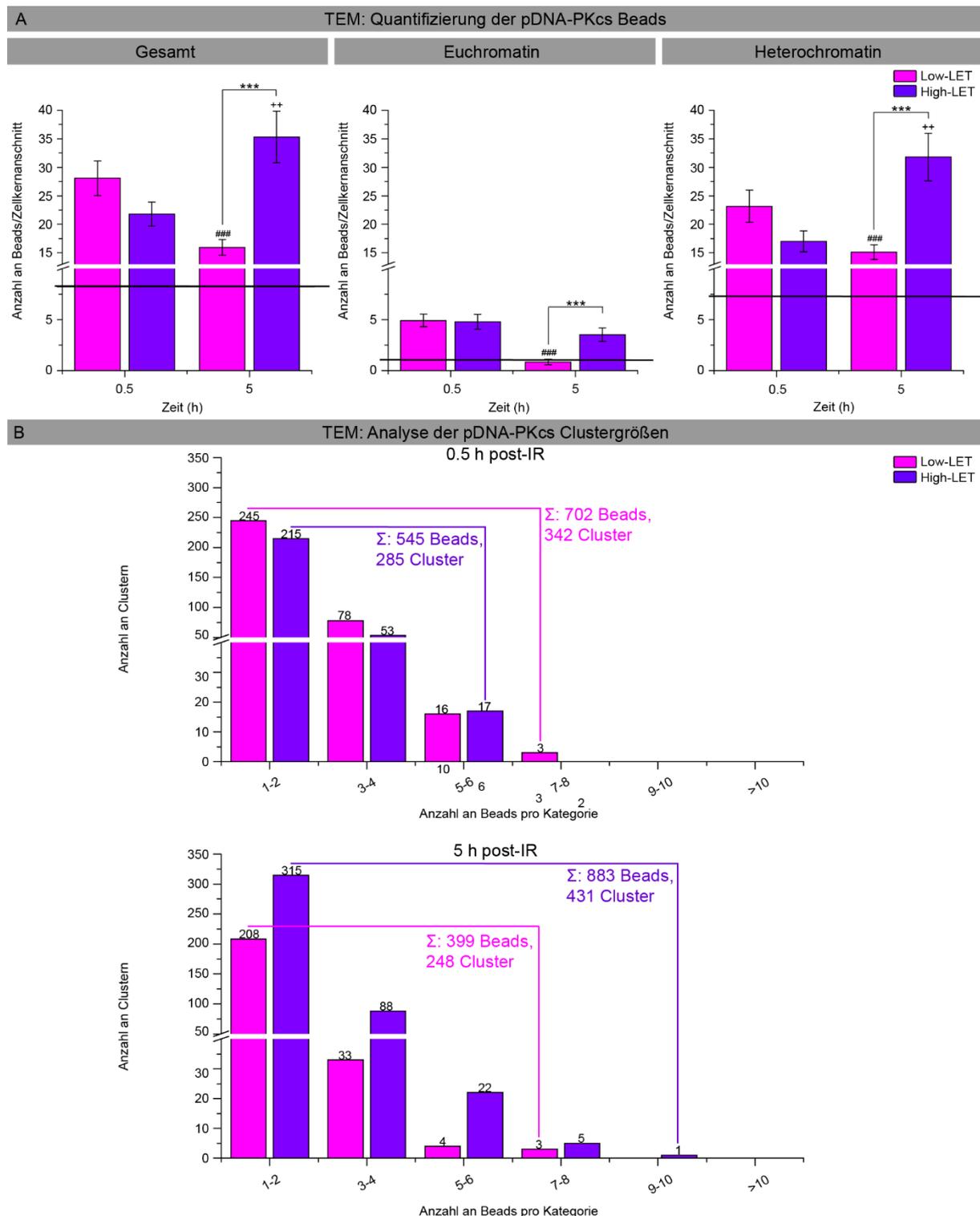
0,01). \*\*\*: Höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ). #: Signifikant zum vorherigen Low-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,01 - 0,05$ ), ##: Hoch signifikant zum vorherigen Low-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,001 - 0,01$ ), ###: Höchst signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p \leq 0,001$ ), +: Signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,01 - 0,05$ ), ++: Hoch signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,001 - 0,01$ ), \*\*\*: Höchst signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p \leq 0,001$ ). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte der 25 ausgezählten Zellkernanschnitte. B: Darstellung der Anzahl an Clustern (Summen der Werte aus 25 Zellkernanschnitten) für die verschiedenen Zeitpunkte (0.5 und 5 h) nach Bestrahlung, unterteilt in verschiedene Clustergrößenkategorien für die Low-LET und High-LET Bestrahlung. Die farbigen Klammern zeigen die jeweilige Bandbreite der Clustergrößen und sind mit den dazugehörigen Summen für die Gesamtbeadzahl und Clusteranzahl beschriftet. Die Zahlen über den Balken stellen die Summen der Cluster aus der jeweiligen Kategorie dar.

Für pDNA-PKcs konnte nach Low-LET Bestrahlung eine signifikante Abnahme der Werte beobachtet werden. Nach High-LET Bestrahlung konnte wieder eine signifikante Zunahme der Werte im HC festgestellt werden (Abbildung 41 A). Des Weiteren konnten nach Low-LET Bestrahlung wiederum die meisten sowie größten Cluster nach 0.5 h ( $\Sigma$ : 342 Cluster) beobachtet werden, wohingegen nach High-LET Bestrahlung die höchsten Werte nach 5 h ( $\Sigma$ : 431 Cluster) auftraten (Abbildung 41 B).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme der effizienteren Reparatur nach Low-LET Bestrahlung. Nach High-LET Bestrahlung deuten die Daten darauf hin, dass aufgrund einer höheren Anzahl an komplexeren Schäden die Reparatur zeitlich verzögert stattfand.

Im Vergleich zu pKu70 und pKu80 konnten für pDNA-PKcs sich stark unterscheidende Werte beobachtet werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.4.1, welche ein anderes Verteilungsmuster der pDNA-PKcs Beads und Cluster, im Vergleich zu pKu70 und pKu80 aufzeigten, unterstützen die quantitativen Daten ebenfalls die Annahme, dass pDNA-PKcs weitere Funktionen neben der DSBs Reparatur hat.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 41: Quantitativer Vergleich von pDNA-PKcs nach Low- und High-LET Bestrahlung**

A: Quantitativer Vergleich der Mittelwerte der pDNA-PKcs Beads nach Low- und High-LET (Carbon) Bestrahlung unterteilt in Gesamtchromatin, EC und HC in den HSF1-Zellen für die verschiedenen Zeitpunkte (0.5 und 5 h). Die Werte der Kontrolle wurden abgezogen. Als Referenz für das Grundlevel an pDNA-PKcs Beads (ausgezählter Wert der pDNA-PKcs Beads in der Kontrolle) wurde eine Kontrolllinie eingefügt. \*: Signifikant ( $p$  liegt zwischen  $> 0,01 - 0,05$ ). \*\*: Hoch signifikant ( $p$  liegt zwischen  $> 0,001 - 0,01$ ). \*\*\*: Höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ). #: Signifikant zum vorherigen Low-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,01 - 0,05$ ), ##: Hoch signifikant zum vorherigen Low-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,001 - 0,01$ ), ###: Höchst signifikant zum vorherigen Low-LET Zeitpunkt ( $p \leq 0,001$ ), +: Signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,01 - 0,05$ ), ++: Hoch signifikant zum vorherigen High-LET Zeitpunkt ( $p$  liegt zwischen  $> 0,001 - 0,01$ ), +++: Höchst signifikant zum vorherigen High-LET

## 5. Ergebnisse

Zeitpunkt ( $p \leq 0,001$ ). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte der 25 ausgezählten Zellkernanschnitte. B: Darstellung der Anzahl an Clustern (Summen der Werte aus 25 Zellkernanschnitten) für die verschiedenen Zeitpunkte (0.5 und 5 h) nach Bestrahlung, unterteilt in verschiedene Clustergrößenkategorien für die Low-LET und High-LET Bestrahlung. Die farbigen Klammern zeigen die jeweilige Bandbreite der Clustergrößen und sind mit den dazugehörigen Summen für die Gesamtbeadzahl und Clusteranzahl beschriftet. Die Zahlen über den Balken stellen die Summen der Cluster aus der jeweiligen Kategorie dar.

Werden abschließend alle Ergebnisse zusammenfassend betrachtet, konnten, im Gegensatz zur Low-LET Bestrahlung, nach High-LET Bestrahlung, zu späten Reparaturzeitpunkten, überwiegend in heterochromatischen Bereichen hohe Werte für 53BP1 festgestellt werden. Diese Ergebnisse korrelierten mit der hohen Anzahl an DCRs nach 5 h und 24 h.

Während 0.5 h nach Low-LET Bestrahlung eine Abnahme der Werte für die DSB Marker pKu70 und pKu80 festgestellt wurde, stiegen diese nach High-LET Bestrahlung zu späten Zeitpunkten, vornehmlich im HC, an. Dieser Anstieg könnte aufgrund von komplexeren Schäden, welche in unmittelbaren Nähe zueinander induziert wurden, verursacht worden sein. Dabei unterstützen die großen pKu70 sowie pKu80 Cluster 5 h nach High-LET Bestrahlung diese Vermutung.

### 5.4.4 Lokalisationsmessungen

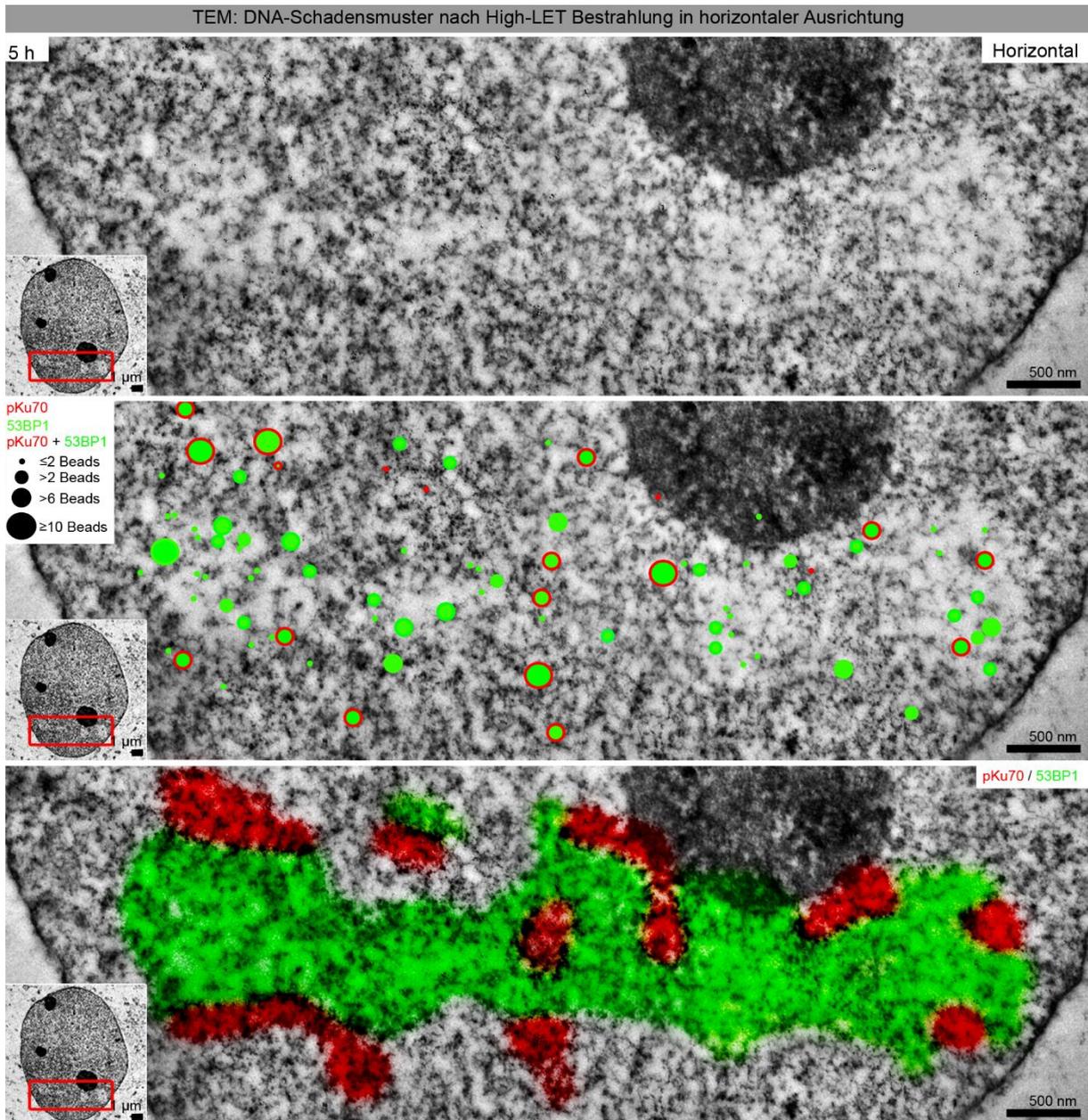
Da sich Unterschiede in der Verteilung von Proteinen der Signaltransduktionskaskade sowie von Reparaturproteinen aufzeigten (Abbildungen 30 bis 36) wurden in weiteren Experimenten die Lokalisationen der Beads und Cluster in Bereichen der DCRs näher untersucht.

Durch die Immuno-Gold-Markierung konnten pKu70 (10 nm, rot) und 53BP1 (6 nm, grün) im gesamten „Track“ visualisiert werden.

Die pKu70 und 53BP1 Beads und Cluster wurden abhängig von ihrer Größe mit Protein-entsprechenden, farblichen Kreisen markiert. Um die Verteilung im „Track“-Bereich hervor zu heben, wurde die farbliche Markierung auf das Chromatin expandiert bzw. übertragen. Als Grundlage für die Markierung der Flächen dienten die verschieden großen Cluster von pKu70 und 53BP1, die mithilfe der Software Photoshop expandiert wurden.

Somit konnte gezeigt werden, dass pKu70 überwiegend an der Peripherie des „Tracks“ lokalisiert vorlag, wohingegen 53BP1 auch innerhalb des „Tracks“ zu beobachten war (Abbildung 42).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 42: Das DNA-Schadensmuster nach High-LET Bestrahlung in horizontaler Ausrichtung**

Zur Visualisierung des DNA-Schadensmusters 5 h nach High-LET Bestrahlung wurden die Beads und Cluster für pKu70 (10 nm, rot) und 53BP1 (6 nm, grün) nach ihrer Größe kategorisiert (linkes Inset im mittleren Bild) und mit farblichen Kreisen innerhalb des „Tracks“ markiert (mittleres Bild). Um die Lokalisation der Proteine innerhalb des Chromatins hervor zu heben, wurden Regionen die pKu70 und 53BP1 enthielten, rot bzw. grün eingefärbt (unterstes Bild). Das Farbschema zeigte, dass 53BP1 (grün) innerhalb der gesamten Teilchenbahn verteilt war, während pKu70 (rot) vorwiegend in der Peripherie des „Tracks“ auftrat. Die roten Kästen in den Zellkernübersichten (jeweils unten links) markieren den vergrößerten Bildbereich.

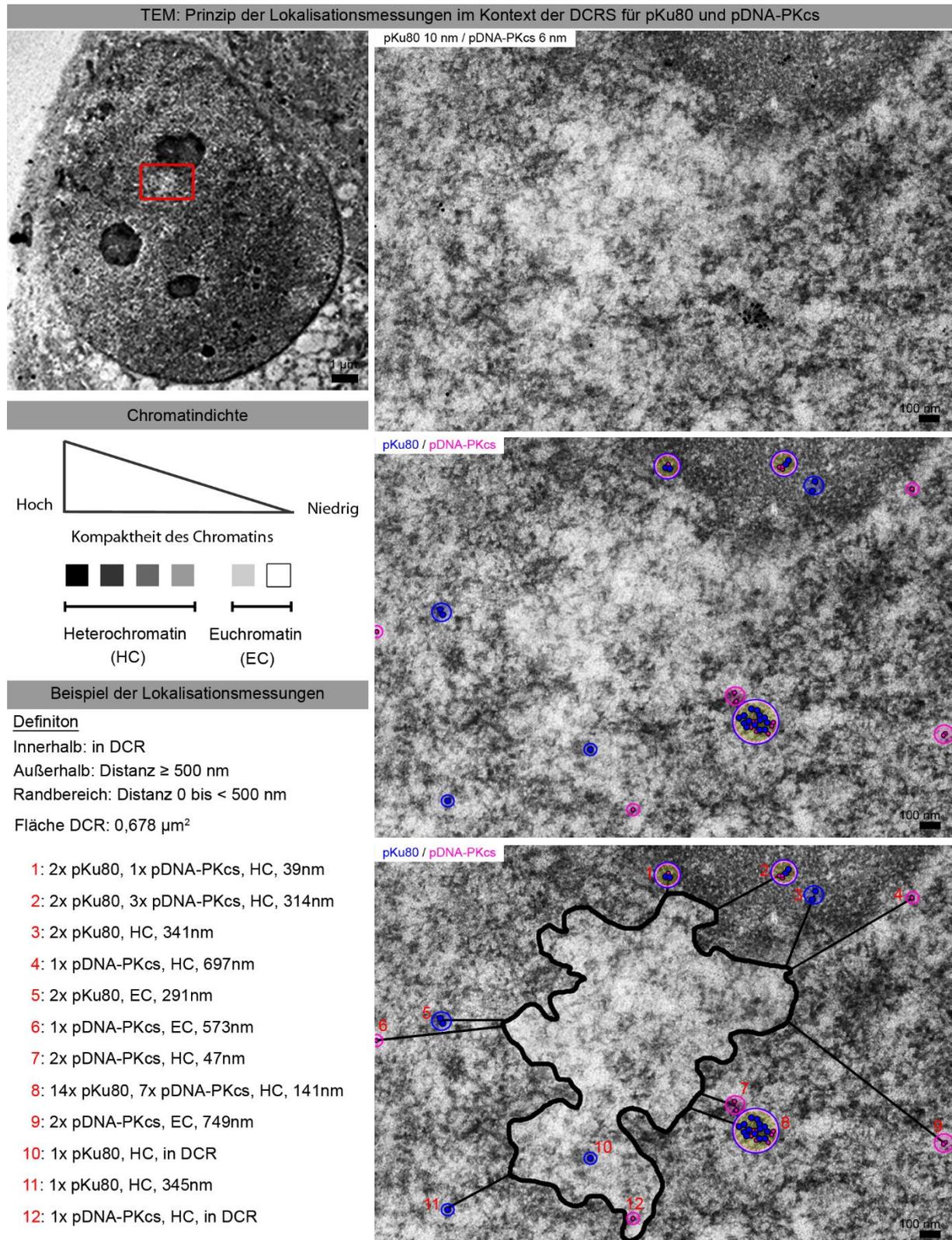
## 5. Ergebnisse

Um die Beobachtungen, dass die Proteine die den DSB markieren eher in den Randbereichen der DCRs lokalisiert vorliegen zu unterstützen, wurden Lokalisationsmessungen im Kontext der DCRs durchgeführt. Dabei wurden in 25 Zellkernanschnitten die Beads und Cluster von pKu80 (10 nm, blau) und pDNA-PKcs (6 nm, magenta) mit ihrer Clustergröße, Lokalisation im EC oder HC sowie Kollokationen analysiert und dokumentiert. Zusätzlich wurden bei den Beads und Clustern, die in Bereichen der DCRs lokalisiert waren, Abstandsmessungen zu den definierten Rändern der DCRs durchgeführt.

In Abbildung 43 wird das Prinzip der Lokalisationsmessungen beispielhaft erläutert. Um eine möglichst Nanometer-genaue Messung zu erhalten, wurden zuerst die Beads und Cluster im Bereich der DCRs lokalisiert, die DCR-Grenze daraufhin mittels der TEM Software Analysis anhand der Graustufen definiert sowie vermessen und zuletzt der Abstand der Cluster zur der definierten Grenze der DCR ausgemessen. Dabei diente der Mittelpunkt des Clusters als Referenzpunkt und der kürzeste Abstand zur DCR-Grenze als Abstandswert.

Es wurden drei Kategorien definiert: Außerhalb (Abstand des Clusters  $\geq 500$  nm), Randbereich (Abstand des Clusters zwischen 0 (direkt auf der definierten Grenzlinie) und  $< 500$  nm) und Innerhalb (alle Cluster, die innerhalb der DCR-Grenzlinie lagen). Des Weiteren wurden für die Zellkernanschnitte die Zellkernfläche, der Durchmesser und die Breite, sowie für die DCRs die Anzahl und Fläche erfasst.

## 5. Ergebnisse



### Abbildung 43: Das Prinzip der Lokalisationsmessungen

Beispiel des Prinzips der Lokalisationsmessungen von Beads und Clustern im Umfeld einer DCR. Nach Erfassung der Beads und Cluster wurde anhand der sechs verschiedenen Graustufen die Grenze der DCR definiert und der kürzeste Abstand der Beads bzw. Cluster (Mittelpunkt) zur Grenzlinie vermessen. Dabei wurde in die drei Kategorien Innerhalb, Außerhalb und Randbereich unterschieden. Bei der Auflistung der Beads und Cluster wurde neben der Abstandsmessung ebenfalls die Zugehörigkeit zum EC oder HC (anhand der Graustufen) dokumentiert. Der rote Kasten in der Zellkernübersicht (oben links) markiert den vergrößerten Bildbereich (rechte Bilder). Die verschiedenen Parameter des Beispiels sind nach den roten Zahlen (1 bis 12) aufgelistet.

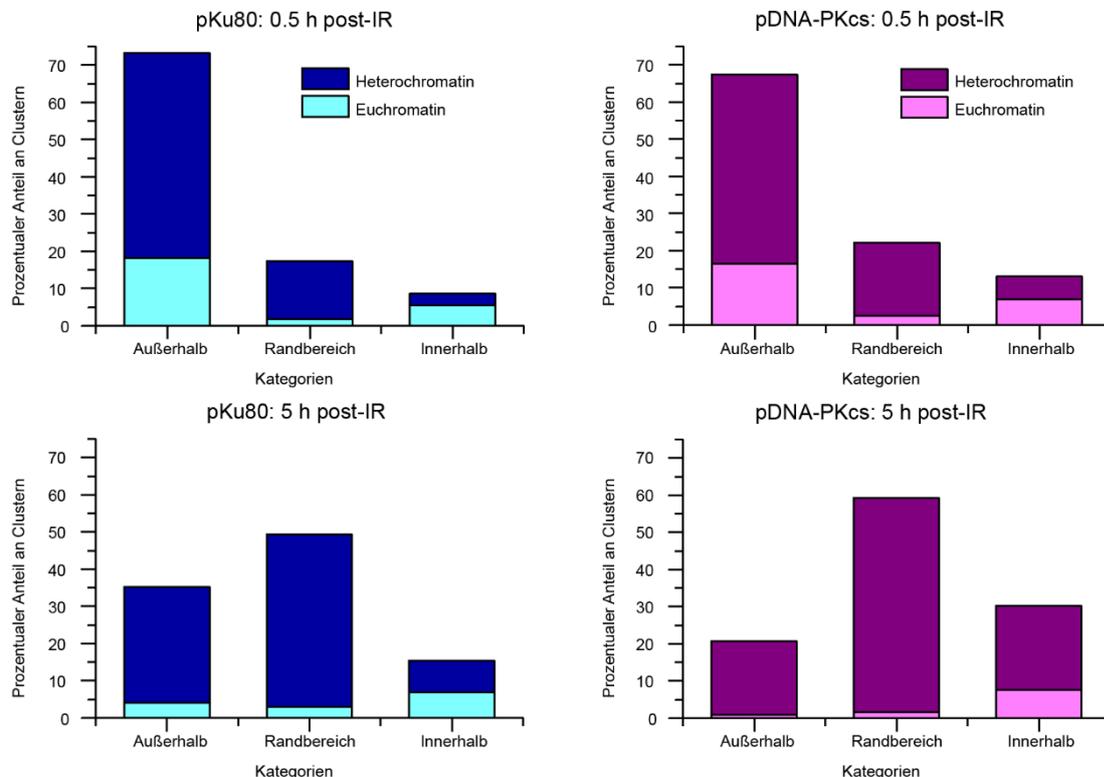
## 5. Ergebnisse

In Abbildung 44 und Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Lokalisationsmessungen nach dem prozentualen Anteil der pKu80 (blau) und pDNA-PKcs (magenta) Cluster, die per Kategorie (Außerhalb, Randbereich, Innerhalb) im EC und HC vorkamen, für die Zeitpunkte 0.5 h und 5h dargestellt. Während 0.5 h nach Bestrahlung die meisten Cluster nicht DCR-assoziiert (Außerhalb) lokalisiert waren, traten nach 5 h die meisten Cluster sowohl für pKu80 als auch für pDNA-PKcs in den Randbereichen oder innerhalb der DCRs auf. Des Weiteren war zu erkennen, dass nach 0.5 h mehr Cluster in euchromatischen Bereichen des Chromatins vertreten waren, als nach 5 h. Zu diesem Zeitpunkt trat nur für die Kategorie Innerhalb ein höherer Wert der euchromatisch lokalisierten Cluster auf.

**Tabelle 8: Prozentwerte der Lokalisationsmessungen für pKu80 und pDNA-PKcs**

| pKu80 |           |             |           | pDNA-PKcs |           |             |           |
|-------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-----------|
| 0.5 h | Außerhalb | Randbereich | Innerhalb | 0.5 h     | Außerhalb | Randbereich | Innerhalb |
| EC    | 18,34%    | 1,75%       | 5,58%     | EC        | 16,49%    | 2,51%       | 6,87%     |
| HC    | 55,50%    | 15,63%      | 3,19%     | HC        | 50,86%    | 17,18%      | 6,19%     |
| EC+HC | 73,84%    | 17,38%      | 8,77%     | Gesamt    | 67,70%    | 19,69%      | 12,71%    |
| 5 h   | Außerhalb | Randbereich | Innerhalb | 5 h       | Außerhalb | Randbereich | Innerhalb |
| EC    | 4,09%     | 2,93%       | 6,87%     | EC        | 0,96%     | 1,65%       | 7,68%     |
| HC    | 31,10%    | 46,37%      | 8,56%     | HC        | 18,79%    | 55,69%      | 15,23%    |
| EC+HC | 35,19%    | 49,30%      | 15,51%    | Gesamt    | 19,74%    | 57,34%      | 22,91%    |

TEM: Auswertung der Lokalisationsmessungen von pKu80 und pDNA-PKcs nach High-LET Bestrahlung



**Abbildung 44: Quantitative Auswertung der Lokalisationsmessungen von pKu80 und pDNA-PKcs nach High-LET Bestrahlung**

Prozentualer Anteil an Clustern für pKu80 (blau) und pDNA-PKcs (magenta), unterteilt nach euchromatischer und heterochromatischer Lokalisation, für die Kategorien Außerhalb, Randbereich und Innerhalb. Während 0.5 h nach Bestrahlung die meisten Cluster nicht DCR-assoziiert lokalisiert waren,

## 6. Diskussion

traten nach 5 h die meisten Cluster sowohl für pKu80 als auch pDNA-PKcs in den Randbereichen oder innerhalb der DCRs auf. Des Weiteren war zu erkennen, dass nach 0.5 h mehr Cluster in euchromatischen Bereichen des Chromatins vertreten waren, als nach 5 h. Zu diesem Zeitpunkt zeigte nur die Kategorie Innerhalb einen höheren Wert der euchromatisch lokalisierten Cluster auf.

Die Lokisationsmessungen zeigten eine deutliche Veränderung in der Verteilung der Cluster mit der Zeit. Sie belegen die Annahme, dass pKu80 und pDNA-PKcs nach 5 h überwiegend in den heterochromatischen Randbereichen der DCRs lokalisiert waren. Während die Reparaturfaktoren, die die DNA-Schadensantwort sowie Öffnung des Chromatins vermitteln innerhalb und um die DCRs lokalisiert vorliegen, konzentrieren sich die Reparaturproteine nach 5 h überwiegend in den heterochromatischen Randbereichen der DCRs.

## 6. Diskussion

Das induzierte DNA-Schadensmuster sowie die Bedeutung des Chromatins als beeinflussende Faktoren der DNA-Schadensantwort rücken immer mehr in den Fokus der Forschung. Dabei stellten sich die Fragen inwieweit die Dichte sowie Komplexität der DNA-Schäden und die Chromatinstruktur, in Abhängigkeit von der Strahlenqualität, einen Einfluss auf den Prozess der Reparatur nehmen könnten. In dieser Arbeit konnten die maßgeblich beeinflussende Rolle des DNA-Schadensmusters sowie die wichtige Funktion des Chromatins für die DSB-Reparatur herausgestellt werden.

Nach Bestrahlung war eine sofortige Öffnung des Chromatins zu beobachten. Diese zeigte sich nach Low-LET Bestrahlung anhand des unmittelbar auftretenden H4K16ac Signals und nach High-LET Bestrahlung durch die größer werdenden DCRs, welche H4K16ac Beads und Cluster enthielten. Die weiteren Untersuchungen zeigten, dass diese Chromatinveränderungen mit der Akkumulation verschiedenster Reparaturfaktoren assoziiert waren. Dabei gab es eine unmittelbare Anhäufung von  $\gamma$ H2AX nach Low-LET Bestrahlung. Die Beteiligung von pATM, pKap-1 und 53BP1 an der Öffnung des Chromatins konnte ebenfalls anhand eines zuerst global auftretenden Signals, welches sich später in heterochromatischen Bereichen konzentrierte, vermutet werden. Nach High-LET Bestrahlung wurde durch die akkumulierenden Reparaturfaktoren in und um die Chromatinveränderungen eine Beteiligung an der Ausbildung der DCRs ersichtlich. Insbesondere wurde diese Vermutung durch die langverbleibenden, größeren 53BP1 Beads und Cluster, welche präferentiell im HC vertreten waren, unterstützt.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, dass die Chromatinöffnung in Verbindung mit der DSBs Reparatur stand. Dabei konnten die Proteine pKu70 und pKu80 anhand ihrer Verteilungsmuster sowie den kolokalisierenden Beads und Clustern mit TUNEL (physikalischer DNA-Schaden) als DSB Marker genutzt werden. Zusätzlich zu den Verteilungsmustern zeigten die quantitativen Daten nach Low-LET Bestrahlung ein Absinken der Mittelwerte für die DSB Marker, wohingegen nach High-LET Bestrahlung zu späten Zeitpunkten immer noch signifikant erhöhte Werte beobachtet werden konnten. Diese Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass nach High-LET Bestrahlung die Reparatur zeitlich verzögert stattfand. Außerdem traten, im Gegensatz zur Low-LET Bestrahlung, nach High-LET Bestrahlung größere Cluster der DSB Marker auf, welche auf komplexere DSBs schließen ließen. Dabei konnte zusätzlich durch die Lokalisationsmessungen gezeigt werden, dass diese zahlreichen Schäden zu späten Zeitpunkten überwiegend im heterochromatischen Randbereichen der DCRs auftraten.

Die in dieser Arbeit untersuchten Zusammenhänge deuten darauf hin, dass das DNA-Schadensmuster sowie die Chromatinstrukturierungen für eine effiziente DNA-Reparatur essentiell sind und eine Schlüsselrolle bei der Abstimmung der verschiedenen Reparaturfaktoren spielen, um die Integrität der Zelle aufrechtzuerhalten. Als beeinflussender Faktor stellt sich die Strahlenqualität heraus, die maßgeblich den Verlauf der Reparatur über die induzierten DNA-Schäden und die damit einhergehenden Umstrukturierungen des Chromatins beeinflusst.

### 6.1 Der Zustand des Chromatins beeinflusst maßgeblich die strahleninduzierte DSB Reparatur

Die, zum Zeitpunkt der Schadensinduktion vorliegende Chromatinstruktur stellt eine natürliche Barriere für die Anlagerung der Reparaturfaktoren dar. Bevor ein DSB erkannt und repariert wird, muss der DNA-Schaden zunächst im Kontext der vorherrschenden Chromatinstruktur detektiert werden. Dies stellt insbesondere im kondensierten HC eine Herausforderung dar und macht eine Öffnung des Chromatins unerlässlich. Die Öffnung des Chromatins als Reaktion auf die Bestrahlung konnte schon unmittelbar nach Bestrahlung, durch den frühen Anstieg (0.1 h) des H4K16ac-Signals und auch die schnelle Anwesenheit (0.5 h) der H4K16ac-Beads und Cluster in den DCRs gezeigt werden, was die Annahme einer der Reparatur vorangehenden, über H4K16ac vermittelten Öffnung des Chromatins unterstützt. Das anschließend

zurückgehende H4K16ac Signal bzw. die verminderte Anwesenheit von Beads deutet einen Rückgang der offenen Chromatinstruktur an, welcher auf die Wiederherstellung der ursprünglichen Chromatinstruktur hinweisen könnte. Gupta et al. beschrieben die gleichen Phänomene, ebenfalls in humanen Fibroblasten, was die beobachteten Ergebnisse festigt (Gupta et al., 2008; Gupta et al., 2005). Die wichtige Funktion der Öffnung des Chromatins für die Zugänglichkeit zum DSB wird durch diese Ergebnisse deutlich und macht die beeinflussende Rolle des Chromatins klar. Neben H4K16ac als Chromatin-beeinflussende Histonmodifikation akkumulieren verschiedenste Reparaturfaktoren im Umfeld des strahleninduzierten Schadens und vermitteln die Dekondensation des Chromatins. Die Ergebnisse dieser Arbeit können eine über pATM induzierte pKap-1-assoziierte heterochromatische Dekondensation des Chromatins unter Beteiligung von 53BP1 und  $\gamma$ H2AX bestätigen (Goodarzi & Jeggo, 2009; Goodarzi et al., 2008). Die nach dem Rückgang des pan-nukleären Signals mit pATM kolokalisierenden pKap-1 Foci und die in den DCRs kolokalisierenden, heterochromatischen Cluster für pKap-1 und pATM gehen dabei mit den Aussagen von Noon et al. einher, die zu späteren Zeitpunkten (4-8 h nach Bestrahlung) die Bildung von pKap-1 Foci in humanen, primären Fibroblasten in heterochromatischen Regionen ebenfalls beschrieben (Noon et al., 2010). Das Protein 53BP1 scheint bei diesen Vorgängen eine wichtige Rolle zu spielen und wird als zentraler Bestandteil der Chromatin-basierten DNA-Schadensantwort genannt (Panier & Boulton, 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich die Akkumulation von 53BP1 im Umfeld von DSBs. Im zeitlichen Verlauf zeigten sich sowohl in ihrer Anzahl als auch Fläche bzw. Größe variierende Foci sowie Cluster, welche die, mit der Zeit zunehmende, Akkumulation von 53BP1 verdeutlichen. Die Kolokalisation von 53BP1 mit pKu70 in heterochromatischen Domänen bestätigt dabei die direkte Interaktion an der Schadensstelle. Des Weiteren konnten Kolokalisationen mit pATM beobachtet werden, welche die in der Literatur beschriebene Signalverstärkung an heterochromatischen Schadensstellen zur Freilegung für die Reparatur unterstützen (Goodarzi & Jeggo, 2009). Die Akkumulation von 53BP1 zu späteren Zeitpunkten in heterochromatischen Bereichen könnte komplexere und/oder schwieriger zu reparierende Schäden markieren. Diese durch 53BP1 markierten Chromatinveränderungen können nach Harrigan et al. die Transkriptionsaktivität in diesen Bereichen vermindern, um somit die Integrität der Zelle zu schützen (Harrigan et al., 2011). Nach der Freilegung der DSBs kann der Vorgang der Reparatur über das

NHEJ ablaufen. Ein grundlegender Prozess beim NHEJ ist die initiale Bindung des Heterodimers aus Ku70 und Ku80 am freigelegten DSB. Das Heterodimer bleibt über den gesamten Reparaturprozess an den Bruchenden und bildet zusammen mit DNA-PKcs einen stabilisierenden Ringkomplex, welcher dem Auseinandergleiten der Bruchenden entgegenwirkt (Cary et al., 1997; Mahaney et al., 2009). Vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe Rube etablierten pKu70 als Marker für nicht reparierte DSBs, was durch diese Arbeit erneut bestätigt werden konnte. Der Marker besitzt den Vorteil, das aktive, direkt am Bruch bindende Protein, welches während der gesamten Prozessierung des DSB dort verbleibt, zu detektieren (Cary et al., 1997; Lorat, Schanz, & Rube, 2016; Rube et al., 2011). Die zum größten Teil übereinstimmenden Ergebnisse der quantitativen Daten sowie des Verteilungsmusters von pKu70 und pKu80 und die Kolokalisation mit dem TUNEL zeigten auf, dass pKu80 ebenso als Marker für unreparierte DSBs genutzt werden kann. Die ebenfalls am Bruch bindende und mit dem Heterodimer interagierende pDNA-PKcs kann ebenfalls als Marker für DSBs verwendet werden, da auch hier ähnliche Verteilungsmuster und Mengen, wie bei pKu70 und pKu80 beobachtet wurden. Die zuvor beschriebene Interaktion von pDNA-PKcs mit pKu80 konnte mittels kolokalisierender Beads und Cluster nachvollzogen werden, doch die zum Teil allein auftretenden pDNA-PKcs Beads und Cluster deuten auf weitere Funktionen hin. Die spezifisch verwendete Phosphorylierungsstelle am Threonin 2609 von pDNA-PKcs wird laut Chen et. al ebenfalls mit der Chromatinorganisation direkt am Bruch assoziiert (Chen et al., 2007) und könnte eine mögliche Erklärung für die alleinstehenden Beads und Cluster liefern. Für die beiden Proteine pKu70 und pKu80 konnten im Rahmen dieser Arbeit mittels Immuno-Gold-Markierung größtenteils Doppelbeads, welche vermutlich die beiden an den Bruchenden sitzenden Proteine repräsentierten, gezeigt werden. Die auftretenden Cluster, die aus mehreren Doppelbeads bestanden, könnten somit als eine größere Ansammlung von DSBs deklariert werden. Die in dieser Arbeit erhobenen Kinetiken für pKu70 und pKu80, bei denen durch die TEM die Schäden dem EC und HC zugeordnet werden konnten, zeigen eindeutig, dass die gut zugänglichen Brüche im EC schnell repariert wurden, worauf andere Arbeiten ebenfalls verweisen (Goodarzi, Jeggo, & Lobrich, 2010; Goodarzi & Jeggo, 2012; Goodarzi et al., 2008). Dem stehen die langverbleibenden DSBs im HC gegenüber, welche mit den Ergebnissen für 53BP1 einhergehen, die ebenfalls ein langanhaltendes Verbleiben von 53BP1 in heterochromatischen Bereichen zeigten. Die größten Cluster für pKu70 und pKu80

waren grundsätzlich in heterochromatischen Domänen kolokalisierend mit 53BP1 zu beobachten, was darauf hindeutet, dass die Kompaktheit des HC eine Barriere für den Nachweis und die Reparatur darstellte und eine Dekondensation erforderte, welche in einer langsameren Reparaturkinetik resultierte (Jakob et al., 2011; Kruhlak et al., 2006; Murga et al., 2007). Die wichtige Funktion der Chromatinstruktur bestätigt sich erneut und stellt einen maßgeblich beeinflussenden Faktor bei der Reparatur von DSBs dar. Dies scheint ein generelles Phänomen zu sein, welches unabhängig von der Strahlenqualität auftritt. In Abhängigkeit von der genutzten Strahlenqualität fallen dabei allerdings Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Reparatur sowie der Verteilung und Komplexität der DSBs auf, auf die im Folgenden eingegangen wird.

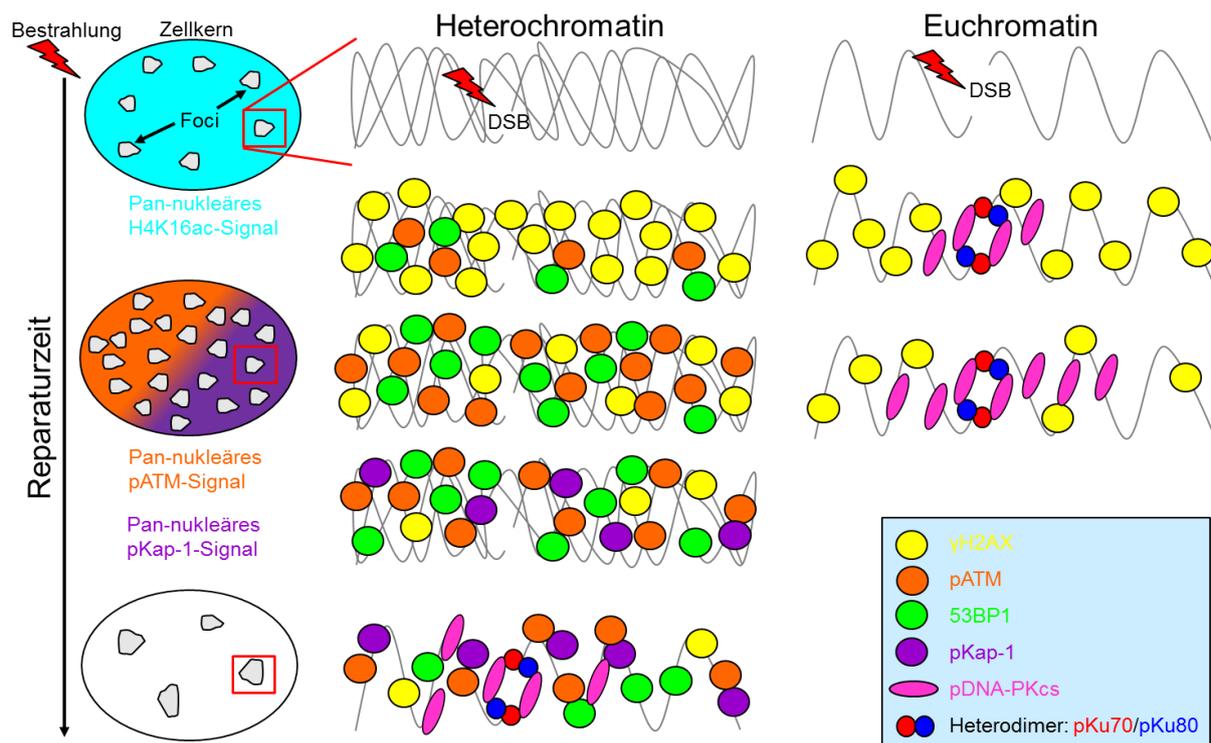
### 6.2 Die Strahlenqualität hat einen erheblichen Einfluss auf die DNA-Schadensantwort sowie Reparatur

Im zeitlichen Verlauf der DNA-Schadensantwort sowie Reparatur zeigten sich Unterschiede bei der Effizienz dieser Vorgänge, welche auf die unterschiedlichen Auswirkungen von Low-LET Bestrahlung und High-LET Bestrahlung zurückgeführt werden können. Sowohl die räumliche Dichte der DNA-Schäden, als auch deren Komplexität, welche maßgeblich durch die verwendete Strahlenqualität beeinflusst wurde, spielten eine entscheidende Rolle.

#### 6.2.1 Der Einfluss von Low-LET Bestrahlung mit Photonen

Im zeitlichen Verlauf der Reaktion auf die Low-LET Bestrahlung konnte nach 0.5 h die massivsten Veränderungen herausgestellt werden. Die Reparaturfaktoren mit Mediatorfunktion (z.B. pATM oder 53BP1), als auch die Reparaturproteine, die direkt am Bruch binden (pKu70/pKu80 und pDNA-PKcs), zeigten über die verwendeten Nachweismethoden nach 0.5 h ihre Maximal-Werte bzw. -Intensitäten. Lediglich die Histonmodifikationen H4K16ac und  $\gamma$ H2AX, welche in Verbindung mit der Öffnung der Chromatinstruktur stehen, traten früher auf. Die Verteilungsmuster der Reparaturfaktoren lassen darauf schließen, dass ein globales, diffuses Signal im Zellkern induziert wurde, um das Signalisierungsnetzwerk zu aktivieren (Abbildung 45, links) (Goodarzi et al., 2010; Goodarzi & Jeggo, 2012; Lobrich & Jeggo, 2017). Dieses scheint auszureichen, um die schnelle Reparatur euchromatischer DSBs zu vermitteln (Abbildung 45, EC). Nach Low-LET Bestrahlung lässt sich im Allgemeinen eine effizientere Reparatur im Vergleich zur High-LET Bestrahlung feststellen, da zu späten

Zeitpunkten wenige oder in ihrer Anzahl zurückgehende Werte für die Reparaturproteine pKu70 und pKu80, die isolierte DSBs repräsentieren, gezeigt werden konnten. Dabei fällt jedoch auf, dass die wenigen noch verbleibenden DSBs im HC lokalisiert waren. In diesen Bereichen schienen sich die Reparaturfaktoren um die heterochromatischen Brüche zu konzentrieren, um eine Dekondensierung des Chromatins zu induzieren, was die leicht verzögerte Reparatur im HC erklären würde (Abbildung 45, HC) (Goodarzi et al., 2010; Goodarzi & Jeggo, 2012). Die nach Low-LET induzierten isolierten DSBs schienen dabei keine Beeinträchtigung für die Wiederherstellung der Chromatinstruktur darzustellen und gingen nicht mit großen, deutlich sichtbaren Umstrukturierungen auf Chromatinebene einher, was den Schluss zulässt, dass die DNA-Schäden weniger komplex waren. Durch die kleineren und damit weniger komplexen pKu70 und pKu80 Cluster, die zum Teil mit TUNEL kolokalisierten konnte verdeutlicht werden, dass am DSB zwar ein physikalischer Bruch vorliegt, doch dieser vermutlich leicht wieder zusammengeführt werden konnte.



**Abbildung 45: DNA-Schadensantwort und Reparatur im Kontext der Chromatinstruktur nach Low-LET Bestrahlung**

Auf den Ergebnissen dieser Arbeit basierender Verlauf der DNA-Schadensantwort im Kontext der Chromatinstruktur nach Low-LET Bestrahlung. Im zeitlichen Verlauf der Reparatur zeigte sich ein Unterschied in der Reparatur von euchromatischen und heterochromatischen DSBs nach Low-LET Bestrahlung. Nach der Akkumulation der Reparaturfaktoren in höherer Anzahl im gesamten Zellkern, konzentrierten sich die Proteine in heterochromatischen Regionen des Zellkerns. Während im EC die Reparatur schnell ablaufen konnte, akkumulierten in den heterochromatischen Bereichen die Proteine  $\gamma$ H2AX, 53BP1 und pATM, wo sie über die Phosphorylierung von Kap-1 die Dekondensierung des Chromatins vermittelten. Daraufhin konnten die Reparaturproteine pKu70, pKu80 und pDNA-PKcs am

Bruch binden, ihn reparieren und die ursprüngliche Chromatinstruktur wurde durch die rückläufige Signalkaskade wieder hergestellt.

### 6.2.2 Der Einfluss von High-LET Bestrahlung mit Schwerionen

Einige Studien konnten bereits zeigen, dass nach High-LET Bestrahlung Cluster-DNA-Schäden mit zahlreichen DSBs induziert werden (Asaithamby & Chen, 2011; Hada & Georgakilas, 2008; Lorat et al., 2015; Lorat, Timm, Jakob, Taucher-Scholz, & Rube, 2016; Mavragani et al., 2017). Trotzdem sind noch immer zahlreiche Fragen, die die Auswirkungen einer High-LET Bestrahlung betreffen, insbesondere die genaue Verteilung der Reparaturfaktoren im zeitlichen Verlauf nach der Bestrahlung, offen. Die Analyse von HSF1-Zellen zu verschiedenen Reparaturzeitpunkten nach High-LET Bestrahlung (im *Bragg Peak*) mittels IFM und TEM zeigte, dass das DNA-Schadensmuster, also die räumliche Dichte der DNA-Schäden als auch deren Komplexität eine wichtige Rolle bei der DNA-Schadensantwort und Reparatur spielen. Dabei wurde ebenfalls die wichtige Funktion der Chromatinstrukturierung während dieser Vorgänge deutlich. Die Untersuchungen von 53BP1 mittels IFM verdeutlichten, dass nach High-LET Bestrahlung sehr viel größere Reparaturfoci gebildet werden, die auf eine erhöhte Ansammlung von Reparaturfaktoren sowie einer massiven Umstrukturierung des Chromatins hindeuten. Selbst die nur in geringer Anzahl am Bruch bindenden Reparaturproteine pKu70 und pKu80 schienen nach High-LET Bestrahlung in so großer Anzahl an vermehrt induzierten und/oder komplexeren DSBs zu akkumulieren, dass ein IFM-Signal nachweisbar war. Die, in der Anzahl mit der Fluenz übereinstimmenden, „*Clustered Foci*“ bildeten dabei einen guten Beweis für die Korrektheit des Schadenssignals. Zahlreiche andere Studien konnten ebenfalls, mittels konventioneller IFM und/oder hochauflösenderer IFM-Techniken, aufzeigen, dass nach High-LET Bestrahlung vergrößerte Schadensspuren auftraten (Hagiwara et al., 2017; Jezkova et al., 2018; Nakajima et al., 2013). In den meisten Fällen wurden die Reparaturfaktoren 53BP1 oder  $\gamma$ H2AX untersucht, welche als Marker für DSBs genutzt wurden, allerdings nicht nur den DSBs markieren, sondern auch im Umfeld der DSBs auftreten (Rogakou et al., 1999; Rogakou et al., 1998; Schultz, Chehab, Malikzay, & Halazonetis, 2000). Mit der Markierung von pKu70 und pKu80, welche direkt am unreparierten DSB binden, gibt es die Möglichkeit nur den direkten DSB zu untersuchen (Lorat et al., 2012; Rube et al., 2011). Mittels der hochauflösenden TEM konnten, sowohl die Reparaturfaktoren über die Immuno-Gold-Markierung, als auch die Ultrastruktur des Chromatins im Nanometerbereich dargestellt werden, was eine

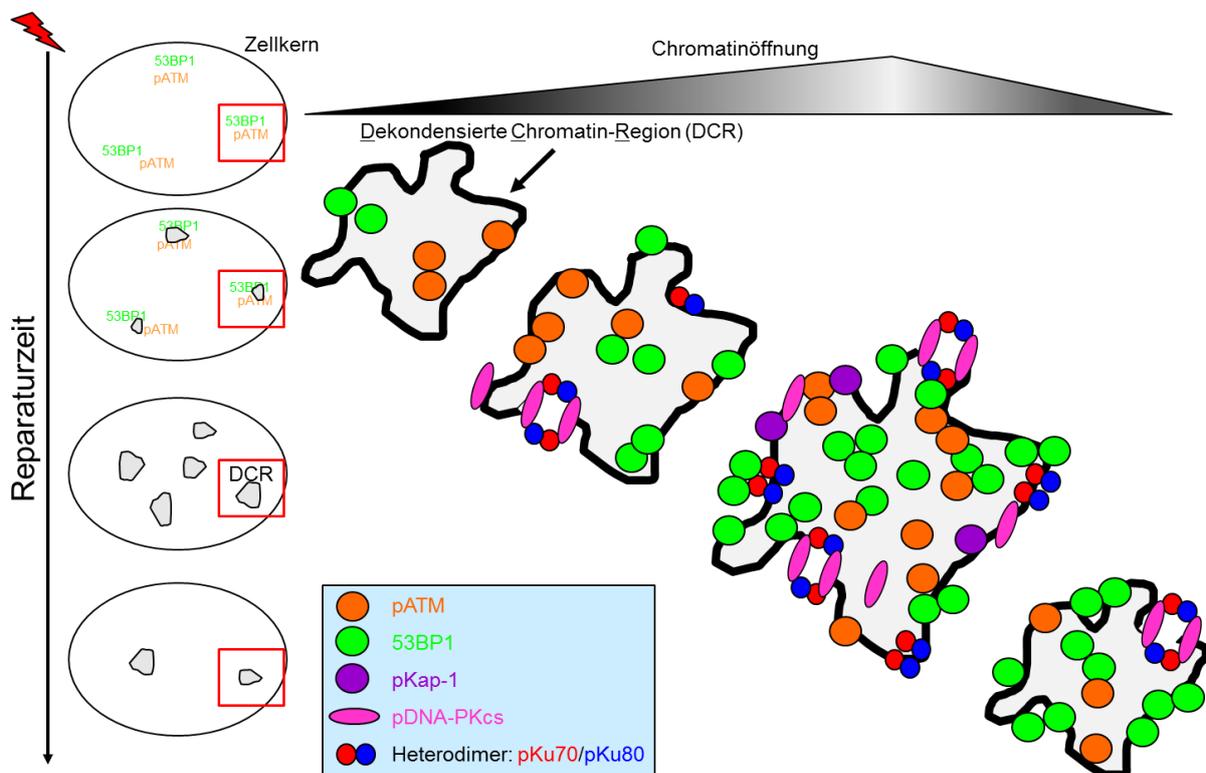
detailliertere Untersuchung im Vergleich zur IFM ermöglichte. Dadurch konnten die massiven Veränderungen auf Chromatinebene, die durch die Energiedeposition der durchdringenden Teilchen während der High-LET Bestrahlung induziert wurden, visualisiert werden. Diese lassen vermuten, dass die, nach 5 h der High-LET Bestrahlung auftretenden, Cluster-DNA-Schäden, welche durch die zahlreichen, größeren pKu70 und pKu80 Cluster in räumlicher Nähe zueinander nachweisbar waren, ein Chromatinumstrukturierung im großen Ausmaß nach sich ziehen. Auch hier verdeutlicht, die mit der Fluenz übereinstimmende Anzahl an DCRs, dass diese dekondensierten Chromatinbereiche eine Reaktion auf das durchgedrungene Teilchen war. Die kolocalisierenden, großen Cluster von pKu80 und TUNEL zeigten des Weiteren, dass an den Cluster-DNA-Schäden mehrere physikalische Brüche vorhanden waren, die die Komplexität des Schadens verdeutlichen und die korrekte Zusammenführung der Bruchenden erschweren könnte. In einigen anderen Studien wurden ähnliche Beobachtungen beschrieben. Sie zeigten, dass in Bereichen der Schädigung eine minimale Bewegung des Chromatins, die auf eine lokale Dekondensation zurückzuführen ist, vorkommen kann (Falk, Lukasova, Gabrielova, Ondrej, & Kozubek, 2007; Kruhlak et al., 2006). Die Analyse einer GFP-53BP1 exprimierenden Zelllinie mithilfe der Lebendzellmikroskopie ließ nach Schwerionenbestrahlung ebenfalls eine höhere Mobilität des Chromatins entlang der Teilchenspuren vermuten. Dort wurden über 12 h Verschiebungen des Chromatins im geschädigten Bereich sowie Bewegungsmuster über die morphologischen Veränderungen der Kernstruktur der Zelle nach Schwerionenbestrahlung untersucht. In einigen Fällen konnte eine langsame Migration des Chromatins in Bereichen der Schadensspuren beobachtet werden, die nicht auf Bewegungen der gesamten Zelle zurückzuführen war (Jakob, Splinter, Durante, & Taucher-Scholz, 2009). Diese Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit, die eine langsame Ausbildung von DCRs in von Schwerionen geschädigten Bereichen des Chromatins zeigten. Die Bildung der DCRs ist mit den im zeitlichen Verlauf miteinander interagierenden, aktiven Reparaturproteinen pATM, 53BP1 und pKap-1 sowie pDNA-PKcs assoziiert. Die eindeutig, in und um die DCRs, nachweisbaren pATM, 53BP1, pKap-1 und pDNA-PKcs Beads und Cluster und deren in verschiedenen Kombinationen nachgewiesenen Kolokalisationen lassen eine Beteiligung an der Bildung der DCRs vermuten. Dabei lassen die Lokalisationsmessungen den Schluss zu, dass die Bildung der DCRs mit der Reparatur einhergeht und als dynamischer

Prozess von innen nach außen stattfinden könnte. Im zeitlichen Verlauf waren pKu70, pKu80 und pDNA-PKcs (direkt am DSB) in größeren Mengen zusätzlich zu den Mediatorproteinen, die eine Öffnung des Chromatins vermittelten, überwiegend in den heterochromatischen Randbereichen der Schadensspuren bzw. DCRs, anwesend (Abbildung 46). Des Weiteren stellen sich die DSBs nach High-LET, im Vergleich zur Low-LET Bestrahlung, komplexer, durch größere Cluster in räumlicher Nähe zueinander, dar. Einige andere Studien untersuchten Verteilungsmuster bei der zellulären Antwort auf Ionen-induzierte DNA-Schäden, mittels IFM gegen  $\gamma$ H2AX, in den stark kondensierten Chromozentren von MEFs-Zellen (*mouse embryo fibroblast*). Dabei wurde eine Verlagerung der Schadensstellen aus dem Inneren der Chromozentren in deren Peripherie festgestellt. Die Ergebnisse deuten auf eine Verlagerung der Ionen-induzierten Schädigung von der anfänglichen Induktionsstelle im Inneren der heterochromatischen Domänen zur Peripherie mit einer geringeren Chromatindichte hin. Dabei könnte dieser dynamische Prozess, welcher innerhalb 1 h nach Schadensinduktion auftritt, auf frühe Änderungen in der Nukleosom-Organisation an den Stellen mit zahlreichen DSBs (Cluster-DNA-Schäden) hindeuten (Jakob et al., 2011). Die Beobachtungen verdeutlichen, dass Änderungen in der Chromatinorganisation nicht nur auf die primär geschädigte Stelle beschränkt sind (Hinde, Kong, Yokomori, & Gratton, 2014). Die genauere Untersuchung der Chromatinstruktur im Schadensbereich zeigte eine grundlegende Neuordnung des Chromatins mit besser zugänglichen Bereichen innerhalb der DCRs und kompakteren Domänen an der Peripherie der geschädigten Bereiche. Derzeit ist der funktionelle Hintergrund der lokal, verdichteten Bereiche an den Grenzen des geschädigten Chromatins noch unklar. Erste Untersuchungen anderer Forschungsgruppen zeigten allerdings, dass vorübergehende Chromatinkondensationen tatsächlich notwendig sein könnten, um die Beweglichkeit des beschädigten Chromatins vorübergehend zu begrenzen, um die Bruchenden während der ersten Reparaturschritte in unmittelbare Nähe zueinander zu halten (Burgess, Burman, Kruhlak, & Misteli, 2014). Des Weiteren kann die kurzzeitige Chromatinkondensation die Transkription an den verdichteten Stellen unterdrücken, wodurch schädliche Interferenzen zwischen Transkriptions- und Reparaturmechanismen vermieden werden (Kakarougkas, Downs, & Jeggo, 2015). Die lang verbleibenden 53BP1 Beads und Cluster in diesen Bereichen könnten dabei ein Hinweis auf diese Annahme sein, da eine zunehmende Akkumulation von 53BP1 an geschädigter DNA ebenfalls mit einer verminderten Transkriptionsrate einhergeht

(Harrigan et al., 2011). Damit die Funktionen der Zelle erhalten bleiben, muss die genomische Integrität nach der Reparatur der DNA wiederhergestellt werden. Weiterführende Untersuchungen, die die Wiederherstellung des Chromatins nach der Schadensinduktion beleuchten, könnten bestimmen, wann und durch welche Mechanismen dies geschieht. Die Integrität des Chromatins ist von zentraler Bedeutung für die zelluläre Funktion und eine Deregulation in der Chromatinstrukturierung kann die Aufrechterhaltung der epigenetischen Informationen beeinflussen (Nair, Shoaib, & Sorensen, 2017). Die Anwesenheit der DCRs selbst nach 24 h sowie die ebenfalls lang verbleibenden größeren 53BP1 Cluster weisen darauf hin, dass die High-LET Bestrahlung mit einer langanhaltenden Dekondensation des Chromatins assoziiert ist. Dabei weisen die anhaltenden DCRs an den geschädigten Stellen auf ein Versagen der Zellen bei der Wiederherstellung der ursprünglichen Chromatinstruktur hin. Die Veränderung der ursprünglichen Genomstruktur könnte die Expression von Genen in beschädigten, nicht reversibel herstellbaren Chromatinregionen beeinflussen und dies könnte somit fatale Folgen für die zelluläre Funktion haben. Letztendlich könnte es zu einem geringeren Zellüberleben nach High-LET Bestrahlung führen, was durch die 48 h Probe, in der keine Zellen mehr nachweisbar waren gestützt wird. Es gibt allerdings Studien, die den Zellzyklusarrest nach High-LET Bestrahlung untersucht haben und zeigten, dass normale, humane Fibroblasten nach 24 h in einen dauerhaften Zellzyklusarrest übergehen und darüber stillgelegt werden (Fournier & Taucher-Scholz). Doch wird ebenfalls die Meinung vertreten, dass kultivierte Fibroblasten eher zu Nekrose neigen, als Apoptose. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die Apoptose zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung auftreten kann. Während die frühe Apoptose einige Stunden nach der Bestrahlung vor der Zellteilung (Interphasentod) auftritt, tritt die späte Apoptose nach dem G2-Arrest oder einige Tage nach der Bestrahlung auf (Cohen-Jonathan, Bernhard, & McKenna, 1999; Pouget & Mather, 2001; Radford, Murphy, Radley, & Ellis, 1994). Radford et al. vertreten die Meinung, dass die frühe Apoptose durch DSBs induziert wird, während die verzögerte Apoptose auf Chromosomenschäden aufgrund nicht oder falsch reparierter Brüche zurückzuführen ist (Radford et al., 1994). Diese Annahme geht mit den Schlussfolgerungen dieser Arbeit einher, dass aufgrund der beschädigten, nicht reversibel herstellbaren Chromatinregionen nach High-LET Bestrahlung die zelluläre Funktion langfristig nicht mehr funktioniert und die Zellen eventuell einer späten Apoptose unterliegen.

Allerdings stehen hier weiterführende Untersuchungen aus, um konkrete Aussagen darüber treffen zu können.

Strahleninduzierte DSBs stellen eine ernsthafte Bedrohung für die Genomstabilität und die Aufrechterhaltung der Chromatinorganisation dar. Die Veränderungen der Chromatinorganisation ist eine allgemeine Reaktion auf DNA-Schäden, allerdings ist es wichtig zu erwähnen, dass die Anzahl und Komplexität der Schäden in Bezug zur Dichte des Chromatins einen maßgeblichen Einfluss auf die Umstrukturierung des Chromatins zu scheinen haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass durch High-LET Bestrahlung induzierte Cluster-DNA-Schäden, die in räumlicher Nähe zueinander induziert wurden die unverzügliche und korrekte Wiederherstellung der ursprünglichen Chromatinstruktur verhindern und somit die epigenomische Stabilität beeinträchtigen könnten.



**Abbildung 46: DNA-Schadensantwort und Reparatur im Kontext der DCRs nach High-LET Bestrahlung**

Auf den Ergebnissen dieser Arbeit basierender Verlauf der DNA-Schadensantwort im Kontext der DCRs nach High-LET Bestrahlung. Bei der Ausbildung der DCRs schienen die Reparaturfaktoren 53BP1 und pATM ein initiales Signal zu vermitteln, welches daraufhin zu der Öffnung der Chromatinstruktur führte. Im weiteren Verlauf akkumulierten mehr dieser Proteine und die zahlreich, freigelegten DSBs wurden repariert, was an der steigenden Anzahl der Reparaturproteine pKu70, pKu80 und pDNA-PKcs zu erkennen war. Diese konzentrierten sich im weiteren Verlauf in den heterochromatischen Randbereichen der DCRs, ebenso, wie pKap-1, welches eine dekondensierte Chromatinstruktur vermittelte und sich die DCRs somit ausgeprägter darstellten. Nach der Reparatur der induzierten DSBs, die in unmittelbarer Nähe zueinander vorlagen, lösten sich die Reparaturfaktoren unter dem Versuch der Wiederherstellung der ursprünglichen Chromatinstruktur. Aufgrund der massiven Schädigung war dies wahrscheinlich jedoch nicht mehr möglich, was einen massiven Einfluss auf die Funktion und Integrität der Zelle hatte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Dichte sowie die Komplexität der DNA-Schäden wichtige Parameter für den Reparaturprozess darstellen. Hierbei besitzt die Chromatinstruktur sowie ihre strahleninduzierte Umstrukturierung einen größeren Einfluss, als bisher vermutet wurde, was die essentielle Funktion der Chromatinflexibilität hervorhebt.

Werden alle Erkenntnisse dieser Arbeit zusammenfassend betrachtet, kann die abschließende Aussage getroffen werden, dass komplexe DSBs nach High-LET Bestrahlung und die hieraus resultierenden lang anhaltenden Veränderungen in der Chromatinstruktur die strukturelle und funktionelle Organisation der Zelle maßgeblich beeinflussen. Die High-LET Bestrahlung scheint somit eine größere biologische Wirksamkeit gegenüber der Low-LET Bestrahlung zu besitzen.

Die klinische Anwendung der High-LET Bestrahlung stellt somit eine alternative und vorteilhafte Therapiemöglichkeit, vor allem bei speziellen Indikationen, dar. Neben der höheren RBW wird das Normalgewebe durch die zielgenauere Energiedeposition geschont, was besonders bei Tumoren in der Nähe von Risikoorganen (z.B. dem Hirnstamm) von Bedeutung ist. Allerdings ist die High-LET Bestrahlung aufgrund des höheren technischen Aufwandes nicht immer umsetzbar. Da sich einige Schwerionentherapiezentren noch in der Phase der klinischen Erprobung befinden, ist bisher noch kein weitläufiges Netzwerk für diese Behandlungsform vorhanden, was die Kapazitäten der Therapien begrenzt (Beckmann, 2015).

## 7. Ausblick

Trotz der sich in den letzten Jahren weiterentwickelten hochauflösenden Mikroskopie-Techniken gibt es immer noch eine Begrenzung in der Darstellung molekularer Abläufe. Jede Technik, sowohl die Darstellung mittels IFM, als auch TEM, hat seine Vorteile wie Nachteile. Die Verbindung von Techniken könnte daher weitere Einblicke, der bisher verborgen gebliebenen Abläufe geben und Interaktionen aufdecken. Die korrelative Licht-Elektronen Mikroskopie (*Correlative light-electron microscopy*, CLEM), als Verbindung der IFM und der TEM, könnte einen ersten Fortschritt darstellen.

Des Weiteren fehlt ein räumliches Verständnis der ablaufenden Vorgänge. Die 3D Rekonstruktion von Chromatinveränderungen im Verlauf der DNA-Schadensantwort und -Reparatur mit den visualisierten Reparaturproteinen würde die räumliche Verteilung der Proteine und dadurch das Verständnis dieser Vorgänge auf eine neue Stufe anheben.

Um die Bedeutung verschiedener Reparaturfaktoren genauer herausarbeiten zu können, könnten Untersuchungen an DNA-Reparatur-defizienten Zelllinien die Wichtigkeit verschiedener Reparaturfaktoren weiter beleuchten. Dabei könnte die Charakterisierung von Reparaturprozessen in Abhängigkeit von der zellspezifischen Chromatinstruktur im Verlauf des Zellzyklus einen weiteren Untersuchungsparameter darstellen.

Die Durchführung von Überlebensexperimenten nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten bei Normalgewebs-Zelllinien und/oder Tumor-Zelllinien könnten ebenfalls weiterführende Erkenntnisse zur Effektivität der Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten liefern.

## 8. Verzeichnisse

### 8.1 Literatur

1. Amaldi, U., & Kraft, G. 2005. Radiotherapy with beams of carbon ions. *Reports on Progress in Physics*, 68(8): 1861-1882.
2. Asaithamby, A., & Chen, D. J. 2011. Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation. *Mutat Res*, 711(1-2): 87-99.
3. Ataian, Y., & Krebs, J. E. 2006. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. *Biochem Cell Biol*, 84(4): 490-504.
4. Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., & Kouzarides, T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410(6824): 120-124.
5. Beckmann, I. A. 2015. *Strahlentherapie: Antworten, Hilfen, Perspektiven*: Stiftung Deutsche Krebshilfe.
6. Bird, A. W., Yu, D. Y., Pray-Grant, M. G., Qiu, Q., Harmon, K. E., Megee, P. C., Grant, P. A., Smith, M. M., & Christman, M. F. 2002. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature*, 419(6905): 411-415.
7. Brechner, E., Dinkelaker, B., & Dreesmann, D. 2003. *Kompaktlexikon der Biologie: Gesamtausgabe in drei Bänden*: Spektrum Akademischer Verlag.
8. Burgess, R. C., Burman, B., Kruhlak, M. J., & Misteli, T. 2014. Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. *Cell Rep*, 9(5): 1703-1717.
9. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 276(45): 42462-42467.
10. Cann, K. L., & Dellaire, G. 2011. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem Cell Biol*, 89(1): 45-60.
11. Cary, R. B., Peterson, S. R., Wang, J., Bear, D. G., Bradbury, E. M., & Chen, D. J. 1997. DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9): 4267-4272.
12. Chen, B. P., Uematsu, N., Kobayashi, J., Lerenthal, Y., Krempler, A., Yajima, H., Lobrich, M., Shiloh, Y., & Chen, D. J. 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(9): 6582-6587.
13. Cohen-Jonathan, E., Bernhard, E. J., & McKenna, W. G. 1999. How does radiation kill cells? *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(1): 77-83.
14. Costes, S. V., Ponomarev, A., Chen, J. L., Nguyen, D., Cucinotta, F. A., & Barcellos-Hoff, M. H. 2007. Image-based modeling reveals dynamic redistribution of DNA damage into nuclear subdomains. *PLoS Comput Biol*, 3(8): e155.
15. Cutnell, J. D., Johnson, K. W., Young, D., & Stadler, S. 2015. *Physics, 10th Edition*: Wiley.
16. Dabin, J., & Polo, S. E. 2017. Choreography of parental histones in damaged chromatin. *Nucleus*, 8(3): 255-260.
17. DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., & Chu, G. 2002. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J*, 21(12): 3192-3200.
18. Downs, J. A., Nussenzweig, M. C., & Nussenzweig, A. 2007. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature*, 447(7147): 951-958.
19. Eckert, R. 1998. *Sehen heißt wissen: das Rasterelektronenmikroskop im Fehleranalyselabor*. Kurz.
20. Elia, M. C., & Bradley, M. O. 1992. Influence of chromatin structure on the induction of DNA double strand breaks by ionizing radiation. *Cancer Res*, 52(6): 1580-1586.
21. Falk, M., Lukasova, E., Gabrielova, B., Ondrej, V., & Kozubek, S. 2007. Chromatin dynamics during DSB repair. *Biochim Biophys Acta*, 1773(10): 1534-1545.
22. Fischle, W. 2009. Tip60-ing the balance in DSB repair. *Nat Cell Biol*, 11(11): 1279-1281.
23. Fournier, C., & Taucher-Scholz, G. Radiation induced cell cycle arrest: an overview of specific effects following high-LET exposure. *Radiotherapy and Oncology*, 73: S119-S122.
24. Francia, S., Michelini, F., Saxena, A., Tang, D., de Hoon, M., Anelli, V., Mione, M., Carninci, P., & d'Adda di Fagagna, F. 2012. Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature*, 488(7410): 231-235.
25. Freifelder, D. 1965. Mechanism of inactivation of coliphage T7 by x-rays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 54(1): 128-134.

## 8. Verzeichnisse

26. Furgason, J. M., & Bahassi el, M. 2013. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacol Ther*, 137(3): 298-308.
27. Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119(3): 493-501.
28. Goodarzi, A. A. 2013. The Repair and Signaling Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Advances in Genetics*, v. 82: pp. 1-45-2013 v.2082.
29. Goodarzi, A. A., Jeggo, P., & Lobrich, M. 2010. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair (Amst)*, 9(12): 1273-1282.
30. Goodarzi, A. A., & Jeggo, P. A. 2009. 'A mover and a shaker': 53BP1 allows DNA doublestrand breaks a chance to dance and unite. *F1000 Biol Rep*, 1: 21.
31. Goodarzi, A. A., & Jeggo, P. A. 2012. The heterochromatic barrier to DNA double strand break repair: how to get the entry visa. *Int J Mol Sci*, 13(9): 11844-11860.
32. Goodarzi, A. A., Noon, A. T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lobrich, M., & Jeggo, P. A. 2008. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell*, 31(2): 167-177.
33. Goodarzi, A. A., Noon, A. T., & Jeggo, P. A. 2009. The impact of heterochromatin on DSB repair. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 3): 569-576.
34. Goodhead, D. T. 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol*, 65(1): 7-17.
35. Graewe, H. 1963. *Atomphysik: Grundlagen, Atomhülle, Atomkern. Ein Arbeitsbuch für Studium und Unterricht*. E. Dümmler.
36. Grellmann, W., Bierögel, C., Reincke, K. 2017. Lexikon Kunststoffprüfung und Diagnostik Version 6.0
37. Gunasekarana, V., Raj, G. V., & Chand, P. 2015. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *J Clin Diagn Res*, 9(3): GE01-05.
38. Gupta, A., Guerin-Peyrou, T. G., Sharma, G. G., Park, C., Agarwal, M., Ganju, R. K., Pandita, S., Choi, K., Sukumar, S., Pandita, R. K., Ludwig, T., & Pandita, T. K. 2008. The mammalian ortholog of Drosophila MOF that acetylates histone H4 lysine 16 is essential for embryogenesis and oncogenesis. *Mol Cell Biol*, 28(1): 397-409.
39. Gupta, A., Sharma, G. G., Young, C. S., Agarwal, M., Smith, E. R., Paull, T. T., Lucchesi, J. C., Khanna, K. K., Ludwig, T., & Pandita, T. K. 2005. Involvement of human MOF in ATM function. *Mol Cell Biol*, 25(12): 5292-5305.
40. Hada, M., & Georgakilas, A. G. 2008. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *J Radiat Res*, 49(3): 203-210.
41. Hagiwara, Y., Niimi, A., Isono, M., Yamauchi, M., Yasuhara, T., Limsirichaikul, S., Oike, T., Sato, H., Held, K. D., Nakano, T., & Shibata, A. 2017. 3D-structured illumination microscopy reveals clustered DNA double-strand break formation in widespread gammaH2AX foci after high LET heavy-ion particle radiation. *Oncotarget*, 8(65): 109370-109381.
42. Hall, E. J., & Giaccia, A. J. 2012. *Radiobiology for the Radiologist*. Wolters Kluwer Health.
43. Hansen, J. C. 2002. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31: 361-392.
44. Harrigan, J. A., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Dimitrova, D. S., Polo, S. E., Bradshaw, C. R., Fraser, P., & Jackson, S. P. 2011. Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *J Cell Biol*, 193(1): 97-108.
45. Hebbes, T. R., Thorne, A. W., & Crane-Robinson, C. 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J*, 7(5): 1395-1402.
46. Hinde, E., Kong, X. D., Yokomori, K., & Gratton, E. 2014. Chromatin Dynamics during DNA Repair Revealed by Pair Correlation Analysis of Molecular Flow in the Nucleus. *Biophysical Journal*, 107(1): 55-65.
47. Hoeijmakers, J. H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835): 366-374.
48. Jackson, S. P. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5): 687-696.
49. Jakob, B., Splinter, J., Conrad, S., Voss, K. O., Zink, D., Durante, M., Lobrich, M., & Taucher-Scholz, G. 2011. DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res*, 39(15): 6489-6499.
50. 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 U S A*, 106(9): 3172-3177.

## 8. Verzeichnisse

51. Jeggo, P. A. 1998. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res*, 150(5 Suppl): S80-91.
52. Jenuwein, T., & Allis, C. D. 2001. Translating the histone code. *Science*, 293(5532): 1074-1080.
53. Jezkova, L., Zadneprianetc, M., Kulikova, E., Smirnova, E., Bulanova, T., Depes, D., Falkova, I., Boreyko, A., Krasavin, E., Davidkova, M., Kozubek, S., Valentova, O., & Falk, M. 2018. Particles with similar LET values generate DNA breaks of different complexity and reparability: a high-resolution microscopy analysis of gammaH2AX/53BP1 foci. *Nanoscale*, 10(3): 1162-1179.
54. Kadhim, M. A. 2003. Role of genetic background in induced instability. *Oncogene*, 22(45): 6994-6999.
55. Kakarougkas, A., Downs, J. A., & Jeggo, P. A. 2015. The PBAF chromatin remodeling complex represses transcription and promotes rapid repair at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Oncol*, 2(1): e970072.
56. Kaplan, H. S. 1966. DNA-strand scission and loss of viability after x irradiation of normal and sensitized bacterial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55(6): 1442-1446.
57. Khanna, K. K., & Jackson, S. P. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, 27(3): 247-254.
58. Kiefer, J. 2013. *Biologische Strahlenwirkung: Eine Einführung in die Grundlagen von Strahlenschutz und Strahlenanwendung*: Birkhäuser Basel.
59. Koelzer, W. 2014. *Lexikon zur Kernenergie. Ausgabe Juli 2014*: KIT Scientific Publishing.
60. Kornberg, R. D., & Lorch, Y. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98(3): 285-294.
61. Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4): 693-705.
62. Krieger, H. 2010. *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*: Vieweg+Teubner Verlag.
63. Kruhlak, M. J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Muller, W. G., McNally, J. G., Bazett-Jones, D. P., & Nussenzweig, A. 2006. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*, 172(6): 823-834.
64. Lange, R. H., & Blödorn, J. 1981. *Das Elektronenmikroskop TEM+REM: Leitfaden für Biologen und Mediziner*. Thieme.
65. Li, X., Corsa, C. A., Pan, P. W., Wu, L., Ferguson, D., Yu, X., Min, J., & Dou, Y. 2010. MOF and H4 K16 acetylation play important roles in DNA damage repair by modulating recruitment of DNA damage repair protein Mdc1. *Mol Cell Biol*, 30(22): 5335-5347.
66. Lieber, M. R. 2008. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*, 283(1): 1-5.
67. Lieber, M. R. 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 79: 181-211.
68. Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., & Schwarz, K. 2003. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(9): 712-720.
69. Lindner, H. 1960. *Grundriss der Atom- und Kernphysik*.
70. Lobrich, M., & Jeggo, P. 2017. A Process of Resection-Dependent Nonhomologous End Joining Involving the Goddess Artemis. *Trends Biochem Sci*, 42(9): 690-701.
71. Lorat, Y. 2012. *Elektronenmikroskopischer Nachweis von DNA-Reparaturfaktoren des Nicht-Homologen End-Joining im Kontext des Chromatins*. Saarland University.
72. Lorat, Y., Brunner, C. U., Schanz, S., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., & Rube, C. E. 2015. Nanoscale analysis of clustered DNA damage after high-LET irradiation by quantitative electron microscopy--the heavy burden to repair. *DNA Repair (Amst)*, 28: 93-106.
73. Lorat, Y., Schanz, S., & Rube, C. E. 2016. Ultrastructural Insights into the Biological Significance of Persisting DNA Damage Foci after Low Doses of Ionizing Radiation. *Clin Cancer Res*, 22(21): 5300-5311.
74. Lorat, Y., Schanz, S., Schuler, N., Wennemuth, G., Rube, C., & Rube, C. E. 2012. Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS One*, 7(5): e38165.
75. Lorat, Y., Timm, S., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., & Rube, C. E. 2016. Clustered double-strand breaks in heterochromatin perturb DNA repair after high linear energy transfer irradiation. *Radiother Oncol*, 121(1): 154-161.
76. Lottspeich, F., Engels, J. W., & Solodkoff, Z. L. 2012. *Bioanalytik*: Spektrum Akademischer Verlag.
77. Louro, D., & Lesemann, D. E. 1984. Use of protein A-gold complex for specific labelling of antibodies bound to plant viruses. I. Viral antigens in suspensions. *J Virol Methods*, 9(2): 107-122.

## 8. Verzeichnisse

78. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, 389(6648): 251-260.
79. Mahaney, B. L., Meek, K., & Lees-Miller, S. P. 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. **Biochem J**, 417(3): 639-650.
80. Mannweiler, K., Hohenberg, H., Bohn, W., & Rutter, G. 1982. Protein-A gold particles as markers in replica immunocytochemistry: high resolution electron microscope investigations of plasma membrane surfaces. **J Microsc**, 126(Pt 2): 145-149.
81. Marnett, L. J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, 21(3): 361-370.
82. Mavragani, I. V., Nikitaki, Z., Souli, M. P., Aziz, A., Newsheer, S., Aziz, K., Rogakou, E., & Georgakilas, A. G. 2017. Complex DNA Damage: A Route to Radiation-Induced Genomic Instability and Carcinogenesis. **Cancers (Basel)**, 9(7).
83. Misri, S., Pandita, S., Kumar, R., & Pandita, T. K. 2008. Telomeres, histone code, and DNA damage response. **Cytogenet Genome Res**, 122(3-4): 297-307.
84. Moiseenko, V. V., Edwards, A. A., Nikjoo, H., & Prestwich, W. V. 1997. The influence of track structure on the understanding of relative biological effectiveness for induction of chromosomal exchanges in human lymphocytes. **Radiat Res**, 147(2): 208-214.
85. Moore, J. K., & Haber, J. E. 1996. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, 16(5): 2164-2173.
86. Müller, E. 1990. Jürgen Kiefer, Biologische Strahlenwirkung – Eine Einführung in die Grundlagen von Strahlenschutz und Strahlenanwendung (2., durchgesehene und ergänzte Auflage). XIX + 539 S., 237 Abb., 72 Tab. Basel – Boston – Berlin 1989. Birkhäuser Verlag. DM 68.00. ISBN: 3-7643-2266-7. **Journal of Basic Microbiology**, 30(4): 266-266.
87. Munro, T. R. 1970a. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. **Radiat Res**, 42(3): 451-470.
88. Munro, T. R. 1970b. The site of the target region for radiation-induced mitotic delay in cultured mammalian cells. **Radiat Res**, 44(3): 747-757.
89. Murga, M., Jaco, I., Fan, Y., Soria, R., Martinez-Pastor, B., Cuadrado, M., Yang, S. M., Blasco, M. A., Skoultchi, A. I., & Fernandez-Capetillo, O. 2007. Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. **J Cell Biol**, 178(7): 1101-1108.
90. Murray, J. M., Stiff, T., & Jeggo, P. A. 2012. DNA double-strand break repair within heterochromatic regions. **Biochem Soc Trans**, 40(1): 173-178.
91. Nair, N., Shoaib, M., & Sorensen, C. S. 2017. Chromatin Dynamics in Genome Stability: Roles in Suppressing Endogenous DNA Damage and Facilitating DNA Repair. **Int J Mol Sci**, 18(7).
92. Nakajima, N. I., Brunton, H., Watanabe, R., Shrikhande, A., Hirayama, R., Matsufuji, N., Fujimori, A., Murakami, T., Okayasu, R., Jeggo, P., & Shibata, A. 2013. Visualisation of gamma-H2AX foci caused by heavy ion particle traversal; distinction between core track versus non-track damage. **PLoS One**, 8(8): e70107.
93. Nikjoo, H., O'Neill, P., Goodhead, D. T., & Terrissol, M. 1997. Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. **Int J Radiat Biol**, 71(5): 467-483.
94. Noon, A. T., Shibata, A., Rief, N., Lobrich, M., Stewart, G. S., Jeggo, P. A., & Goodarzi, A. A. 2010. 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. **Nat Cell Biol**, 12(2): 177-184.
95. Panier, S., & Boulton, S. J. 2014. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15(1): 7-18.
96. Paques, F., & Haber, J. E. 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, 63(2): 349-404.
97. Pierce, B. A. 2017. **Genetics: A Conceptual Approach**: W H FREEMAN & Company.
98. Pilch, D. R., Sedelnikova, O. A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A., & Bonner, W. M. 2003. Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. **Biochem Cell Biol**, 81(3): 123-129.
99. Plattner, H., & Zingsheim, H. P. 1987. **Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie: ein kritischer Leitfaden zur biologischen Ultrastrukturforschung für Biologen und Mediziner ; 23 Tabellen**: Fischer.
100. Pouget, J. P., & Mather, S. J. 2001. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. **Eur J Nucl Med**, 28(4): 541-561.
101. Price, B. D., & D'Andrea, A. D. 2013. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. **Cell**, 152(6): 1344-1354.

## 8. Verzeichnisse

102. Radford, I. R., Murphy, T. K., Radley, J. M., & Ellis, S. L. 1994. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II. Apoptotic death is shown by all lines examined. *Int J Radiat Biol*, 65(2): 217-227.
103. Rea, S., Xouri, G., & Akhtar, A. 2007. Males absent on the first (MOF): from flies to humans. *Oncogene*, 26(37): 5385-5394.
104. Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., & Bonner, W. 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*, 12(2): 162-169.
105. Riballo, E., Woodbine, L., Stiff, T., Walker, S. A., Goodarzi, A. A., & Jeggo, P. A. 2009. XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res*, 37(2): 482-492.
106. Richter, E., & Feyerabend, T. 2013. *Grundlagen der Strahlentherapie*: Springer Berlin Heidelberg.
107. Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., & Bonner, W. M. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, 146(5): 905-916.
108. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273(10): 5858-5868.
109. Roos, N., & Morgan, A. J. 1990. *Cryopreparation of thin biological specimens for electron microscopy: methods and applications*: Oxford University Press.
110. Roth, J., Bendayan, M., & Orci, L. 1978. Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. *J Histochem Cytochem*, 26(12): 1074-1081.
111. Roth, J., & Binder, M. 1978. Coloidal gold, ferritin and peroxidase as markers for electron microscopic double labeling lectin techniques. *J Histochem Cytochem*, 26(3): 163-169.
112. Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H., & Loblrich, M. 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol*, 23(16): 5706-5715.
113. Rothkamm, K., & Loblrich, M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9): 5057-5062.
114. Rube, C. E., 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 (Amst)*, 10(4): 427-437.
115. Rupnik, A., Lowndes, N. F., & Grenon, M. 2010. MRN and the race to the break. *Chromosoma*, 119(2): 115-135.
116. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., & Linn, S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73: 39-85.
117. Schlaff, C. D., Krauze, A., Belard, A., O'Connell, J. J., & Camphausen, K. A. 2014. Bringing the heavy: carbon ion therapy in the radiobiological and clinical context. *Radiat Oncol*, 9(1): 88.
118. Schmitz, G. G., Walter, T., Seibl, R., & Kessler, C. 1991. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem*, 192(1): 222-231.
119. Schultz, L. B., Chehab, N. H., Malikzay, A., & Halazonetis, T. D. 2000. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*, 151(7): 1381-1390.
120. Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1): 67-75.
121. Seyffert, W. 2003. *Lehrbuch der Genetik*: Spektrum Akademischer Verlag.
122. Shiloh, Y. 2003a. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 3(3): 155-168.
123. Shiloh, Y. 2003b. ATM: ready, set, go. *Cell Cycle*, 2(2): 116-117.
124. Slater, M. 1993. Ultrastructural Double-Labeling Using Colloidal Gold. *Micron*, 24(6): 661-675.
125. Stanley L. Flegler, H., Karen L. Klomprens. 1995. *Elektronenmikroskopie: Grundlagen. Methoden. Anwendungen*: Spektrum Akademischer Verlag.
126. Steven, B. H., & Dwight, M. 1994. Body Composition: Research and Clinical Advances—1993 A.S.P.E.N. Research Workshop. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 18(2): 91-103.
127. Strahl, B. D., & Allis, C. D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765): 41-45.
128. Sulli, G., Di Micco, R., & d'Adda di Fagagna, F. 2012. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer*, 12(10): 709-720.
129. Takata, M., Sasaki, M. S., 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(18): 5497-5508.

## 8. Verzeichnisse

130. Thoma, F., Koller, T., & Klug, A. 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol*, 83(2 Pt 1): 403-427.
131. Urushibara, A., Shikazono, N., Watanabe, R., Fujii, K., O'Neill, P., & Yokoya, A. 2006. DNA damage induced by the direct effect of He ion particles. *Radiat Prot Dosimetry*, 122(1-4): 163-165.
132. van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H., & Kanaar, R. 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, 2(3): 196-206.
133. von Heimendahl, M. 1970. *Einführung in die Elektronenmikroskopie: Verfahren zur Untersuchung von Werkstoffen und anderen Festkörpern*: Vieweg.
134. Wang, G. G., Allis, C. D., & Chi, P. 2007a. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med*, 13(9): 363-372.
135. Wang, G. G., Allis, C. D., & Chi, P. 2007b. Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med*, 13(9): 373-380.
136. Wannemacher, M., Wenz, F., & Debus, J. 2013. *Strahlentherapie*: Springer Berlin Heidelberg.
137. Ward, I. M., & Chen, J. 2001. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, 276(51): 47759-47762.
138. Ward, J. F. 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.
139. Ward, J. F. 1995. Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat Res*, 142(3): 362-368.
140. Ward, J. F., Blakely, W. F., & Joner, E. I. 1985. Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. *Radiat Res*, 103(3): 383-392.
141. Weterings, E., Verkaik, N. S., Bruggenwirth, H. T., Hoeijmakers, J. H., & van Gent, D. C. 2003. The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res*, 31(24): 7238-7246.
142. Woodcock, C. L., Frado, L. L., & Rattner, J. B. 1984. The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J Cell Biol*, 99(1 Pt 1): 42-52.
143. Wyllie, A. H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756): 555-556.
144. Xu, Y., & Price, B. D. 2011. Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle*, 10(2): 261-267.
145. Zhou, B. B., & Elledge, S. J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811): 433-439.
146. Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D. C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., & Shiloh, Y. 2006. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol*, 8(8): 870-876.

## 8.2 Abbildungen

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: DNA-Schäden nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten ..... | 3  |
| Abbildung 2: Aufbau und Struktur des Chromatins .....                                    | 6  |
| Abbildung 3: Euchromatin und Heterochromatin.....  | 8  |
| Abbildung 4: Schema der DNA-Schadensantwort .....  | 10 |
| Abbildung 5: Signalkaskade zur Dekondensation des HCs .....                              | 12 |
| Abbildung 6: Nicht-Homologe-End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ) .....                          | 13 |
| Abbildung 7: Licht- und Elektronenmikroskop im Vergleich .....                           | 18 |
| Abbildung 8: Monolayer versus Pellet .....   | 26 |
| Abbildung 9: Arbeitsablauf.....  | 27 |
| Abbildung 10: Bestrahlungsübersicht.....   | 29 |
| Abbildung 11: Bestrahlungsplanung.....   | 30 |
| Abbildung 12: Probenvorbereitung für die TEM .....                                       | 33 |
| Abbildung 13: Sektionierung am Ultramikrotom .....                                       | 36 |
| Abbildung 14: Chromatindichte im TEM.....  | 40 |
| Abbildung 15: Markierung der Gold-Beads und -Cluster .....                               | 41 |
| Abbildung 16: Histonmodifikationen in der IFM.....                                       | 43 |
| Abbildung 17: Chromatinstruktur und Histonmodifikationen visualisiert mittels TEM .....  | 45 |
| Abbildung 18: Chromatinstruktur nach Low-LET Bestrahlung .....                           | 46 |

## 8. Verzeichnisse

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 19: Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von H4K16ac nach Low-LET Bestrahlung.....  | 47 |
| Abbildung 20: Dekondensierte Chromatin-Regionen (DCRs) nach High-LET Bestrahlung .....   | 49 |
| Abbildung 21: Prinzip der quantitativen Erfassung und Vermessung der DCRs .....  | 50 |
| Abbildung 22: Quantitative Charakterisierung der DCRs nach High-LET Bestrahlung in vertikaler Ausrichtung.....   | 52 |
| Abbildung 23: Die Histonmodifikation H4K16ac nach High-LET Bestrahlung .....   | 53 |
| Abbildung 24: Die Histonmodifikationen H3K9me3 und H3K27me3 nach High-LET Bestrahlung.....   | 54 |
| Abbildung 25: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von $\gamma$ H2AX nach Low-LET Bestrahlung .....   | 55 |
| Abbildung 26: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von 53BP1 und pATM nach Low-LET Bestrahlung.....   | 57 |
| Abbildung 27: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von pKap-1 und pATM nach Low-LET Bestrahlung.....  | 59 |
| Abbildung 28: Ultrastrukturelle Darstellung der Proteinverteilung von pATM mit 53BP1 und mit pKap-1 nach Low-LET Bestrahlung .....                                   | 61 |
| Abbildung 29: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von 53BP1 nach High-LET Bestrahlung mit unterschiedlichen Ausrichtungen.....                               | 63 |
| Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Visualisierung von 53BP1 und pATM nach High-LET Bestrahlung im Kontext der DCRs.....  | 64 |
| Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Visualisierung pKap-1, pATM, 53BP1 und pKu70 im Kontext der DCRs.....   | 65 |
| Abbildung 32: Immunfluoreszenzmikroskopische sowie elektronenmikroskopische Visualisierung von 53BP1 mit pKu70 nach Low-LET Bestrahlung .....                        | 67 |
| Abbildung 33: Immunfluoreszenzmikroskopische und elektronenmikroskopische Visualisierung von 53BP1 mit pKu80 sowie pDNA-PKcs nach Low-LET Bestrahlung .....          | 68 |
| Abbildung 34: Immunfluoreszenzmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchung von 53BP1 und pKu80 nach High-LET Bestrahlung in vertikaler Ausrichtung ..... | 70 |
| Abbildung 35: Cluster-DNA-Schäden nach High-LET Bestrahlung in horizontaler Ausrichtung .....  | 72 |
| Abbildung 36: Immunfluoreszenzmikroskopische und elektronenmikroskopische Visualisierung von pKu70 und pKu80 nach High-LET Bestrahlung .....                         | 73 |
| Abbildung 37: Elektronenmikroskopische Visualisierung von TUNEL mit pKu80 nach Low- und High-LET Bestrahlung.....  | 75 |
| Abbildung 38: Quantitativer Vergleich von 53BP1 nach Low- und High-LET Bestrahlung.....  | 77 |
| Abbildung 39: Quantitativer Vergleich von pKu70 nach Low- und High-LET Bestrahlung .....   | 79 |
| Abbildung 40: Quantitativer Vergleich von pKu80 nach Low- und High-LET Bestrahlung .....   | 81 |
| Abbildung 41: Quantitativer Vergleich von pDNA-PKcs nach Low- und High-LET Bestrahlung .....   | 83 |
| Abbildung 42: Das DNA-Schadensmuster nach High-LET Bestrahlung in horizontaler Ausrichtung... ..   | 85 |
| Abbildung 43: Das Prinzip der Lokalisationsmessungen .....   | 87 |
| Abbildung 44: Quantitative Auswertung der Lokalisationsmessungen von pKu80 und pDNA-PKcs nach High-LET Bestrahlung .....   | 88 |
| Abbildung 45: DNA-Schadensantwort und Reparatur im Kontext der Chromatinstruktur nach Low-LET Bestrahlung.....   | 94 |
| Abbildung 46: DNA-Schadensantwort und Reparatur im Kontext der DCRs nach High-LET Bestrahlung .....  | 99 |

### 8.3 Tabellen

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien.....   | 20 |
| Tabelle 2: Lösungen und Puffer .....   | 21 |
| Tabelle 3: Antikörper .....  | 22 |
| Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....  | 24 |
| Tabelle 5: Geräte und Software .....   | 24 |
| Tabelle 6: Parameter der Quantifizierung am TEM.....   | 39 |
| Tabelle 7: Gesamtbeadzahlen der Quantifizierung von pKu70 und pKu80 nach Low-LET Bestrahlung ..... | 80 |
| Tabelle 8: Prozentwerte der Lokalisationsmessungen für pKu80 und pDNA-PKcs.....                    | 88 |

## 8.4 Abkürzungen

| <b>Abkürzung</b>                | <b>Erläuterung</b>  | <b>Explanation</b>                                    |
|---------------------------------|---|---|
| 53BP1                           | p53-bindendes Protein 1   |   |
| A. dest/ H <sub>2</sub> O dest. | destilliertes Wasser (lat.: <i>Aqua destillata</i> )                              |   |
| AK                              | Antikörper  |   |
| AS                              | Aminosäuren   |   |
| ATM                             |   | <i>Ataxia telangiectasia mutated protein</i>          |
| ATP                             | Adenosintriphosphat   |   |
| ATR                             |   | <i>ATM and Rad3-related protein</i>                   |
| bp                              | Basenpaaren   |   |
| BRCA1/BRCA2                     |   | <i>breast cancer susceptibility gene 1/2</i>          |
| BrdU                            | Bromdesoxyuridin  |   |
| BSA                             | bovines Serumalbumin  |   |
| BSA-c <sup>TM</sup>             | acetyliertes Rinderserumalbumin   |   |
| bzw.                            | beziehungsweise   |   |
| C                               | Kohlenstoff (lat.: <i>carbo</i> )   |   |
| ca.                             | circa   |   |
| CK2                             | Proteinkinase 2   |   |
| CLEM                            | Korrelative Licht-Elektronen-Mikroskopie  | <i>Correlative light-electron microscopy</i>          |
| d.h.                            | das heißt   |   |
| DAPI                            | 4',6-Diamidino-2-phenylindole   |   |
| DCR/ DCRs                       | dekondensierte Chromatin-Region/en  | <i>decondensed chromatin region/s</i>                 |
| ds                              | zurückgelegter Weg  |   |
| dE                              | Energieverlust, abgegebene und absorbierte Energie                                |   |
| DNA                             | Desoxyribonukleinsäure  | <i>Deoxyribonucleic acid,</i>                         |
| DNA-PK                          |   | <i>DNA-dependent protein kinase</i>                   |
| DNA-PKcs                        | DNA-abhängige katalytische Proteinkinase-Untereinheit                             | <i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i> |
| DSB/s                           | Doppelstrangbruch/Doppelstrangbrüche  |   |
| E                               | Energie   |   |
| e <sup>-</sup>                  | Elektronen  |   |
| EC                              | Euchromatin   |   |
| RNF8                            |   | <i>E3 ubiquitin-protein ligase</i>                    |
| ESB/s                           | Einzelstrangbruch/Einzelstrangbrüche  |   |
| et al.                          | und andere, lat. <i>et alii (maskulin), et aliae (feminin), et alia (neutrum)</i> |   |
| EtOH                            | Ethanol   |   |
| G0                              | Ruhephase (engl.: <i>gap</i> )  |   |
| G1                              | postmitotische Phase im Zellzyklus, Ruhephase (engl.: <i>gap</i> ),               |   |
| G2                              | prämitotische Phase im Zellzyklus, Ruhephase (engl.: <i>gap</i> )                 |   |
| GA                              | Glutaraldehyd   |   |
| Gy                              | Gray  |   |
| h                               | Stunde  | <i>hour</i>   |
| H3K27me3                        | dreifach methyliertes Histon H3 am Lysin 27                                       |   |
| H3K9ac                          | acetyliertes Histon H3 am Lysin 9   |   |
| H3K9me3                         | dreifach methyliertes Histon H3 am Lysin 9  |   |
| H4K16ac                         | acetyliertes Histon 4 am Lysin 16   |   |
| H4K20me2                        | zweifach methyliertes Histon H4 am Lysin 20                                       |   |
| HC                              | Heterochromatin   |   |
| High-LET                        | hoher linearer Energietransfer  |   |

## 8. Verzeichnisse

|                  |  |   |
|------------------|--|---|
| HP1              | Heterochromatin Protein 1  |   |
| HR               | homologe Rekombination   | <i>homologous recombination</i>                                 |
| IFM              | Immunfluoreszenzmikroskopie  |   |
| IR               | ionisierende Strahlung   | <i>ionic radiation</i>  |
| Kap-1            |  | <i>Transcriptionsrepressor<br/>Krüppel-associated protein 1</i> |
| Ku70 (XRCC6)     | Reparaturprotein Ku70: 70 kDa Untereinheit von Ku70 Antigen                  | <i>70 kDa subunit of Ku antigen</i>                             |
| Ku80 (XRCC6)     | Reparaturprotein Ku80: 86 kDa Untereinheit von Ku80 Antigen                  | <i>86 kDa subunit of Ku antigen</i>                             |
| LaB <sub>6</sub> | Kathode, bestehend aus LaB <sub>6</sub> (lat.: <i>lanthanum hexaboride</i> ) |   |
| LET              | Linearer Energietransfer   |   |
| Low-LET          | niedriger linearer Energietransfer   |   |
| MDC1             |  | <i>Mediator of DNA damage checkpoint 1</i>                      |
| min              | Minute   |   |
| Mre11            |  | <i>Meiotic recombination protein 11</i>                         |
| MRN-Komplex      | Komplex von Reparaturproteinen, bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1          |   |
| N                | Stickstoff (lat.: <i>nitrogenium</i> )                                       |   |
| Nbs1             |  | <i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>                             |
| NHEJ             | Nicht-Homologe-End-zu-End-Verknüpfung  | <i>Non-homologous-end-joining</i>                               |
| O                | Sauerstoff (grie.: <i>oxygenium</i> )  |   |
| OH               | Hydroxylgruppe   |   |
| p                | phosphoryliert   |   |
| PBS              |  |   |
| PFA              | Paraformaldehyd  |   |
| PIKKs            | Phosphatidyl-inositol-3 Kinase-ähnlichen Kinasen                             |   |
| Rad50            | DNA Reparaturprotein RAD50   | <i>DNA repair protein RAD50</i>                                 |
| Rad52            | DNA Reparaturprotein RAD52   | <i>DNA repair protein RAD52</i>                                 |
| Rad54            | DNA Reparaturprotein RAD54   | <i>DNA repair and recombination protein RAD54</i>               |
| RBW              | relative biologischen Wirksamkeit  |   |
| RPA              | Replikationsprotein A  |   |
| RT               | Raumtemperatur   |   |
| S                | Synthesephase im Zellzyklus  |   |
| TEM              | Transmissionselektronenmikroskopie   |   |
| Tip60            |  | <i>60 kDa Tat-interactive protein</i>                           |
| TUNEL            | TdT-vermittelte dUTP-Nick-End-Markierung                                     | <i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>                      |
| ü. N.            | über Nacht   |   |
| γH2AX            | Histonvariante H2AX phosphoryliert am Serin139                               |   |

Des Weiteren wurden gängige SI Einheiten verwendet.

## 9. Veröffentlichungen

### **Publikationen**

1. **Timm, S.**, Jakob, B. & Rube, C. E. 2018. *Decondensed chromatin regions after high-LET irradiation by charged-particles – The hard way between chromatin reorganization and repair. Oncotarget oder Nanoscale, (planned).*
2. **Timm, S.**, Lorat, Y., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., & Rube, C. E. 2018. *Clustered DNA lesions after charged-particle irradiation prevent efficient restoration of the chromatin architecture. Green Journal, (under review).*
3. Schuler, N., **Timm, S.**, & Rube, C. E. 2017. *Hair follicle stem cell faith is dependent on chromatin remodeling capacity following low-dose radiation. Stem Cells, 36(4):574-588.*
4. Lorat, Y., **Timm, S.**, Jakob, B., Taucher-Scholz, G., & Rube, C. E. 2016. *Clustered double-strand breaks in heterochromatin perturb DNA repair after high linear energy transfer irradiation. Radiotherapy Oncology, 121(1): 154-161.*

### **Vorträge**

1. Tagung der Biological Radiation Research – GBS und der European Radiation Research Society ERRS, 2017 in Essen, Clustering of double-strand breaks following high-LET irradiation perturbs DNA repair and is associated with long-lasting chromatin decondensation
2. Tagung der Biological Radiation Research - GBS, 2015 in Dresden, Clustered DNA lesions induced by high-LET radiation quantified by transmission electron microscopy

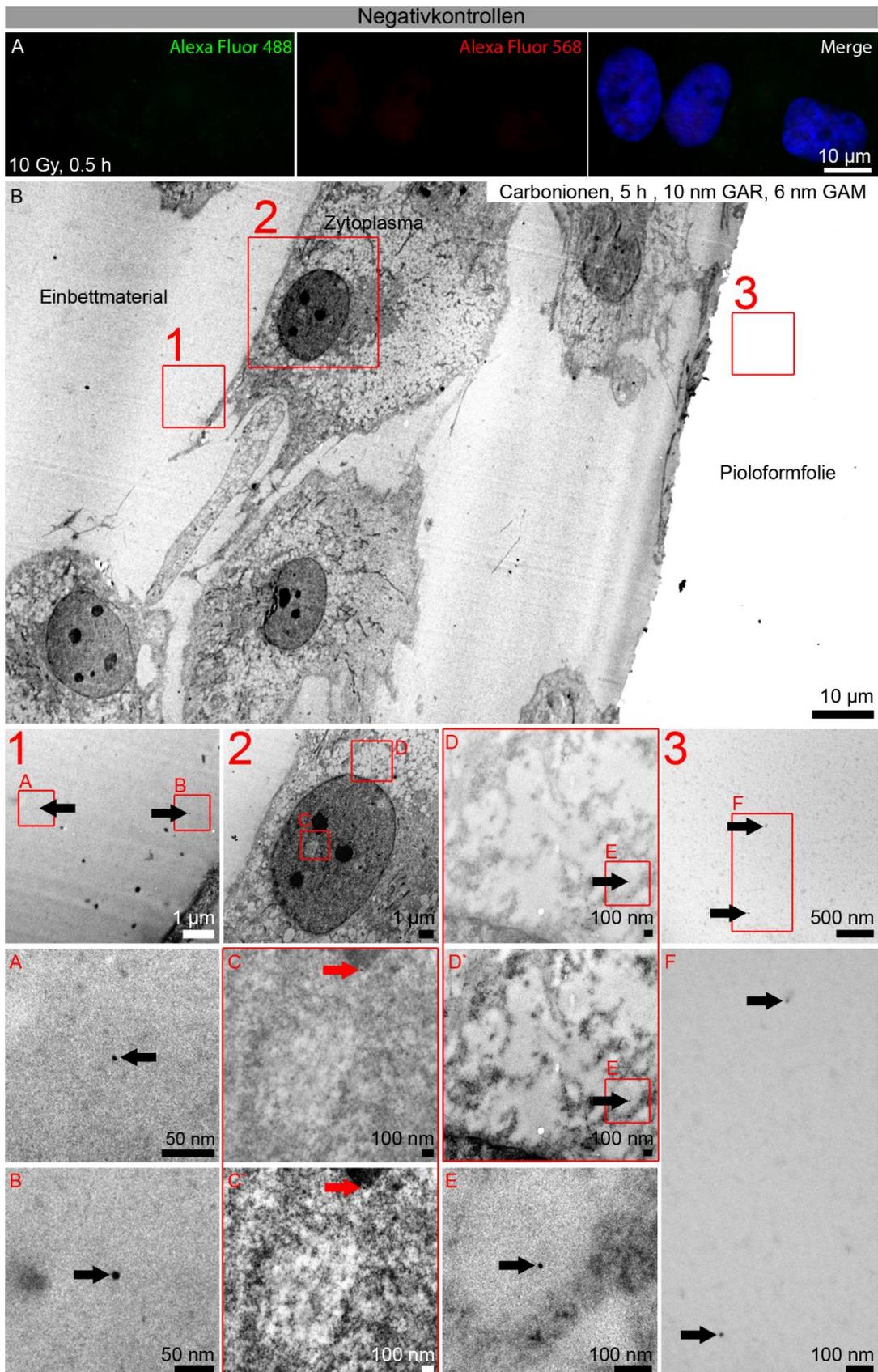
### **Poster**

1. Tagung der Radiation Research Society - RRS, 2017 in Mexiko, Clustered DNA lesions after charged-particle irradiation prevent efficient restoration of the chromatin architecture
2. Tagung der Biological Radiation Research - GBS, 2016 in Erlangen, Clustered double-strand breaks in heterochromatin perturb DNA repair after high linear energy transfer irradiation

### **Auszeichnungen/Stipendien**

1. Reisestipendium der Biological Radiation Research – GBS, 2017 (Essen)

# 10. Anhang



## Anhang 1: Exemplarische Bilder von Negativkontrollen

A: Darstellung der sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488, grün und Alexa Fluor 568, rot) und dem Farbstoff DAPI (blau) bei den HSF1 Zellen nach 10 Gy, 0.5 h mittels IFM. Sowohl das Signal für Alexa

## 10. Anhang

Fluor 488 als auch Alexa Fluor 568 war gar nicht oder nur sehr schwach detektierbar. B: Elektronenmikroskopische Darstellung der sekundären Antikörper (10 nm (Ziege-Anti-Kaninchen GAR) und 6 nm (Ziege-Anti-Maus GAM)) an verschiedenen Stellen (dem Einbettmaterial (1), Zelle sowie Zytoplasma (2) und der Pioloformfolie (3)) in den HSF1 Zellen 5 h nach High-LET Bestrahlung mit Carbonionen. Die jeweiligen Bereiche wurden vergrößert dargestellt und die Beads mit Pfeilen markiert. Es konnten nur sehr vereinzelt Beads beobachtet werden.

## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt der Leiterin des Labors für molekulare Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Homburg/Saar Frau Prof. Dr. med. Claudia E. Rube für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und der ständigen Förderung dieses Projektes durch ihre stetige Unterstützung und konstruktive Kritik. Des Weiteren gilt mein Dank Frau Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier für die Diskussionsbereitschaft, die Korrektur und Begutachtung der Doktorarbeit.

Außerdem gilt den Mitarbeitern des Labors mein Dank für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere bedanke ich mich bei...

...Frau Dr. rer. med. Yvonne Lorat für die weiterführende Einarbeitung rund ums TEM, die Hilfe bei jeglichen Fragen, ob beruflich oder privat und die wunderbaren, freundschaftlichen Gespräche bei so vielen Gelegenheiten.

...Frau Dr. rer. nat. Nadine Schuler für die Einarbeitung in die Zellkultur und das FACs, die vielen fachlichen Gespräche, die Anregungen und neue gedankliche Ansatzpunkte gaben, trotz, dass der morgendliche Kaffee noch nicht wirkte und vor allem auch für den freundschaftlichen, privaten Kontakt.

Dank euch fühle ich mich in der Ferne zu Hause. Außerdem gebührt euch beiden ein großes Dankeschön für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Auch den anderen Mädels möchte ich herzlich danken...

...Frau Daniela Jung möchte ich für die Hilfe bei einigen Experimenten und der damit einhergehenden Entlastung für mich danken sowie für die guten Gespräche beim morgendlichen Kaffee oder gemeinsamen Mittagessen.

...Frau Anna Isermann danke ich für die Unterstützung in so manchem Experiment und die zahlreichen Englischkorrekturen sowie die angenehmen Gespräche.

...Frau Zoé Schmal auch dir einen großen Dank für die Hilfe im Labor und die zahlreichen Unterhaltungen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Kathrin Förderer, die mich während ihrer Zeit im Labor der AG Rube ebenfalls sehr hilfreich unterstützt hat.

Insbesondere danke ich auch Herrn Norbert Pütz, Frau Birgit Leis und Frau Belinda König aus der Abteilung Elektronenmikroskopie für die Unterstützung. Vielen Dank für die Hilfsbereitschaft.

Ebenfalls möchte ich den Mitarbeitern Herrn Dr. rer. nat. Burkhard Jakob, Frau Prof. Dr. rer. nat. Gisela Taucher-Scholz und Frau Gudrun Becker des GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung für die tolle und produktive Kooperation rund um die High-LET Bestrahlung danken.

Nicht zu vergessen sind meine lieben Freunde und meine Familie, allen voran meine weltbesten Eltern, die mich alle so manches Mal wieder aufgebaut haben, wenn einfach Nichts mehr funktioniert hat. Danke, dass ihr an mich geglaubt habt, wenn ich es nicht getan habe.

Zu guter Letzt geht mein wichtigster Dank an dich Benni, danke für deine Unterstützung und das Verständnis, dass du mir entgegengebracht hast. Die Zeit war und ist nicht immer leicht, aber du machst sie mir umso schöner. Danke!!!