

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

Strahleninduzierte DNA-Schäden und deren Reparatur in Lymphozyten von Kindern mit malignen Erkrankungen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Humanmedizin

Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes

2018

vorgelegt von:

Dominik Betten

geb. am: 10.01.1988 in Bergisch Gladbach

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. C. E. Rube

2. Berichterstatter/in:

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	3
2	EINLEITUNG	4
2.1	Entstehung maligner Erkrankungen im Kindesalter und Epidemiologie	4
2.2	Grundlagen der Tumorentstehung	5
2.3	Ionisierende Strahlung	7
2.4	Direkte und indirekte Strahlenwirkung	9
2.5	Reparaturmechanismen für DNA-Doppelstrangbrüche	10
2.5.1	Homologe Rekombination	11
2.5.2	Nicht homologe End-zu-End Verknüpfung (NHEJ)	11
2.6	Reparaturfaktoren und deren Nachweis mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	12
2.6.1	Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM)	12
2.6.2	Genauere Beschreibung von Reparaturproteinen	13
2.6.3	γ H2AX	14
2.6.4	Ataxia-telangiectasia mutated kinase	15
2.6.5	53BP1	16
2.7	Defiziente DNA-Reparatur am Beispiel der Ataxia Telangiectasia	16
2.8	Lymphozyten als geeignetes Untersuchungsmaterial	18
2.9	Ziel der Arbeit	18

3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Material	19
3.2	Patientenkollektiv	22
3.3	Aufbereitung der Blutproben und Kryokonservierung	22
3.4	Bestrahlung der Lymphozyten	23
3.5	Immunfluoreszenz-Färbung	25
3.6	Quantifizierung der Foci	26
3.7	Statistische Auswertung	27
4	ERGEBNISSE	28
4.1	Verteilung maligner Erkrankungen in dem untersuchten Patientenkollektiv	28
4.2	Reparaturproteine mittels IFM zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Strahlenexposition	31
4.3	Verteilung der Foci innerhalb der Probe	32
4.4	DNA-Reparaturkinetik von Kindern mit Tumorerkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern	32
4.4.1	Quantitative Erfassung der DSB-Reparaturkinetik mittels ATM-Immunfluoreszenzmarkierung	33
4.4.2	53BP1-Reparaturkinetik	34
4.4.3	γ H2AX-Reparaturkinetik	35
4.5	Vergleich der unterschiedlichen Antikörperfärbungen	36
5	DISKUSSION	39
5.1	Kritische Betrachtung der eigenen Untersuchungen	39
5.1.1	Vergleich der DSB-Reparaturkinetik von Kindern mit malignen Erkrankungen mit der nicht bestrahlten Kontrollgruppe	39
5.1.2	Wahl der Reparaturzeitpunkte und Strahlendosen	42

5.1.3	Quantifizierung der Foci	43
5.1.4	Betrachtung von Unterschieden der Foci-Detektion	45
5.2	Vergleich der Ergebnisse mit denen aus der Literatur	46
5.3	Schlussfolgerungen	49
6	VERZEICHNISSE	50
6.1	Literaturverzeichnis	50
6.2	Abbildungsverzeichnis	58
6.3	Tabellenverzeichnis	59
7	PUBLIKATION / DANKSAGUNG	60
7.1	Publikation	60
7.2	Danksagung	60
8	LEBENS LAUF	61

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

53BP1	p53-binding protein 1
AT	Ataxia teleangiectasia
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BRCA1/2	Breast cancer susceptibility protein-1/2
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase
DSB	Doppelstrangbruch
H2AX	Variante des Histons H2
γ H2AX	phosphorylierte Form (Serin 139) des Histons H2AX
Gy	Gray (Energiedosis)
HR	Homologe Rekombination
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
LET	linearer Energietransfer
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint protein 1
MeV	Megaelektronenvolt
MRN-Komplex	Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex
Myc	Myc-Gen
NHEJ	non-homologous end-joining; nicht-homologe End-zu-End Verknüpfung
p53	Tumorsuppressorprotein p53

PBS	Phosphate buffered saline (Puffer)
PBS/NS	Puffer mit Normalserum
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RAS	Rat-sarcoma-Onkogen
RAD 50/51/52/54	Reparaturproteine
RB	Retinoblastom-Tumor-Suppressor-Gen
RIF	radiation induced foci, Strahleninduzierter Foci
PIKK	Phosphoinositol-Kinase
RPA	Replikationsprotein A
rpm	Revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCID	Radiosensitive-severe combined immune-deficiency
SSB	Single strand break; Einzelstrangbrüche
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF- β	Transforming Growth Factor β ; Transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor-A
V(D)J	V-variable, D-diversifying, J-joining
XRCC4	X-ray-complementing chinese hamster gene 4

Ferner wurden die üblichen Abkürzungen des SI-Einheiten-Systems verwendet.

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Ziel: Das Ziel dieser Arbeit war es, die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) bei Kindern mit malignen Erkrankungen zu untersuchen, um mögliche Defizite in der DNA-Reparaturkapazität zu erkennen und nachzuweisen. Hierbei bildete die Untersuchung von DNA-Doppelstrangbrüchen den Schwerpunkt, da diese auf den Organismus ein potentiell hohes Risiko zur Krebsentstehung besitzen. Um die DNA-Reparaturkapazität von Zellen durch den spezifischen Nachweis nicht reparierter DNA-Doppelstrangbrüche analysieren zu können, wurde als Nachweismethode die gut etablierte Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) angewendet. Diese Methode ermöglicht die Analyse von DNA-Reparaturfaktoren, die in großer Anzahl in unmittelbarer Umgebung des Bruches rekrutiert werden. Ferner wurden verschiedene Reparaturproteine mittels IFM nachgewiesen und hinsichtlich ihrer Sensitivität untersucht.

Material und Methoden: Es wurden Lymphozyten von 45 Kindern mit malignen Erkrankungen im Alter von einem bis 19 Jahren untersucht. Zusätzlich wurden Lymphozyten von 5 gesunden Kontrollkinder als Vergleich hinzugezogen. Die aus den Blutproben der Kinder isolierten Lymphozyten wurden ex-vivo mit 1 oder 2 Gray mit einer einzelnen Fraktion homogen bestrahlt. Im Anschluss an eine immunologische Markierung der Reparaturfaktoren (ATM, 53BP1, γ H2AX) wurden 15 Minuten, 8 Stunden und 24 Stunden nach der Bestrahlung die Anzahl vorhandener Foci mittels Immunfluoreszenzmikroskopie quantitativ erfasst. Es wurde die Darstellung durch die Markierung von ATM, 53BP1 und γ H2AX miteinander sowie die DSB-Reparaturkinetiken von Kindern mit malignen Erkrankungen mit denen von gesunden Kindern verglichen.

Ergebnisse: Es zeigten sich Hinweise auf Defizite in der DNA-Reparaturkinetik von erkrankten Kindern gegenüber gesunden Kontrollkindern. Insbesondere in der Einzelbetrachtung der untersuchten Proben fielen deutliche Unterschiede auf. Die drei betrachteten Reparaturproteine zeigten einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der DNA-Reparatur. Es konnten geringe Unterschiede in der Anzahl der Foci bei ATM und 53BP1 gegenüber der γ H2AX Antikörperfärbung gezeigt werden.

Schlussfolgerung: Die in dieser Arbeit untersuchten Kinder mit malignen Erkrankungen zeigten zum Teil Einschränkungen in der DSB-Reparaturkapazität die im oberen

Toleranzbereich lagen. Es liegt die Vermutung nahe, dass Kinder mit malignen Erkrankungen Einschränkungen in der Reparatur von DSB aufweisen können. Dabei scheint die Aufbewahrung der Zellen durch Kryokonservierung möglicherweise einen selektiven Einfluss auf die isolierten Lymphozyten auszuüben. Die markierten Reparaturproteine stellten im Vergleich miteinander den Verlauf der DNA-Reparaturkinetik zuverlässig dar.

1.2 Abstract

DNA-Damage repair in lymphocytes of children treated for pediatric malignancies

Purpose: The origin of pediatric malignancies in healthy children remains largely unclear. The purpose of the current doctoral study is the investigation of the DNA repair capacity in children diagnosed with cancer, and the identification of potential deficiencies in the repair of DNA. The study focused on DNA double strand-breaks (DSBs) due to their potential high risk of carcinogenesis. To analyse the DNA repair capacity of DSBs the research used the immunofluorescence analysis to quantify DNA damage response proteins by light microscopy (foci). This allows to analyze the kinetic of DNA damage response proteins that are located nearby the DSB.

Material and Methods: Kinetics of DSB repair in lymphocytes of 45 children with histologically confirmed tumors or leukemias was compared to that of 5 healthy children. In order to generate DSBs in the DNA, isolated lymphocytes were irradiated with single doses of 1 or 2 Gray. The repair proteins Ataxia teleangiectasia mutated (ATM), p53-binding protein 1 (53BP1) and γ H2AX were visualized as foci. This was followed by counting the foci by means after 15 minutes, 8 hours and 24 hours. After that the study compared the mean of foci of the children with pediatric malignancies with the healthy children and we compared the repair kinetics of the three different colorings of antibodies.

Results: The test results showed slight differences in mean DSB repair capacity between children with pediatric malignancies and healthy control-children. Three different colorings of antibodies broadly reflected the same temporal course of DNA repair kinetics; however, slight differences could be noticed in the absolute rate of double strand breaks in ATM and 53 BP1 towards the γ H2AX coloring of antibodies.

Conclusion: Some of the children affected by malignant diseases who were subject of this study still showed impaired DSB repair kinetics within the upper tolerance levels. This leads to the conclusion that children with pediatric malignancies can show signs of impaired kinetics of DSB repair. Here, the keeping of cells using cryopreservation appears to have a potential selective influence on the isolated lymphocytes. The comparison of the marked repair proteins illustrates the DNA repair kinetics with sufficient reliability.

2 Einleitung

2.1 Entstehung maligner Erkrankungen im Kindesalter und Epidemiologie

Die Ätiologie maligner Erkrankungen bei Kindern unterscheidet sich insbesondere durch die Prädisposition von Noxen im Kindesalter im Vergleich zu Erwachsenen. Während bei Erwachsenen Risikofaktoren wie Alter, Zigarettenrauch, Alkohol und Ernährung zur Entstehung bösartiger Tumore beitragen, spielen diese Faktoren bei Kindern eine untergeordnete Rolle (ERBAR, 2002).

Da Kinder im Vergleich zu Erwachsenen aufgrund ihres Alters eine geringere Exposition gegenüber Noxen aufweisen, ist die Ursache für Tumorerkrankungen im Kindesalter häufig genetisch bedingt. Exogene Einflüsse, wie ionisierende Strahlung und Chemikalien, scheinen nur zu einem sehr geringen Teil an der Ätiologie maligner Krankheiten im Kindesalter beteiligt zu sein (ROBERT- KOCH INSTITUT, 2008).

Es sind eine Vielzahl von genetischen Veränderungen bekannt, die mit Tumorerkrankungen im Kindesalter assoziiert sind. Liegt die Veränderung in einem Gen, das für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) verantwortlich ist, können bereits in jungen Jahren Krankheitsbilder wie Ataxia telangiectasia oder die Fanconi Anämie entstehen, die unter anderem auch durch vermehrte Krebsentstehung gekennzeichnet sind (GORTNER L, 2012). Diese Patienten reagieren im Vergleich zu gesunden gleichaltrigen Kindern deutlich sensitiver auf ionisierende Strahlung, da die Einschränkung in der DNA-Reparaturkapazität vermutlich zu Akkumulation von DSB und somit schneller zu Mutationen führt (CUNLIFT et al., 1975; RÜBE CE, 2009).

Klinisch zeigen die Patienten die unter Ataxia telangiectasia leiden eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder. So entwickeln die meisten Patienten bei dieser autosomal rezessiv vererbten Erkrankung bereits im Kleinkindalter eine Kleinhirnatrophie, welche zu Ataxien führt. Es bilden sich häufig Teleangiectasien im Bereich der Bindehäute und des Gesichts (BODER, SEDGWICK, 1958; CHUN, GATTI, 2004; SEDGWICK, BODER, 1960). Außerdem sind die Patienten aufgrund einer eingeschränkten Immunkompetenz anfälliger für Infekte insbesondere der Atemwege. In ihrer Entwicklung sind die Patienten häufig geistig und körperlich retardiert (BODER, SEDGWICK, 1958).

Auffällig ist außerdem, dass die Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung maligner Tumorerkrankungen circa 100 mal höher ist als gegenüber gleichaltrigen und gesunden Kindern (MORRELL et al., 1986). Dabei treten Leukämien vom ALL-Typ und Lymphome vom Non-Hodgkin Typ besonders häufig auf (SANDOVAL, SWIFT, 2003). Die Prävalenz mit der Ataxia Telangiectasia Auftritt ist, abhängig von der Herkunft, unterschiedlich hoch und wird mit 1:40000 bis 1:100000 angegeben (SWIFT et al., 1986).

In Deutschland beträgt die Anzahl der neudiagnostizierten Krebserkrankungen bei Kindern bis zum 15. Lebensjahr ca. 1800 pro Jahr (KINDERKREBSREGISTER, 2016). Die Wahrscheinlichkeit eines Neugeborenen an einer malignen Erkrankung zu erkranken liegt bei 0,2%, dabei erkranken Jungen in etwa 1,2mal häufiger als Mädchen. Im Jahresbericht von 2016 erkrankten vor dem fünften Lebensjahr 782 Kinder, und vom fünften bis zum 15.ten Lebensjahr 977 Kinder (KINDERKREBSREGISTER, 2016).

Mit gut einem Drittel aller malignen Erkrankungen im Kindesalter sind die Leukämien (30,4%) am häufigsten vertreten; die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste Form der Leukämie im Kindesalter (KINDERKREBSREGISTER, 2016). Die Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) folgen mit 23,6%; hierbei tritt das Astrozytom am häufigsten auf. Weitere maligne Erkrankungen im Kindesalter sind Lymphome (14,3%), periphere Nervenzelltumore (5,7%), Weichteilsarkome (5,9%), Nierentumore (4,7%), Knochentumore (5,2%) und Keimzelltumore (4,1%) (KINDERKREBSREGISTER, 2016).

Im Allgemeinen gilt, dass Kinder mit malignen Erkrankungen eine bessere Prognose haben als Erwachsene. Die fünfzehn Jahresüberlebensrate für Krebserkrankungen vor dem 15. Lebensjahr liegt bei 82%, beim Vorliegen einer lymphatischen Leukämie sogar bei 90%. Die beste Prognose hat das Retinoblastom und das Hodgkin Lymphom (5 Jahresüberlebensrate 99%) (KINDERKREBSREGISTER, 2016).

2.2 Grundlagen der Tumorentstehung

Bei der Entstehung von Tumorerkrankungen liegen häufig Defizite in der adäquaten Reparatur von Zellschäden während des Zellzyklus (Abbildung 1) oder der Einleitung des programmierten Zelltods, Apoptose, vor.

Der Zellzyklus kann in die Mitosephase (M-Phase) und die Interphase unterteilt werden, die wiederum aus der G₁-Phase, der Synthese-Phase (S-Phase) und der G₂-Phase besteht. In der G₁-Phase bereitet sich die Zelle auf die Replikation der DNA vor, welche in der S-Phase stattfindet. In der sich anschließenden G₂-Phase regeneriert sich die Zelle bis zum Eintritt in die M-Phase, in der sich die Zelle dann teilt (ALBERTS B, 2005).

Am Übergang von G₁ zur S-Phase befindet sich ein Kontrollpunkt, der den Zellzyklus in der G₁-Phase stoppen und über komplexe Signalkaskaden für eine ausreichende Vorbereitung auf die bevorstehende S-Phase sorgen kann. Durch die Aktivierung spezifischer Cyclin-abhängiger Kinasen (Cdk) kann die Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus übergehen. Bei Unregelmäßigkeiten wird die Aktivierung der Cdk verhindert und somit der Zellzyklus in der jeweiligen Phase angehalten, bis eine korrekte Fortsetzung gewährleistet ist. Zwischen G₂ und M-Phase liegt ein weiterer Kontrollpunkt, an dem die Überprüfung auf vollständige Duplizierung und Intaktheit der DNA stattfindet. Anschließend tritt die Zelle in die M-Phase ein, in der die Teilung der Zelle zu zwei Tochterzellen erfolgt (ALBERTS B, 2005; PAWLIK, KEYOMARSI, 2004).

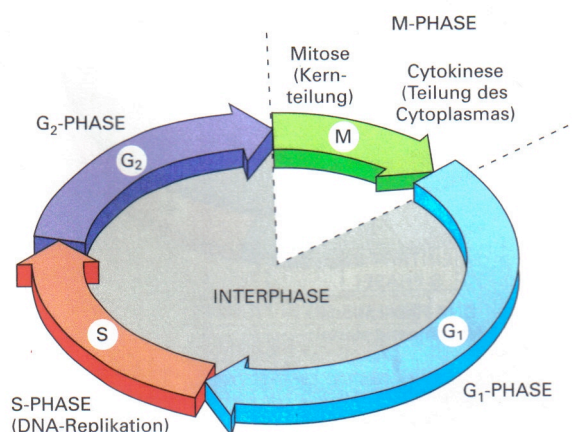


Abbildung 1: Der Zellzyklus (ALBERTS B, 2005).

Bei der Zellteilung einer gesunden Zelle wird die DNA während der DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus kopiert um sie der Tochterzelle weiterzugeben. Dabei kann es zu Fehlern kommen, welche sich mit der Zeit akkumulieren und somit die Wahrscheinlichkeit zur Entartung einer gesunden Zelle erhöht (ALBERTS B, 2005).

Die DNA kann außerdem durch externe Noxen beschädigt werden, welches ebenfalls die Wahrscheinlichkeit zur Entartung erhöht. Dabei ist die Zelle während der späten G2 und M-Phase vermutlich besonders vulnerabel gegenüber äußeren Einflüssen wie beispielsweise ionisierender Strahlung (PAWLIK, KEYOMARSI, 2004).

Während des Zellzyklus sorgen Kontrollpunkte dafür, dass fehlerhaft duplizierte DNA erkannt und repariert oder der Zelltod durch Apoptose eingeleitet wird. Meist führt die Schädigung von DNA zu einem Zellzyklusstopp, indem unter anderem das Tumorsupressorprotein 53 (p53) hochreguliert wird. Dies induziert eine vermehrte Transkription von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitorproteinen (Cdk-Inhibitorprotein) und hindert die Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus einzutreten. Ist der DNA-Schaden irreparabel, so kann die Zelle mittels komplexer Kaskaden die Apoptose einleiten und somit verhindern, dass die geschädigte DNA an die Tochterzelle weitergegeben wird (ALBERTS B, 2005; WANG et al., 2002). Dabei spielt p53 insbesondere für den intrinsischen Weg der Apoptose eine wichtige Rolle, bei dem, über die Aktivierung von Mitgliedern der Bcl-2 Familie, Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird und so weitere pro-apoptische Faktoren aktiviert werden (ADAMS, CORY, 2007; CORY, ADAMS, 2002; ELMORE, 2007).

Mutationen im p53-Gen können unter anderem zu einer Störung und insbesondere zum Verlust von Kontrollmechanismen während des Zellzyklus führen. Dies hat zur Folge, dass die Zelle unkontrolliert proliferiert, DNA-Schäden akkumulieren und letztendlich durch Entartung auch Krebs entstehen kann (SCHMOLL HJ, 2006). In über 50% aller Krebsarten konnte seit Entdeckung des p53-Gens Verluste der Funktion von p53 nachgewiesen werden (OZAKI, NAKAGAWARA, 2011).

2.3 Ionisierende Strahlung

Durch Strahlung wird Energie auf Materie transferiert. Von ionisierender Strahlung (ionizing, IR) wird gesprochen, wenn die transportierte Energie ausreichend ist, um aus den elektrisch neutralen Atomen dieser Materie positiv und negativ geladene Teilchen zu erzeugen (Ionisation). Eine Einteilung der unterschiedlichen Strahlungen erfolgt aufgrund ihrer Bestandteile (Photonen, Teilchen etc.), Quelle (Kernzerfallsprozess, technische Erzeugung etc.) und Wirkung (Eindringtiefe, Ionisationsdichte etc.). Elektromagnetische Strahlung besteht aus Lichtteilchen (Photonen) die keine Masse besitzen, weshalb ausschließlich

Energie transportiert wird. Abhängig von ihrer Erzeugungsart und Wellenlänge wird in elektromagnetische Strahlung (technische Erzeugung in einer Röntgenröhre) und γ -Strahlung (Freisetzung bei radioaktiven Kernzerfallsprozessen) unterteilt (HARTEN, 2011).

Beim Durchdringen von Materie übertragen die Photonen ihre Energie auf die Elektronen der Materie (Ionisationsereignisse). In Abhängigkeit von der Entfernung dieser Ionisationsereignisse und deren Verteilung wird zwischen locker und dicht ionisierender Strahlung unterschieden. Röntgenstrahlung induziert entlang ihrer Wegstrecke gleichmäßig verteilte und weit voneinander entfernte Ionisationsereignisse, weshalb sie der locker ionisierenden Strahlung zugeordnet wird.

Wie viel Energie pro Wegstrecke entlang der Bahn abgegeben wird, beschreibt der Lineare Energietransfer (LET). Der LET ist hierbei nicht konstant, sondern ein indirektes Maß für die Zahl der Ionisationen pro Strecke, der sich bedingt durch die abnehmende Energie und Geschwindigkeit der Photonen/ Teilchen mit deren Eindringtiefe verändert. Die Photonen der Röntgenstrahlung besitzen einen niedrigen LET, da sie ihre Energie durch die räumlich weit entfernten Ionisationsereignisse nur langsam verlieren, weshalb sie tief in die Materie bzw. das Gewebe eindringen können (INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION, MEASUREMENTS, 2011).

In Abhängigkeit von der Anfangsenergie der Photonen werden in der Materie durch die Ionisationsereignisse Sekundärelektronen auf unterschiedliche Weise erzeugt: durch den Photoeffekt (niederenergetische Photonen, 10-100 keV) und durch den Comptoneffekt (höherenergetische Photonen, mehrere MeV).

Beim Photoeffekt trifft ein niederenergetisches Photon auf ein Atomkern-nahes Elektron, welches eine hohe Bindungsenergie besitzt. Das Photon überträgt deshalb seine gesamte Energie auf das Elektron, setzt dieses frei (Sekundärelektron), und wird selbst ausgelöscht (HARMS V, 2006).

Der Compton-Effekt tritt beim Zusammenstoß eines hochenergetischen Photons mit einem Atomkern-fernen Elektron auf. Dabei wird die Energie des Photons zum Teil auf das Elektron übertragen. Wegen der Entfernung des Elektrons zum Atomkern besitzt dieses nur eine niedrige Bindungsenergie, wodurch das Elektron aus seiner Bahn freigesetzt wird. Das Photon selbst setzt seinen Weg mit abgelenkter Richtung und größerer Wellenlänge fort und kann weiter ionisieren (HARMS V, 2006). Diese Art von Energieübertragung tritt

überwiegend während einer Bestrahlung mit ionisierender Strahlung, wie sie während einer Strahlentherapie stattfindet, auf.

2.4 Direkte und indirekte Strahlenwirkung

Es wird zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung unterschieden, welche beide zu einer DNA-Schädigung führen können. Beim direkten Strahleneffekt (Abbildung 2) wird eine Schädigung durch Sekundärelektronen, die beim Zusammenstoß eines hochenergetischen Photons mit einem Atomkern-fernen Elektron entstehen, hervorgerufen (HARMS V, 2006). Sie beruht auf dem Absorptions- und dem Compton-Effekt der Röntgenstrahlung auf Materie (HARMS V, 2006). Lösen sich dabei die Verbindungen im Phosphodiestergerüst der DNA auf, führt dies zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) und DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB). Schätzungsweise 30% der durch Röntgen- und γ -Strahlung verursachten DNA-Schäden sind auf diesen Mechanismus zurückzuführen (CHAPMAN et al., 1973; VAN DER SCHANS et al., 1973).

Beim indirekten Strahleneffekt trifft das Sekundärelektron auf ein H_2O -Wassermolekül und überträgt seine Energie, was zur Radiolyse des Wassers führt. Hierdurch werden Ionen, Radikale und Peroxide erzeugt. Radikale sind sehr reaktiv und können maximal 10 nm Wegstrecke zurücklegen. Peroxide hingegen entstehen vermehrt, wenn molekularer Sauerstoff in der Umgebung vorhanden ist und sind selbst keine Radikale. Sie können längere Wegstrecken vom Entstehungsort bis zur DNA zurücklegen und radikalisieren die DNA-Bruchenden durch H^+ -Abstraktion. Diese Brüche können nur sehr schwer repariert werden (ALBERTS B, 2005; CHAPMAN et al., 1973; JEGGO P, 2009; ZEECK A, 2005).

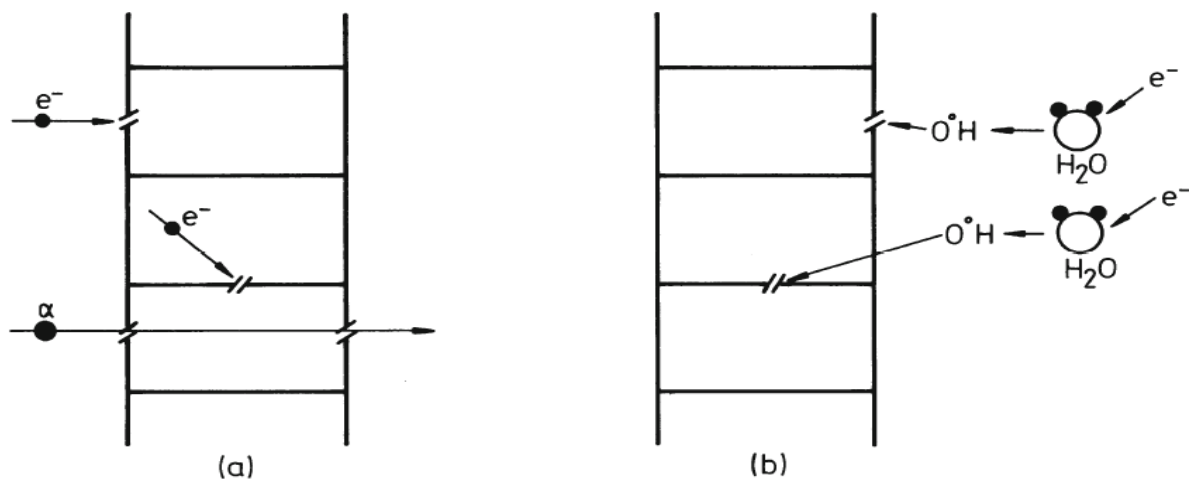


Abbildung 2: Schematische Darstellung der direkten (a) und der indirekten (b) Strahlenwirkung auf die DNA (KRIEGER H, 2009).

2.5 Reparaturmechanismen für DNA-Doppelstrangbrüche

Ionisierende Strahlung verursacht eine Vielzahl unterschiedlicher DNA-Schäden. Die schwerwiegendsten Schäden sind hierbei die DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs), da diese unrepariert den Zelltod bedeuten können. Bei der Reparatur von DSBs kann zwischen zwei Reparaturwegen, der homologen Rekombination (HR) und der nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ) unterschieden werden (Abbildung 3).

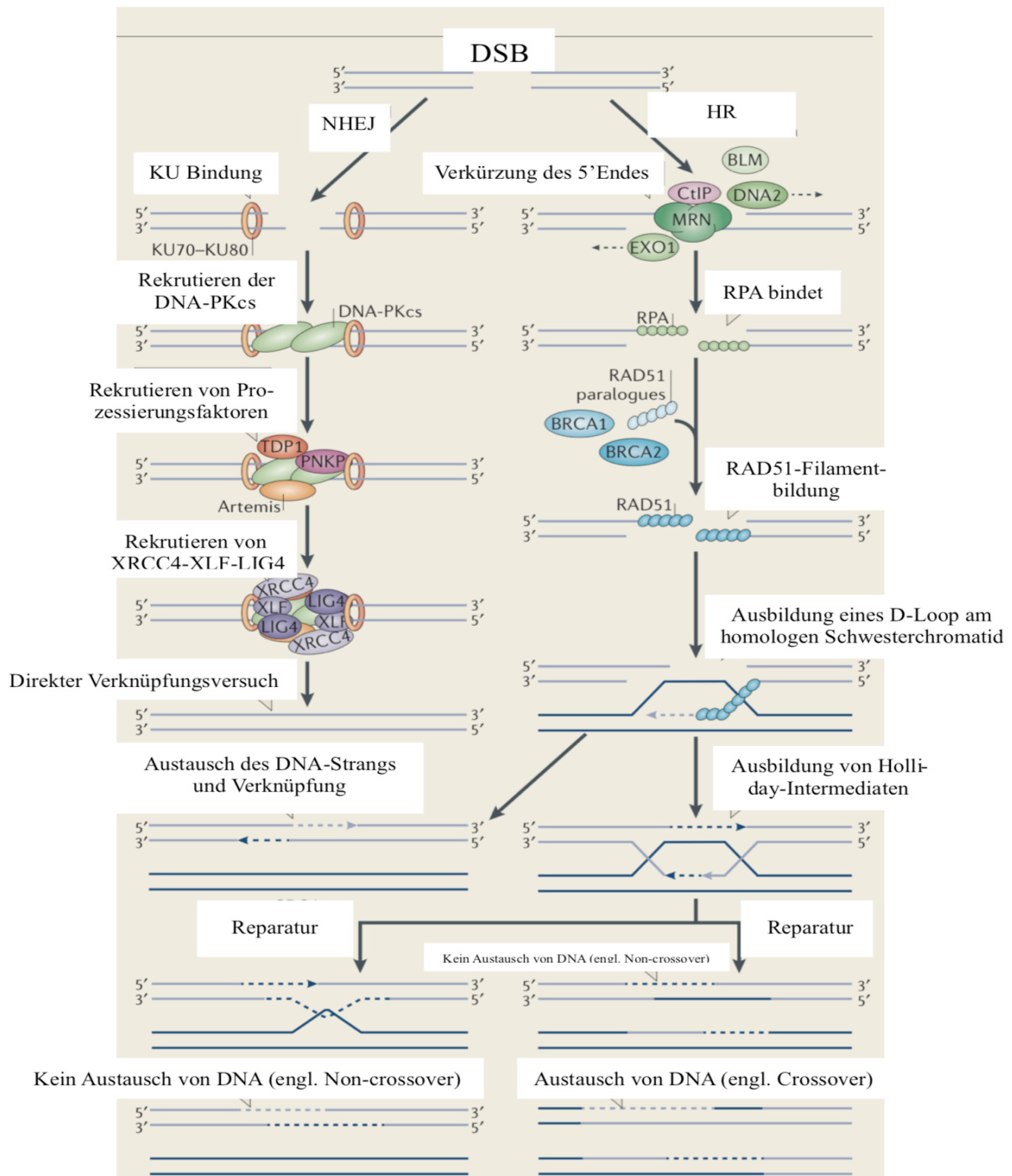


Abbildung 3: Model der Reparatur von DSBs mittels NHEJ (links) und HR (rechts) (PANIER, BOULTON, 2014).

2.5.1 Homologe Rekombination

Durch einen Vergleich mit dem intakten und sequenzhomologen Bereich des Schwesterchromatids wird durch die Homologe Rekombination (HR) eine präzise und fehlerfreie Reparatur des DSBs ermöglicht. Da für diesen Reparaturweg das Vorhandensein des Schwesterchromatids als „Kopiervorlage“ essentiell ist, kann er nur in der späten S- und der G2-Phase stattfinden.

Direkt nach der Induktion eines DSBs wird dieser durch Sensorproteine, dem Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex (MRN-Komplex) erkannt. Dieser vermittelt die Prozessierung der Bruchenden, wodurch einzelsträngige 3'-Überhänge entstehen, an die das Replikationsprotein A (RPA) zum Schutz der freien Enden bindet. Das RPA an den einzelsträngigen Überhängen wird durch BRCA1 und BRCA2 (breast cancer susceptibility gene 1/2) ersetzt und bildet mithilfe von RAD51 ein Nukleoproteinfilament (RICHARDSON, 2005; SONG, SUNG, 2000; TING, LEE, 2004; YANG et al., 2002). Nun erfolgen durch die Rad52-Epistasgruppe und Rad54 eine Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Suche nach der homologen Sequenz des Schwesterchromatids und die anschließende Stranginvasion (BAUMANN et al., 1996; GUPTA et al., 1997; MOYNAHAN, JASIN, 2010). Dabei wird eine D-Schleife gebildet. Hierdurch und unter Bildung von Holliday-Intermediaten (x-förmige Strukturen, holliday junction) ist sowohl die Synthese des eingedrungenen Stranges sowie die am 3'-Ende des nicht-invasiven Stranges möglich (Abbildung 3). Die entstandene Kreuzungsstelle der Stränge (strand migration) wandert während des Reparaturprozesses bis die Trennung der Strukturen erfolgt. Der synthetisierte Strang wird von der Kopiervorlage gelöst und die entstandenen Lücken durch Ligase I verbunden (BARNES et al., 1992; GOETZ et al., 2005).

Da bei der HR eine möglichst exakte Rekonstruktion der Bruchstelle erfolgt, gehen in der Regel keine Nukleotidsequenzen und somit keine Geninformationen verloren (ALBERTS B, 2005).

2.5.2 Nicht-homologe End-zu-End Verknüpfung (NHEJ)

Die NHEJ ist ein schnell ablaufender Prozess der freie DSB-Bruch-Enden direkt miteinander verbindet (LIEBER et al., 2003). Da kein Schwesterchromatid als Vorlage notwendig ist, kann NHEJ in jeder Phase des Zellzyklus ablaufen (BURMA et al., 2006; ROTHKAMM et al., 2003; ROTHKAMM, LOBRICH, 2003) insbesondere auch in der G0/G1-Phase (MOORE, HABER, 1996; TAKATA et al., 1998).

Die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), die sich aus der regulatorischen Untereinheit Ku70, Ku80 und der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs sowie XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex zusammensetzt, sind die Kernkomponenten des NHEJ (JACKSON, 2002; JEGGO, 1998). Direkt nach der Detektion eines DSBs bindet das Ku70/Ku80-Heterodimer (Ku-Komplex) selektiv an die freien Bruchenden und stabilisiert diese.

An den Ku-Komplex können sich nun weitere Reparaturenzyme anlagern. Durch die Rekrutierung der DNA-PKcs wird das aktive DNA-PK-Holoenzym gebildet. DNA-PK führt die beiden DNA-Enden aneinander und rekrutiert durch Phosphorylierung weitere Reparaturproteine, wie Artemis und XRCC4 (Abbildung 3) (KOIKE M, 2011; MARI et al., 2006).

Beim NHEJ werden die DSB-Bruchenden ohne Zuhilfenahme eines homologen Doppelstranges zusammengefügt. Dadurch kann es an den reparierten Genabschnitten zu Insertionen oder Deletionen von Nukleotiden kommen. Die Fehlerrate beträgt dabei 10^{-3} (PARDO B, 2009).

2.6 Reparaturfaktoren und deren Nachweis mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

2.6.1 Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM)

Mit Hilfe der IFM können DNA-Reparaturfaktoren die in unmittelbarer Nähe eines DSBs akkumulieren dargestellt werden. Hieraus lassen sich Rückschlüsse über Anzahl und Kinetik von DSBs ziehen. Dabei erfolgt der Nachweis von Proteinen über verschiedene Einzelschritte. Über eine Antigen-Antikörper-Reaktion bindet ein primärer Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Protein. Dabei begünstigt die hohe Affinität des primären Antikörpers ein sicheres und schnelles Anlagern. Anschließend erfolgt der spezifische Nachweis des Primärantikörpers durch einen Fluorchrom-gekoppelten Sekundärantikörper und die Darstellung des Sekundärantikörpers durch Fluoreszenz (Signalverstärkung). Das Fluorchrom wird durch eine Lichtquelle mit geeigneter Wellenlänge im Mikroskop angeregt, wobei der Nachweis des Antikörper-gebundenen Reparaturfaktors visuell durch die fluoreszierenden, fokalen Strukturen, auch „Foci“ (radiation induced foci, RIF) genannt, erfolgt (ROGAKOU et al., 1999).

Mithilfe von Primärantikörpern unterschiedlicher Spezifität in Kombination mit Sekundärantikörpern, deren Fluorochrom sich anhand der Emissionswellenlänge unterscheidet (=unterschiedliche Fluoreszenzfarbe) ist es möglich zwei unterschiedliche Reparaturfaktoren in einer Probe nachzuweisen. Mittels solch einer Doppelmarkierung kann beispielsweise überprüft werden, ob zwei unterschiedliche Reparaturproteine am gleichen Ort nachweisbar sind (= Kollokalisierung).

Zur Untersuchung der DNA-Reparatur mittels IFM wird oftmals die Histonvariante H2AX verwendet, die nach dem Auftreten eines DSBs innerhalb von Sekunden und über mehrere Megabasenpaare an Ser139 phosphoryliert wird. Diese wird dann als γ H2AX bezeichnet. In der Literatur wird umfangreich beschrieben, dass die Anzahl an γ H2AX-Foci mit der applizierten Strahlendosis korreliert und mit zunehmender Reparaturzeit sich die Anzahl an Foci wieder vermindert (ROTHKAMM, LOBRICH, 2003). In Untersuchungen mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und neutralen Comet-Assay konnten ebenfalls DSBs dargestellt werden (MIRZAYANS et al., 2006; ROTHKAMM, LOBRICH, 2003; SEDELNIKOVA et al., 2002). Jedoch sind für eine DSB-Reparatur-Analyse mittels dieser Nachweismethode teilweise sehr hohe Strahlendosen (bis zu 100 Gy) erforderlich. Die Quantifizierung von Foci im Zellkern kann mittels IFM hingegen nach Applikation von Dosen bis zu 2 Gy erfolgen.

2.6.2 Genauere Beschreibung von Reparaturproteinen

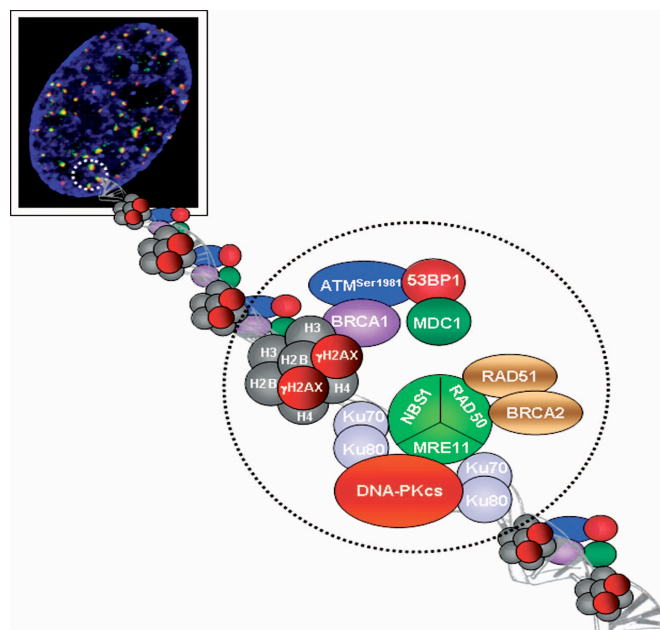


Abbildung 4: Reparaturproteine (γ H2AX und 53BP1) wurden in dem abgebildeten Fibroblast mittels Antikörper markiert und durch IFM visualisiert (BHOGAL N et al., 2009).

Werden einzelne Reparaturproteine mit Antikörpern markiert, so können diese unter dem Fluoreszenzmikroskop als Foci visualisiert und quantifiziert werden. Die in Abbildung 4 (eckiger Rahmen, oben) exemplarisch mittels IFM dargestellte Zelle (Fibroblast) zeigt nach der Markierung der Reparaturfaktoren γ H2AX und 53BP1 strahleninduzierte Foci (BHOGAL N et al., 2009). Das darunter gezeigte Modell verdeutlicht die große Zahl der verschiedenen Proteine, die an der Reparatur eines DSBs beteiligt sind. Es wurden sowohl Proteine die beim NHEJ als auch bei der HR nachgewiesen werden konnten dargestellt, wobei das Augenmerk für diese Arbeit insbesondere bei ATM, γ H2AX und 53BP1 liegt. Direkt am DSB stabilisieren beim NHEJ die Kernkomponenten Ku70, Ku80 und DNA-PKcs die Bruchenden und verhindern zusätzlich das Auseinanderdriften bis zur Religation (Kapitel 2.5.2).

Bei der HR wird ebenfalls ATM rekrutiert und eine komplexe Signalkaskade verschiedener Reparaturproteine wie Rad51, BRCA2 und dem MRN-Komplex aktiviert (Abbildung 4, ATM phosphoryliert am Ser1981) (Kapitel 2.5.1) (BHOGAL N et al., 2009).

2.6.3 γ H2AX

Histonproteine sorgen für die strukturelle Organisation von DNA, so dass diese eng verpackt als Chromatin im Zellkern vorliegt. Die DNA wird dabei um ein Histonprotein, bestehend aus je zwei Histonmolekülen H2A, H2B, H3 und H4 gewunden. Dabei werden 146 Nukleotidpaare, bestehend aus Phosphat, Zucker und einer Base, in 1,65 Windungen um das Histonoktamer aufgewickelt. Zusammen bilden Histone und DNA das Chromatin, welches in Euchromatin und Heterochromatin vorliegen kann. Während das Euchromatin eine aufgelockerte Form darstellt und eine hohe Genaktivität aufweist, ist das Heterochromatin stark kondensiert und beinhaltet Gene, die wenig abgelesen werden (ALBERTS B, 2005).

In circa 20% der Fälle ist das H2A durch die Variante H2AX ersetzt, welche ein zusätzliches Carboxyl-Ende besitzt (REDON C, 2002). Diese hoch konservierte Aminosäuresequenz besteht aus den Aminosäuren Serin, Glutamin und Glutaminsäure und wird auch als SQE-Motiv bezeichnet (MANNIRONI C, 1989). Bei der Induktion eines DSB wird das Histon H2AX frühzeitig am Serin 139 phosphoryliert und dann als Histonmodifikation γ H2AX bezeichnet. Die Phosphorylierung erstreckt sich über 1-2 Megabasenbaare und ermöglicht mit Hilfe der Immunfluoreszenz eine indirekte Darstellung von DSBs (ROGAKOU et al., 1999). Somit sind ebenfalls Rückschlüsse auf die Reparaturkinetik von DSBs nach IR möglich (ROTHKAMM, LOBRICH, 2003).

Frühestens drei Minuten nach Bestrahlung kann γ H2AX mittels IFM als Foci detektiert werden. Die maximale Anzahl kann 30 min nach Bestrahlung nachgewiesen werden (STASZEWSKI O, 2008). Daher wird häufig der erste Untersuchungszeitpunkt, die sogenannte Induktion, 15 min oder 30 min nach Bestrahlung gewählt, um die maximale Foci-Anzahl zu betrachten. Während der Reparatur akkumulieren weitere Proteine im direkten Umfeld des DSBs. Eine Kolokalisation und Interaktion mit dem Protein 53BP1 konnte durch Doppelmarkierungen beider Reparaturfaktoren nachgewiesen werden (WARD IM, 2003).

2.6.4 Ataxia-telangiectasia mutated kinase

Die Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) Kinase ist ein Enzym, welches entscheidenden Einfluss auf die Reparatur von DSBs hat, und unter anderem im Zellzyklus, während der Apoptose und bei der Regulierung von Genen nachgewiesen werden konnte (KURZ EU, 2004).

ATM gehört zur Gruppe der Phosphoinositol-Kinasen (PIKK), deren katalytische Untereinheit ca. 300 Basenpaare umfasst und die in der Nähe des C-Endes lokalisiert ist. Die Mehrzahl der PIKKs werden durch die PIKKs-Lipide phosphoryliert. Bei strahleninduzierten DSBs zerfällt das inaktive ATM-Dimer in zwei aktivierte Monomere und sorgt dabei für die Initialisierung der Reparaturkaskade. Nach Bestrahlung und DSB-Induktion erfolgt eine Autophosphorylierung von ATM über den Energieträger ATP an Serinresten, wie dem Serin 1981 (CZORNAK et al., 2008; KOZLOV S, 2003). Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ATM durch 53BP1, die über die Untereinheit Rad50 des MRN-Komplex vermittelt wird (PANIER, BOULTON, 2014). Dieser Komplex gibt nach Aktivierung durch die Rekrutierung an DSB-Bruchenden Rückmeldung an den Zellzyklus, um diesen während des Reparaturvorgangs gegebenenfalls anzuhalten (Zellzyklusarrest) und den Eintritt in die Zellteilung (Mitose) zu verhindern (ASSENMACHER, HOPFNER, 2004; D'AMOURS, JACKSON, 2002).

ATM ist während des NHEJ in der G1- und der G2 Phase des Zellzyklus von großer Bedeutung für die Reparatur von DSBs im Heterochromatin. Es konnte gezeigt werden, dass ATM ebenfalls Einfluss auf die HR während der G2-Phase des Zellzyklus hat und sowohl beim NHEJ, als auch an der HR im Heterochromatin beteiligt ist (GOODARZI et al., 2010). Beeinträchtigungen des ATM können zu massiven Einschränkungen in der DNA-Reparatur

führen, wie es beispielsweise bei dem Krankheitsbild der Ataxia Teleangiectatica beobachtet werden kann (Kapitel 2.7).

2.6.5 53BP1

53BP1 ist ein weiteres Protein, welches bei der Signalkaskade zur Reparatur von strahleninduzierten DSBs beteiligt ist. Es kann bereits kurz nach Bestrahlung im direkten Umfeld von DSBs nachgewiesen werden, wo es an histongebundenes Chromatin bindet und Teil des DNA-Reparaturkomplexes ist (WANG et al., 2002). Bedingt durch die Akkumulation nach Bestrahlung und seines Aufbaus kann 53BP1 mittels IFM markiert und als Foci unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Es kommt nach strahleninduzierten DSBs zu einer Kolo-kalisation von 53BP1 und γ H2AX, welche sich ebenfalls mittels IFM darstellen und vergleichen lässt (FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2002).

Es wird angenommen, dass 53BP1 mehrere Funktionen bei der Reparatur von DSBs übernimmt. So wird vermutet, dass 53BP1 nach Anlagern an das Chromatin weitere Reparaturproteine rekrutiert und eine Interaktion mit p53 stattfindet (HUANG et al., 2007) (MUNOZ et al., 2007). Der daraus entstehende p53-53BP1 Komplex kann sich an die DNA-Bruchenden anlagern und aktiviert wiederum die Transkription von p53 (HUANG et al., 2007). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch das Anlagern von 53BP1 an DSBs eine erhöhte Flexibilität und Beweglichkeit des Chromatins ermöglicht wird. Man vermutet, dass dadurch die Bruchenden räumlich näher zueinander geführt werden, so dass sich der DNA-Reparaturkomplex an den DSB Anlagern kann (DIMITROVA et al., 2008).

Außerdem verstärkt 53BP1 wahrscheinlich die Aktivität von ATM insbesondere in Zellen mit wenigen DSBs. Dies führt bei fehlender oder eingeschränkter Funktion des 53BP1 dazu, dass ATM assoziierte Reparaturproteine wie BRCA1 und p53 nicht ausreichend phosphoryliert und aktiviert werden können (PANIER, BOULTON, 2014; WANG et al., 2002).

2.7 Defiziente DNA-Reparatur am Beispiel der Ataxia Teleangiectasia

Als vererbte Krankheit tritt Ataxia Telangiectasia (AT) in Deutschland mit einer Inzidenz von 1: 40000 pro Jahr äußerst selten auf. Ursache ist meist eine Deletion oder Punktmutation, die zu Veränderungen im ATM-Gen und somit zu Funktionseinschränkungen führt. Treten

Mutationen auf beiden ATM-Allelen auf, so besitzt das ATM-Protein nur noch eine eingeschränkte oder gar keine Funktion, wodurch die nachfolgenden Proteine der DSB-Reparaturkaskade nur teilweise aktiviert werden (ROTHBLUM-OVIATT et al., 2016). Zudem wird p53 nicht mehr hochreguliert, was zu einer gestörten Zellzykluskontrolle führt. Somit treten Einschränkungen bei der DSB-Reparatur auf, die vermehrt zu Mutationen und letztlich auch zu Krebs führen können (MORRELL et al., 1986).

Klinisch äußert sich die Erkrankung in einer zerebellären Ataxie bedingt durch einen Untergang der Purkinje-Zellen im Kleinhirn und einer damit verbundenen Kleinhirnatrophie, weshalb die meisten Patienten ab dem jugendlichen Alter auf einen Rollstuhl angewiesen sind (BODER, SEDGWICK, 1958; ROTHBLUM-OVIATT et al., 2016). Darüber hinaus treten häufig Teleangiectasien im Gesicht und den Bindehäuten auf und durch eine anormale Entwicklung oder das Fehlen des Thymus kommt es außerdem zu Einschränkungen im Immunsystem. Diese äußern sich durch Lymphopenie mit Erniedrigung der CD4+, CD8+ T-Zellen und der B-Zellen, mit daraus resultierenden rezidivierenden Atemwegsinfekten (ROTHBLUM-OVIATT et al., 2016).

Aufgrund der komplexen Rolle des ATM während des Zellzyklus kommt es über multiple Einschränkungen von Signalkaskaden zu Ausbildung der neurologischen, immunologischen und onkologischen Krankheitserscheinungen. Zurzeit gibt es keinen kurativen Therapieansatz, so dass symptomatische Behandlung und Prophylaxe vor Infektionen im Vordergrund stehen (HEROLD, 2011; ROTHBLUM-OVIATT et al., 2016).

Auf molekularer Ebene konnten Unterschiede in der Reparaturkinetik von DSBs im Euchromatin und Heterochromatin festgestellt werden. Während die Reparatur von DSBs im Heterochromatin über einen Zeitraum von 24 h Reparaturaktivitäten aufweist, ist die Reparatur von DSBs im Euchromatin nach 4-6 h weitestgehend abgeschlossen (GOODARZI et al., 2010). Annähernd 85% der DSBs werden mittels schneller Reparaturkinetik und ca. 15% mittels langsamer Reparaturkinetik repariert (GOODARZI et al., 2010; ILIAKIS et al., 1991; LOBRICH et al., 1995). Dabei können die Reparaturproteine ATM, der MRN-Komplex, 53BP1 und die Histonvariante γ H2AX der langsameren Reparaturkinetik zugeschrieben werden, während XRCC4, DNA-Ligase IV, KU70/80 und DNA-PKcs sowohl bei der schnelleren Reparatur im Euchromatin und der langsameren Reparatur im Heterochromatin beteiligt sind (GOODARZI et al., 2010).

Liegt eine defiziente Reparaturkapazität aufgrund von Einschränkungen des ATM vor, hat dies Konsequenzen für die Beseitigung von Schäden im Heterochromatin, möglicherweise

auch, da dieses nicht geöffnet werden kann und deshalb unzugänglich für weitere Reparaturproteine bleibt (GEUTING et al., 2013; LORAT et al., 2012). Desweiteren scheint eine Relation der Reparaturkapazität von DSBs im Heterochromatin in Bezug auf die Strahlendosis zu bestehen. So werden vermutlich DSBs die durch hochenergetische Strahlung verursacht wurden schlechter repariert, als Schädigung durch Strahlung im Niedrigdosisbereich (LORAT et al., 2016).

2.8 Lymphozyten als geeignetes Untersuchungsmaterial

Lymphozyten sorgen für die Ausbildung des humoralen und des zellulären Immunsystems und werden in T- und B-Lymphozyten unterteilt. Dabei bilden die Lymphozyten einen Anteil von 20-45% der Leukozyten im Blut. Im Thymus erhalten die T-Lymphozyten ihre Prägung und reifen zu Gedächtniszellen und T-Effektorzellen, wie beispielsweise den zytotoxischen T-Lymphozyten, heran. Diese greifen körperfremde Strukturen wie Viren und Bakterien an und dienen der natürlichen Immunabwehr. Die B-Lymphozyten werden im Knochenmark geprägt und sorgen mittels Ausreifung zu Plasmazellen für die Bildung spezifischer Antikörper gegen Fremdmaterial (HEROLD, 2011).

Lymphozyten sind mittels Blutentnahme mit weniger Aufwand zu isolieren als Gewebeproben und erlauben zuverlässig Rückschlüsse auf die Reparaturkinetik von DSBs nach ionisierender Strahlung.

2.9 Ziel der Arbeit

Bis heute ist die Ätiologie maligner Erkrankungen im Kindesalter weitgehend unklar. Es ist bekannt, dass bereits geringe Einschränkungen in der DNA-Reparaturkapazität zu einer Akkumulation von fehlerhaft reparierten oder irreparablen DNA-Schäden führen können. Durch die daraus resultierende genomische Instabilität wird möglicherweise die Entstehung von Tumorzellen begünstigt. Daher wurde in dieser Arbeit die DSB-Reparaturkapazität in Lymphozyten von Kindern mit malignen Erkrankungen mittels IFM untersucht, und die Quantifizierung von Foci für unterschiedliche Reparaturproteine ATM, 53BP1 und γ H2AX miteinander verglichen. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die erkrankten Kinder Einschränkungen in der DNA-Reparaturkapazität aufweisen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Geräte

	Name	Hersteller
Autoklave	Systec 3870 ELV	Systec GmbH, Wettenberg
Brutschrank	Heraeus, HeraCell	Kendro Laboratory Products, Hanau
Elektronische Pipettierhilfe	Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte
Fluoreszenz-Mikroskop	Nikon Eclipse E600	Nikon, Düsseldorf
Kamerasystem	Nikon DS 2MBWc (s/w) Nikon DS Fi1 (Farbe)	Nikon, Düsseldorf
Pipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Röntgenröhre	Philips PW2148/00	Philips, Hamburg
Sterilwerkbank	Heraeus Hera safe	Kendro Laboratory Products, Hanau
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY USA
Wärmebad		GFL, Burgwedel
Wippeltisch	Shaker S4	ELMI, Riga, Lettland
Zentrifuge	Biofuge 13 Heraeus	Kendro Laboratory Products, Osterode
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg

Verbrauchsmaterialien und Behälter

	Eigenname	Hersteller
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette, NH ₄ -Heparin	Sarstedt, Nümbrecht
Butterfly-Kanüle	Safety-Multifly®-Set	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen Ø12 mm	Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dewargefäß	Isotherm	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Einfriersammelbox	5100 Cryo 1°C Freezing Container "Mr. Frosty"	Nalgene® Labware, Roskilde Dänemark
Kryoröhrchen	Nunc Cryotube Vials	Nunc, Roskilde, Dänemark
Objektträger	SuperFrost	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Material und Methoden

Parafilm	Laboratory Film	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)		Verschiedene Hersteller (VWR international, West Chester, PA, USA; Sarstedt, Nümbrecht)
Zellkulturflasche, 25 cm ²	Nunclon Surface	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkultur-Petrischale 145/20 mm	Petrischalen	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Zellkulturplatten	6 Well Cell Culture Plate Cellstar [®]	Greiner Bio-One, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zellschutz	Cellsafer	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml		Sarstedt Nümbrecht

Chemikalien

	Funktion	Hersteller
Aceton	Zellfixierung und Permeabilisierung	SAV LP, Flintsbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Kulturmedium, Lymphozyten-Kryokonservierung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetal bovine serum (FBS) Superior	Supplement bei Zellkulturen	Biochrome AG, Berlin
Ziegenserum (NS)	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen vor der Färbung	PAA, Pasching, Österreich
Lymphozytenseparations Medium (LSM) 1077 (Percoll)	Lymphozytenseparation im Dichtegradient	PAA, Pasching, Österreich
Methanol	Zellfixierung	VWR BDH Prolabo, Briare, Frankreich
Mounting Medium (Vectashield) mit DAPI/ ohne DAPI	Minderung der Ausbleichung der immunhistochemischen Färbung <ul style="list-style-type: none"> • mit DAPI: Blaufärbung der Zellkerne in der Immunfluoreszenz 	Vector Laboratories, Burlingame, CA USA

Material und Methoden

Nicht essentielle Aminosäuren	NEAA	Biochrome AG, Berlin
Phosphat balanced salt solution (PBS)	Zellreinigung	Klinikapotheke
Penicillin/Streptomycin	Supplement (Antibiotikum)	Biochrome AG, Berlin
Propidiumiodid	Differenzierung der Zellzyklusphase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640	Kulturmedium	Biochrome AG, Berlin

Fluoreszenzantikörper

Primärantikörper

Epitop	Name	Verdünnung/Inkubationszeit
H2AX (Serin 139)	Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139), clone JBW301, mouse monoclonal IgG1/Upstate/Millipore, Billerica, MA USA	1:1000 in PBS/NS über Nacht bei 4°C
53BP1	53BP1 IHC-00001 Ab, rabbit polyclonal, Bethyl Lab.Inc., Monthermy, TX USA	1:1000 in PBS/NS über Nacht bei 4°C
ATM (phospho S1981)	Mouse monoclonal antibody to ATM (10H 11.E12) phosphor Ser1981, Rockland	1:1000 in PBS/NS über Nacht bei 4°C

Sekundärantikörper

Epitop	Name	Verdünnung/Inkubationszeit
Mouse IgG	Alexa Fluor [®] 488 goat antimouse IgG (H+L), Invitrogen	1:500 in PBS/NS 1 h im Brutschrank
Rabbit IgG	Alexa Fluor [®] 488 goat antirabbit IgG (H+L), Invitrogen	1:500 in PBS/NS 1 h im Brutschrank

Mikroskop Filtersätze für Fluorophore

Fluorophor	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter
DAPI	340-380 nm	400 nm	435-485 nm
FITC	465-495 nm	505 nm	515-555 nm

Exzitationsmaximum und Emissionsmaximum

Farbstoff	Exzitationsmaximum	Emissionsmaximum
Alexa Fluor [®] 488	495 nm	519 nm
DAPI	358 nm	461

3.2 Patientenkollektiv

Die Probanden waren Kinder mit malignen Erkrankungen, die im Zeitraum von Mai 2009 bis März 2011 vornehmlich im Universitätsklinikum des Saarlandes behandelt wurden. Möglichst vor Einleitung einer Chemo- und Strahlentherapie wurden Blutproben von 45 kranken Kindern für die Studie entnommen und untersucht. Da einige wenige Patienten innerhalb des betrachteten Zeitraums an Rezidiven erkrankten, wurde ihr Blut mehrmals untersucht. Vor Therapiebeginn wurden 22 Proben abgenommen, vier Proben mit Beginn der Therapie, fünf Proben während der Therapie sowie fünf Proben in Therapiepausen und zwei nach der Therapie. Die verbleibenden sieben Proben stammen von Kindern die zum Teil weder Chemotherapie noch eine Radiatio erhielten aufgrund des Krankheitsbildes. Weiterhin wurde das Blut von fünf gesunden Kindern untersucht und als Kontrollgruppe herangezogen. Die Untersuchung wurde durch die lokale Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt und die Patienten, beziehungsweise deren gesetzliche Vertreter, wurden vorab über die Verwendung der Proben und Daten aufgeklärt.

3.3 Aufbereitung der Blutproben und Kryokonservierung

Aus den entnommenen Blutproben wurden zunächst die Lymphozyten isoliert und in einem weiteren Schritt kryokonserviert.

Um die Lymphozyten aus dem Blut zu isolieren, wurde das abgenommene Blut vorsichtig über Percoll geschichtet. Nach der Zentrifugation bei 1200 rpm für 20 min bei Raumtemperatur (RT), waren die Bestandteile des Blutes nach ihrem Dichtegradienten geordnet. Am Boden setzte sich ein Pellet aus Erythrozyten ab, darüber lagerte sich das Percoll. Darauf kamen die mononuklearen Zellen zum Liegen und die oberste Schicht bestand aus Serum.

Die Lymphozytenschicht wurde abpipettiert und zweimal mit jeweils 2 ml PBS 10 min bei RT gewaschen. Es erfolgte eine weitere Waschung mit 2 ml PBS für 10 min bei 250 rpm und RT.

Im Anschluss daran wurden die Lymphozyten in Medium mit RPMI, 20% FBS, 1% P/S und 10% DMSO aufgenommen. Als Frostschutzmittel schützte das DMSO vor Eiskristallbildung, da diese die Zelle schädigen kann. In einem mit Isopropylalkohol gefüllten Gefäß wurden die Proben langsam auf -80°C heruntergekühlt, um sie anschließend in flüssigem Stickstoff über einen längeren Zeitraum zu lagern.

Diese Kryokonservierung ermöglichte es, zunächst eine ausreichende Anzahl unterschiedlicher Blutproben zu sammeln und diese dann innerhalb eines zusammenhängenden Zeitraums kollektiv auf mögliche DNA-Reparatureinschränkungen zu untersuchen. Die Akquirierung der Lymphozyten konnte mit diesem Verfahren über einen Zeitraum von circa zwei Jahren stattfinden.

Vor Versuchsbeginn wurden die Proben nach Bedarf in einen 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut. Da das DMSO zytotoxisch ist, wurden die Zellen direkt unter sterilen Bedingungen in Zentrifugenröhrchen pipettiert und 37°C warmes Medium (1000 ml RPMI 1640 Medium + 60 ml FBS + 5 ml Streptomycin) zugegeben.

Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 300 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das am Boden haftende Zellpellett mit Medium resuspendiert und in Kulturflaschen umgefüllt. Dieser Arbeitsschritt erfolgte ebenfalls unter einer Sterilbank, um die Zellkulturen vor Kontamination zu schützen. Die Lymphozyten wurden bis zur Bestrahlung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-inkubiert.

3.4 Bestrahlung der Lymphozyten

Die Lymphozyten wurden ex-vivo mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt, um die Induktion von DSB und deren zeitabhängige Reparatur zu analysieren.

Vor der Bestrahlung wurde die Lymphozytensuspension in Teilmengen gleichen Volumens unterteilt. Hierdurch war es möglich, eine unbestrahlte Kontrollprobe, ein Reparaturzeitpunkt direkt (15 min) nach der Bestrahlung, die sogenannte Induktion, sowie 8 h und 24 h post IR auf die Anzahl vorhandener DSBs zu untersuchen. Um eine homogene Dosisverteilung

während der Bestrahlung zu gewährleisten, wurden die Zellkulturflaschen mit je 5 ml Medium auf einen gleichen Füllstand gebracht.

Die Bestrahlung wurde mit einer Röntgenröhre vom Typ Philips PW2184/00 durchgeführt (Anode: Wolfram, Ausgangsfenster: Beryllium, 0,02 mm Dicke). Der Abstand zu den Proben (Lymphozyten in den Kulturflaschen) betrug aufgrund der Berechnung über das Abstands-Quadrat-Gesetz 40 cm. Es wurde mit einer Dosisleistung von 1,45 Gy/min, einer Beschleunigungsspannung von 90 kV und einem Heizstrom von 25 mA bestrahlt. Unter diesen Voraussetzungen ergab sich eine Bestrahlungszeit für 1 Gy von 41 s, bei 2 Gy betrug sie 82 s.

Die Induktion von DSBs wurde nach der Applikation einer Dosis von 1 Gy analysiert. Für die übrigen Reparaturzeitpunkte wurden 2 Gy gewählt. Die Induktion, also die Auszählung der Foci nach 15 min, diente dem möglichst direktem Nachweis von DSBs nach deren Entstehung. Da die Visualisierung von Foci durch die Akkumulation von fluoreszenzmarkierten Reparaturproteinen im Umfeld des DSBs folgt und diese eine gewisse Zeit benötigt, wurde die maximale Anzahl an Foci nach 15-30 min gezählt. Aus diesem Grund wurde für die Induktion eine Dosis von 1 Gy gewählt, damit diese maximale Anzahl an Foci zuverlässig quantifiziert werden konnte. Bei hohen Dosen würden sich hingegen die Fluoreszenzsignale räumlich naher Foci überschneiden, wodurch sie nicht mehr klar zu differenzieren wären, und so die tatsächliche Anzahl unterschätzt würde.

Bei der Behandlung von Tumorerkrankungen durch Strahlentherapie liegt die therapeutische Dosis häufig bei 2 Gy pro Tag. Um die Reparaturkinetik der DSBs im Vergleich zu einer solchen Therapie zu untersuchen, wurde der 8 und der 24 Stunden-Reparaturzeitpunkt ebenfalls mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Proben bis zum gewünschten Reparaturzeitpunkt im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurde die Probe in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei RT für 10 min mit 300 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet mit 300 µl PBS resuspendiert. Dann wurden je 100 µl der Probe auf drei Deckgläschen aufgetropft, um drei verschiedene Antikörperfärbungen durchzuführen. Hierbei wurden Pipettenspitzen mit ausreichend großem Durchmesser verwendet, da Scherkräfte an herkömmlichen Pipettenspitzen möglicherweise zur Zerstörung von Lymphozyten führen können.

Damit sich die Suspensionszellen am Boden des Deckglases absetzen konnten, erfolgte die Fixierung der Zellen erst nach 20 min Standzeit durch -20°C kaltes Methanol.

Zunächst wurde vorsichtig 1 ml Methanol pro Well hinzugegeben um ein erneutes Aufwirbeln bereits sedimentierter Lymphozyten zu vermeiden. Im Anschluss wurde jedes Well auf 3 ml aufgefüllt und die Proben für 30 min bei -20°C inkubiert.

Nun erfolgte die Permeabilisierung der Lymphozytenmembran für 1 min mittels -20°C kalten Aceton. Im Anschluss wurden die Lymphozyten bei RT zweimal in jeweils 3 ml PBS für 10 min auf dem Schütteltisch mit einer Frequenz von 15 rpm gewaschen. Nachfolgend wurden unspezifische Bindungsstellen durch den Einsatz von Ziegen Serum und in PBS für 30 min blockiert.

3.5 Immunfluoreszenz-Färbungen

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz können DNA-Reparaturproteine spezifisch über Antikörperbindungen nachgewiesen werden. Hierzu wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen bei 4°C über Nacht in einer Feuchtkammer mit verschiedenen primären Antikörpern inkubiert. Die Feuchtkammer bestand aus einer Petrischale, in die mit Wasser angefeuchtetes Zellpapier und Parafilm gelegt wurde. Genutzt wurden, im Verhältnis 1:1000 in PBS/NS, für die ATM-Färbung monoklonale anti-ATM-Antikörper (10H 11. E12) (phospho S1981), für die 53BP1 Färbung anti-53BP1-Antikörper und für die γ H2AX-Färbung Anti-phospho-Histone H2AX (Ser 139) (Maus monoklonal IG G1) (siehe Kapitel 3.1).

Am nächsten Tag wurden die Proben bei RT erneut für 10 min, in 3 ml PBS/NS gewaschen. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt und anschließend mit PBS wiederholt. Nachfolgend wurden die Zellen mit sekundären, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern in einer Feuchtkammer für 1 h bei RT inkubiert. Verwendet wurden hierbei für den Nachweis von ATM und γ H2AX Maus IgG Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus IgG und von 53BP1 Kaninchen IgG Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG in der Verdünnung 1:500 mit PBS und NS.

Nach einer Stunde erfolgten weitere vier Waschschrte mit jeweils 3 ml PBS für 10 min, zur Entfernung unspezifischer Rückstände.

Um die nun mittels Immunfluoreszenzmarkierung sichtbaren Foci den einzelnen Zellkernen zuordnen zu können, erfolgte eine Gegenfärbung mit DAPI direkt auf dem Objektträger. DAPI interkaliert zwischen den Basen von Nukleinsäuren und wird verwendet um die

Unversehrtheit des Zellkerns aufzuzeigen, sowie Anomalien der Form oder des Umfangs sichtbar zu machen.

Hierzu wurde Mounting-Medium mit DAPI im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 3 μl pro Deckglas auf einen Objektträger aufgetragen. Das Deckglas wurde mit der zellbehafteten Seite nach unten vorsichtig auf den Tropfen Mounting-Medium gelegt. Das Mounting-Medium schützte den Fluoreszenzfarbstoff vor dem Ausbleichen während der Belichtung, so dass eine adäquate Zeitspanne zur Untersuchung der Zellen unter dem Mikroskop bestand. Die fluoreszenzmarkierten Proben wurden auf ihrem Objektträger in Sammelmappen einsortiert und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.6 Quantifizierung der Foci

Das Zählen der Foci erfolgte mittels eines 60er Objektivs (600facher Vergrößerung) im abgedunkelten Raum mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E600). Auf den zu untersuchenden Objektträger wurde ein Tropfen Mikroskopieröl gegeben, um den Brechungsindex zwischen Luft und Objektträger herabzusetzen und somit die höhere Vergrößerung zu erreichen.

Mit Hilfe von Anregungsfiltern im Mikroskop (Nikon Eclipse E600) konnte Licht mit spezifischer Wellenlänge passieren, welches zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe führte, während Licht mit anderer Wellenlänge blockiert wurde.

Das Alexa-Fluor-488 des sekundären Antikörpers, welches die Visualisierung der Foci ermöglichte, hatte sein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 495 \text{ nm}$ und sein Emissionsmaximum bei $\lambda = 519 \text{ nm}$. DAPI hingegen hatte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 358 \text{ nm}$ sein Absorptionsmaximum und emittierte Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 461 \text{ nm}$, wodurch die DNA der Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop blau leuchteten.

Zur „Verblindung“ wurden die Proben mit Nummern codiert damit die Auszählungen unter dem Mikroskop ohne Kenntnis weiterer Informationen erfolgten.

Zur Quantifizierung wurden mindestens 40 Foci oder 40 Zellen gezählt. Bei den unbestrahlten Kontrollen wurde deshalb eine große Anzahl an Zellen gezählt, um die erforderlichen 40 Foci zu erfassen. Im Gegensatz hierzu wurden bei der Induktion, mindestens 40 Zellen gezählt, da eine Vielzahl an Foci pro Zellkern vorhanden war. Zellen, die unregelmäßig geformte Zellkerne oder übermäßig stark angefärbt waren, wurden nicht berücksichtigt.

Um die Reparaturkinetik der durch Bestrahlung entstanden Foci zu untersuchen, wurde der Hintergrund der in den unbestrahlten Kontrollen gezählt wurde von der Anzahl der Foci nach 0,25 h, nach 8 h und nach 24 h abgezogen.

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mittels einer Nikon DS Fi1 Kamera, die an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossen war, angefertigt. Mit dem Programm „Nikon NIS Elements BR Software“ konnten die Kamera Einstellungen via Computer verändert werden. Die entstandenen Aufnahmen wurden mittels „Photoshop“ bearbeitet.

3.7 Statistische Auswertung

Für die deskriptive Statistik wurden Mittelwerte, Mediane und Standardfehler ermittelt.

Als Testverfahren für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt, um zu belegen, dass mögliche Unterschiede zwischen den Reparaturkinetiken von gesunden und erkrankten Kindern signifikant waren. Voraussetzung für den Test war die gleiche Verteilungsform der Variablen n_{Tumor} und $n_{\text{Kontrolle}}$, jedoch Symmetrie oder die Normalverteilung wurden nicht vorausgesetzt (WEIS, 2008). Bei dem Test betragen die Stichprobenumfänge $n_{\text{Tumor}} = 45$ und $n_{\text{Kontrolle}} = 5$ Proben. Die Daten wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ betrug.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm „SigmaStat 3.5“. Die Graphiken wurden mit „Microsoft Excel“ erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Verteilung maligner Erkrankungen in dem untersuchten Patientenkollektiv

Bei den Patienten handelte es sich um 45 Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene zwischen 1 und 22 Jahren mit einer malignen Erkrankung. Von ihnen waren 27 männlich, 18 weiblich, ihr durchschnittliches Alter bei Erstdiagnose lag bei 9,16 Jahren. Darüber hinaus wurden 5 Proben von gesunden Kontrollkindern ausgewertet.

Mit einem Anteil von zusammen 30% waren die Leukämien am häufigsten vertreten. Vergleicht man die Verteilung der unterschiedlichen malignen Erkrankungen aus unserer Versuchsreihe mit der Verteilung des Robert- Koch- Instituts aus dem Kinderkrebsregister von 2016 zeigt sich eine annähernd gleiche Verteilung für das Auftreten einer bestimmten Erkrankung (Abbildung 6) (KINDERKREBSREGISTER, 2016). Dies bedeutet, dass der Stichprobenumfang in dieser Studie die Verteilung der Tumorerkrankungen in der Gruppe der gleichaltrigen Kinder widerspiegelte.

Bei den Probanden traten 13 Leukämien (C-ALL, AML und ALL), 8 ZNS-Tumore (Glioblastom, Astrozytom, Neuroblastom, Medulloblastom, Ependymom und Opticusgliom), 6 Lymphome (NHL und Morbus Hodgkin), 1 peripherer Nervenzelltumor (Retinoblastom), 1 Weichteilsarkom (Rhabdomyosarkom), 4 Nierentumore (Nephroblastom), 6 Knochentumore (Ewing Sarkom und Osteosarkom), 1 Keimzelltumor (Hoden-Karzinom) und 5 weitere Tumorarten (Lipom Granulom, Plattenepithel-Karzinom, Rhabdoid-Karzinom, Fokale noduläre Hyperplasie, Phäochromozytom) auf.

Anzahl	Sex	Alter (a)	ID	Diagnose	Radiatio	Chemozeitpunkt zur Blutprobe
1	M	3,43	AKIC		Stuttgart	Stuttgart
2	M	12,98	AITB	Glioblastom	59,4Gy à 1,8 Gy u. 39,6Gy à 1,8	vor Therapiebeginn
3	F	5,50	BRBY	Astrozytom	nein	nein
4	M	3,15	BRNO	NHL	nein	Blut zu Therapiebeginn
5	M	7,48	BNLC	Osteosarkom IV	geplant	Blut während Therapie
6	F	8,21	BUEI	Nephroblastom	nein	Blut während Therapie
7	M	6,89	BRRN	NHL	nein	Blut nach Therapieende
8	M	2,71	CAFO	c-ALL	nein	Blut vor Therapiebeginn
9	F	12,18	DRLE	Glioblastom	59,4 à 1,8 u. 50,4 à 1,8	Blut vor Therapiebeginn
10	M	5,13	DRMN	c-ALL	nein	Blut vor Therapiebeginn
11	M	6,93	EKSI	Neuroblastom IV	nein	Blut nach Therapieende
12	M	5,75	GRJN	Medulloblastom	35,2Gy à 1,6 u. 19,8Gy boost	Blut vor Therapiebeginn
13	F	14,75	GSLA	Osteosarkom	nein	Blut vor Therapiebeginn
14	M	2,96	HNLT	WilmsTumor	15 Gy à 1,5Gy u. 15 Gy à 1,5Gy	Blut in Therapie

Ergebnisse

15	M	22,11	HZFC	c-ALL	nein	Blut vor Therapiebeginn
16	F	15,42	HFLA	cALL	nein	Blut zu Therapiebeginn
17	F	14,79	HNLA	Astrocytom	nein	Blut vor Therapiebeginn
18	M	1,05	HRTS	Retinoblastom	ja	Blut vor Therapiebeginn
19	F	7,81	KIDA	Osteosarkom	nein	Blut vor Therapiebeginn
20	M	6,29	KSLS	AML	Ganzhirn 3*2Gy + 6 * 2Gy	Blut in Therapiepause
21	M	17,35	KNML	ALL	nein	Blut vor Therapiebeginn
22	F	16,97	KSVA	ALL	12Gy (2x2Gy)	Blut in Therapiepause
23	F	3,02	KNCA	ALL	nein	Blut vor Therapiebeginn
24	F	3,61	KNCA	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX
25	F	11,56	KLVA	ALL	nein	Blut vor Therapiebeginn
26	M	12,66	KTMZ	HodenCA	nein	Blut zu Therapiebeginn
27	M	4,55	LEDN	Nephroblastom	19,8Gy a1,8 und 12Gy a1,5Gy	Blut vor Therapiebeginn
28	M	15,00	MRAN	M.Hodgkin	nein	Blut während Therapie
29	M	5,46	MACR	Ependymom	geplant	nein
30	M	15,01	MKTS	M.Hodgkin	nein	Blut vor Therapiebeginn
31	M	5,15	MRNO	Ewing Sarkom	41,4 Gy (1x1,8Gy)	Blut vor Therapiebeginn
32	F	14,49	MRME	ALL	nein	Blut zu Therapiebeginn
33	M	9,39	NZBT	ALL	nein	Blut in Therapiepause
34	F	8,32	NLKN	FNH	nein	keine CHEMOTHERAPIE
35	M	6,23	PUJN	Opticusgliom	nein	keine CHEMOTHERAPIE
36	F	2,64	PLIE	EWING-Sarkom	nein	in Therapiepause
37	M	17,56	RSML	Osteosarkom	nein	Blut vor Therapiebeginn
38	F	8,62	SRAA	NHL	nein	Blut vor Therapiebeginn
39	M	1,73	HYSO	Rhabdoid-CA	24Gy (1x1,6Gy)+54,6 (1x1,8Gy)	Blut vor Therapiebeginn
40	F	5,35	SKAE	Nephroblastom	nein	Blut vor Therapiebeginn
41	F	6,16	SRMA	Rhabdomyosarkom	45 Gy (1x1,8Gy)	Blut in Therapiepause
42	F	19,65	SBNE	PlattenepithelCA	nein	keine CHEMOTHERAPIE
43	M	13,96	SMDL	Lipom, Granulom	keine	keine CHEMOTHERAPIE
44	F	8,20	SSJA	cALL	ZNS Bestrahlung 12Gy	Blut in Therapiepause
45	M	15,89	WRBN	Phäochromocytom	nein	Blut vor Therapiebeginn
46	M	10,31	YZMD	ALL	nein	Blut vor Therapiebeginn

Abbildung 5: Patientenkollektiv

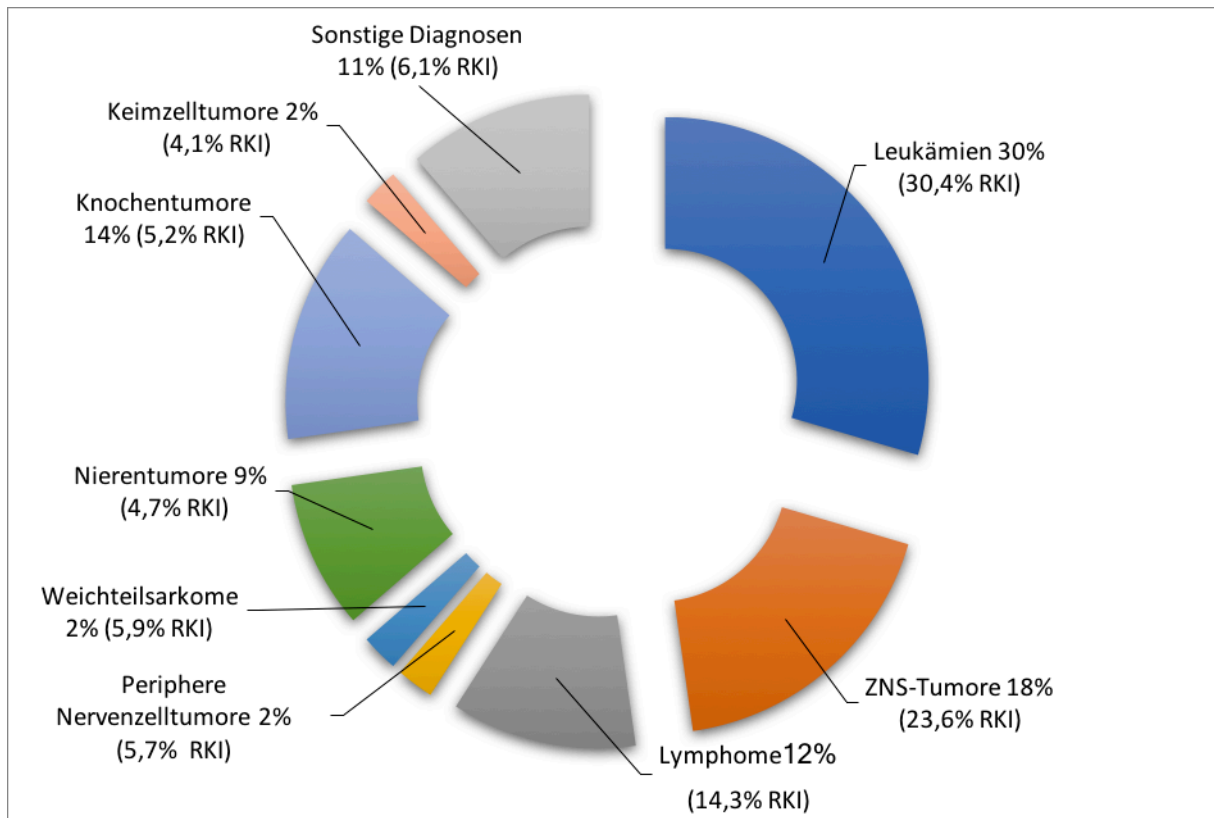


Abbildung 6: Verteilung der malignen Erkrankungen des untersuchten Patientenkollektivs. In Klammern ist die durchschnittliche Verteilung gemäß Kinderkrebsregister von 2016 des Robert-Koch Instituts (RKI) angegeben (KINDERKREBSREGISTER, 2016).

4.2 Reparaturproteine mittels IFM zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Strahlenexposition

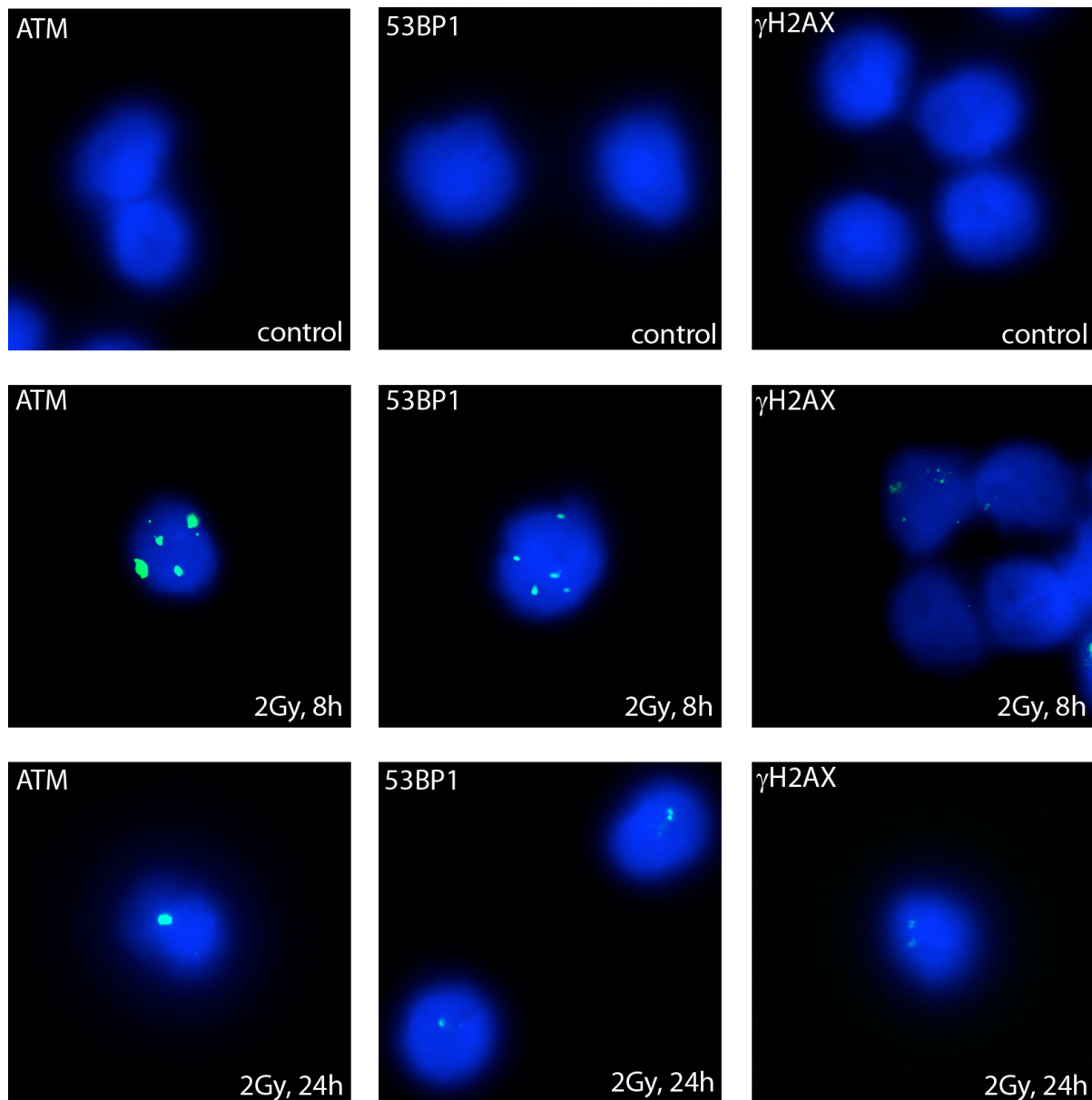


Abbildung 7: Fluoreszenzaufnahmen von Lymphozyten (600fache Vergrößerung) nach spezifischer Markierung verschiedener Reparaturproteine (grün) an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit 2 Gy. Blau: Zellkern, markiert mit DAPI

In Abbildung 7 sind die Foci an verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung dargestellt. Durch die dreidimensionale Beschaffenheit der Zelle war es nicht möglich, alle Foci in einer Ebene gleichzeitig abzubilden, weshalb eine zweidimensionale Ebene der Fluoreszenzaufnahmen betrachtet wurde. Deutlich zu erkennen war ein Größenunterschied zwischen ATM- und 53BP1-Foci im Vergleich zu den γ H2AX-Foci. Hingegen unterschied sich die Anzahl der Foci pro Zellkern trotz Größenunterschied in Bezug auf die jeweilige Antikörpermarkierung nur geringfügig.

4.3 Verteilung der Foci innerhalb der Probe

Aus jeder Probe pro Zeitpunkt wurde der Mittelwert der vorhandenen Foci berechnet, um deren stochastische Verteilung in Form einer Poisson-Verteilung auszudrücken. Abbildung 8 zeigt die Poisson-Verteilung innerhalb einer Probe für die Induktion nach 15 min und für den Reparaturzeitpunkt 8 h post IR. Je mehr sich die Anzahl der Foci an die ermittelte Poisson-Verteilung annäherte, desto repräsentativer war der ausgezählte Probenausschnitt in Bezug auf die gesamte Probe. Bis auf wenige „Ausreißer“ näherten sich die gezählten Foci der theoretisch ermittelten Zahl an. Dies sprach für eine ausreichende Anzahl gezählter Zellen und für einen repräsentativen Probenausschnitt (Abbildung 8).

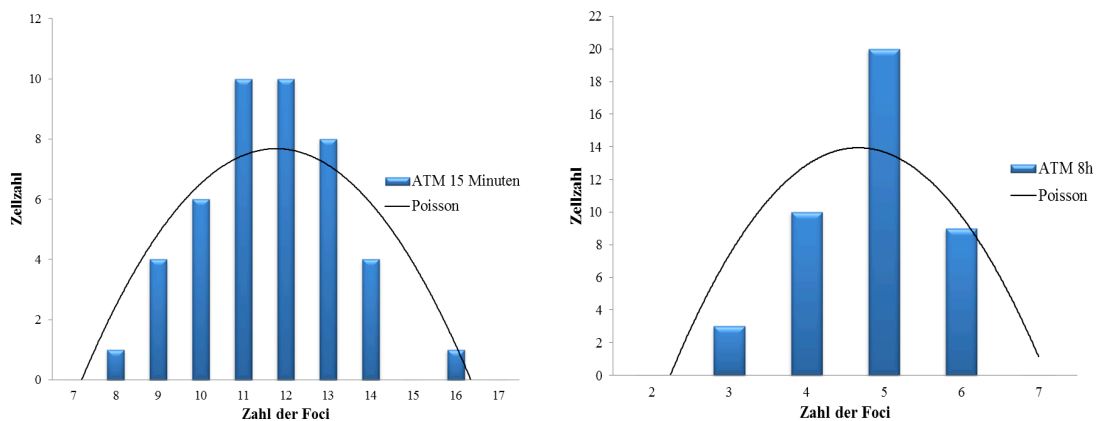


Abbildung 8: Poisson-Verteilung. Die beiden Graphen zeigen exemplarisch die Verteilung der ATM-Foci innerhalb der Probe CAFO nach 15 min (links) und 8 h (rechts)

Aufgrund zu geringer Zellzahlen konnten die Proben mit der ID HYSD und SBNE (Abbildung 5) nicht mit in die statistische Auswertung einbezogen werden, so dass 43 Proben von Kindern mit malignen Erkrankungen und zum Vergleich 5 weitere Proben von gesunden Kindern ausgewertet wurden.

4.4 DNA-Reparaturkinetik von Kindern mit Tumorerkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern

Um mögliche Unterschiede in der DNA-Reparaturkinetik von Kindern mit einer Tumorerkrankung und gesunden Kindern zu untersuchen, wurden beide Gruppen miteinander verglichen. Zunächst wurden die Ergebnisse der Markierungen für γ H2AX, 53BP1 und ATM an den Reparaturzeitpunkten gesondert betrachtet und erst später eine Gegenüberstellung mit

den Proben der gesunden Kinder vorgenommen. Da die Kinetik der durch Bestrahlung entstanden Foci untersucht werden sollte, wurde der in den unbestrahlten Proben gezählte Hintergrund von den Proben nach 0,25 h, nach 8 h und nach 24 h abgezogen.

4.4.1 Quantitative Erfassung der DSB-Reparaturkinetik mittels ATM-Immunfluoreszenzmarkierung

Die durchschnittliche Focizahl und der zugehörige Standardfehler der ATM-Reparaturkinetik betrug in der Gruppe der Tumorkinder für die Kontrolle $0,21 \pm 0,01$ Foci, für die Induktion nach 0,25 h $11,37 \pm 0,1$ Foci, nach 8 h $4,94 \pm 0,08$ Foci und nach 24 h $1,7 \pm 0,07$ Foci. In der Vergleichsgruppe mit den gesunden Kontrollkindern wurden durchschnittlich in der Kontrolle $0,19 \pm 0,01$ Foci, nach 0,25 h $10,28 \pm 0,11$ Foci, nach 8 h $4,98 \pm 0,11$ Foci und nach 24 h $1,55 \pm 0,14$ Foci gezählt (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Durchschnittliche Focizahl und zugehörige Standardfehler der ATM-Reparaturkinetik und Ergebnis des Mann-Whitney Tests, Signifikant ab $p < 0,05$ (*)

	Kontrolle	0,25 h	8 h	24 h
Tumorkinder	$0,21 \pm 0,01$	$11,37 \pm 0,1$	$4,94 \pm 0,08$	$1,7 \pm 0,07$
Kontrollkinder	$0,19 \pm 0,01$	$10,28 \pm 0,11$	$4,98 \pm 0,11$	$1,55 \pm 0,14$
Mann-Whitney Test	$p = 0,664$	$p = 0,002^*$	$p = 0,385$	$p = 0,353$

Bei der Auszählung der Lymphozyten 15 min nach Bestrahlung zeigte sich in der Gruppe der gesunden Kinder durchschnittlich 1,09 Foci weniger als in der Gruppe der Tumorkinder. Dieser Unterschied wird ebenfalls in der graphischen Darstellung der beiden DNA-Reparaturkinetiken sichtbar (Abbildung 9).

Der Mann-Whitney Test ergab für diesen Unterschied eine Signifikanz ($p < 0,05$) mit $p = 0,002$. Es sind folglich signifikant mehr Foci in der Induktion bei den Tumorkindern gezählt worden, als in der gesunden Kontrollgruppe.

24 h nach Bestrahlung lag die Anzahl der Foci in der Gruppe der Tumorkinder mit $1,7 \pm 0,07$ über der Anzahl der Foci in der gesunden Kontrollgruppe mit $1,55 \pm 0,14$. Für die 8 h und 24 h Reparaturzeitpunkte konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden.

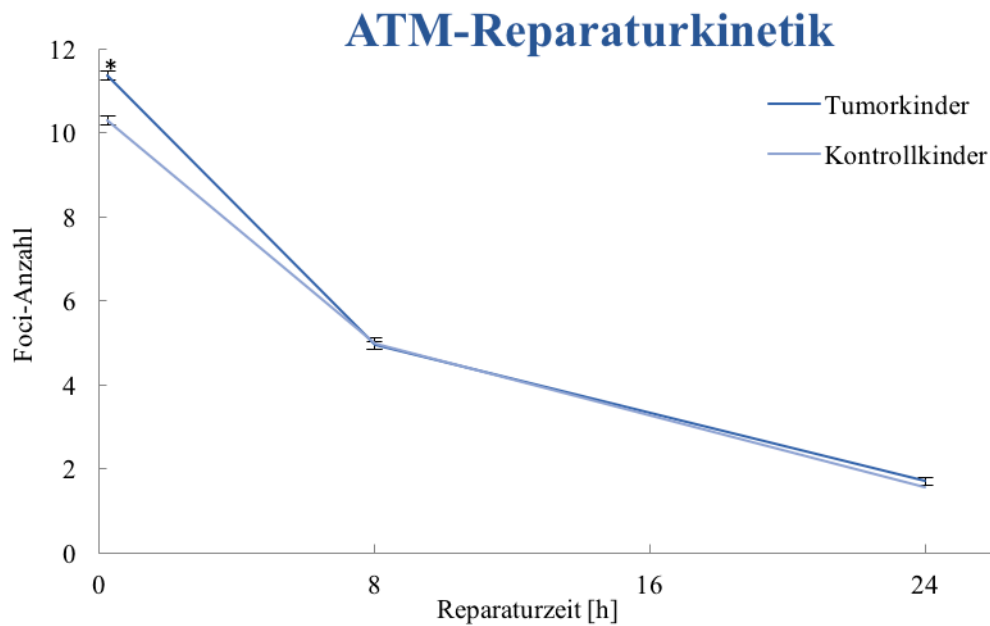


Abbildung 9: Vergleichende Darstellung der ATM-Reparaturkinetik zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Tumorkindern mit eingezeichnetem Standardfehler. Das * entspricht dem signifikantem Unterschied von $p = 0,002$ zwischen den beiden Gruppen in der Induktion nach 0,25 h.

4.4.2 53BP1-Reparaturkinetik

Betrachtet wird nun die durchschnittliche Focizahl und ihr zugehöriger Standardfehler für die 53BP1-Antikörpermarkierung. Bei den Tumorkindern wurden folgende Werte ermittelt: Für die Kontrolle $0,23 \pm 0,15$ Foci, nach 0,25 h $10,93 \pm 0,07$ Foci, nach 8 h $4,89 \pm 0,08$ Foci und nach 24 h $1,73 \pm 0,05$ Foci. Bei den Kontrollkindern wurden in der Kontrolle $0,25 \pm 0,01$ Foci, nach 0,25 h $10,31 \pm 0,07$ Foci, nach 8 h $4,98 \pm 0,13$ Foci und nach 24 h $1,52 \pm 0,07$ Foci gezählt. Nachweisbar waren wie zuvor bei der ATM-Färbung ein Unterschied von 0,62 Foci nach 0,25 h.

Tabelle 2: Durchschnittliche Focizahl und zugehörige Standardfehler der 53BP1-Reparaturkinetik und Ergebnis des Mann-Whitney Tests, Signifikant ab $p < 0,05$ (*)

	Kontrolle	0,25 h	8 h	24 h
Tumorkinder	$0,23 \pm 0,15$	$10,93 \pm 0,07$	$4,89 \pm 0,08$	$1,73 \pm 0,05$
Kontrollkinder	$0,25 \pm 0,01$	$10,31 \pm 0,07$	$4,98 \pm 0,13$	$1,52 \pm 0,07$
Mann-Whitney Test	$p = 0,032^*$	$p = 0,005^*$	$p = 0,287$	$p = 0,178$

In Abbildung 10 wurden die durchschnittliche Anzahl an 53BP1-Foci und die zugehörigen Standardfehler der untersuchten Proben von Tumorkindern und der gesunden Kontrollgruppe graphisch dargestellt. Wie bereits in der ATM-Immunfluoreszenzfärbung konnte auch hier ein geringfügiger Unterschied, 15 min nach Bestrahlung, zwischen den gesunden Kontrollkindern

und den erkrankten Kindern gezeigt werden. Dieser lässt sich mittels Mann-Whitney Test statistisch mit einer Signifikanz von $p = 0,005$ nachweisen. 24 h nach Bestrahlung lag wie bereits in der ATM-Antikörperfärbung eine erhöhte Anzahl an Foci in der Gruppe der Tumorkinder mit $1,73 \pm 0,05$ Foci gegenüber der gesunden Kontrollgruppe mit $1,52 \pm 0,07$ Foci vor. Auch hier war der Unterschied nach 24 h nicht signifikant.

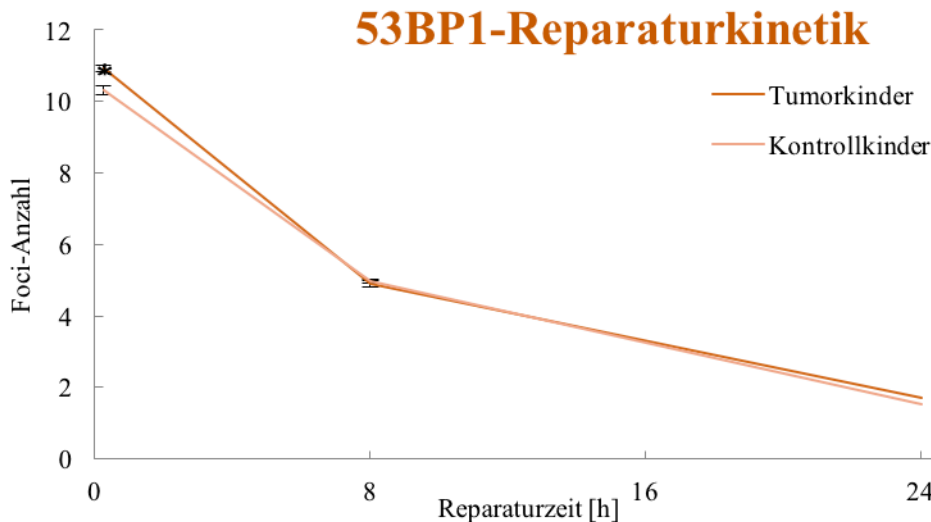


Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der 53BP1-Reparaturkinetik zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Tumorkindern mit eingezeichnetem Standardfehler. Das * entspricht dem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Induktion nach 0,25 h.

4.4.3 γ H2AX-Reparaturkinetik

Für γ H2AX betrug die durchschnittliche Focizahl und ihre Standardfehler in der Gruppe der Tumorkinder für die Kontrollen $0,22 \pm 0,02$ Foci, für die Induktion $10,83 \pm 0,09$ Foci, nach 8 h $4,75 \pm 0,08$ Foci und nach 24 h $1,49 \pm 0,05$ Foci. In der Gruppe der Kontrollkinder wurden durchschnittlich für die unbestrahlten Kontrollen $0,175 \pm 0,01$ Foci, nach 0,25 h $10,72 \pm 0,08$ Foci, nach 8 h $5,15 \pm 0,05$ Foci und nach 24 h $1,225 \pm 0,11$ Foci gezählt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Durchschnittliche Focizahl und zugehörige Standardfehler der γ H2AX-Reparaturkinetik und Ergebnis des Mann-Whitney Tests, Signifikant ab $p < 0,05$ (*)

	Kontrolle	0,25 h	8 h	24 h
Tumorkinder	$0,22 \pm 0,02$	$10,83 \pm 0,09$	$4,75 \pm 0,08$	$1,49 \pm 0,05$
Kontrollkinder	$0,175 \pm 0,01$	$10,72 \pm 0,08$	$5,15 \pm 0,05$	$1,225 \pm 0,11$
Mann-Whitney Test	$p = 0,988$	$p = 0,555$	$p = 0,05$	$p = 0,038^*$

Wie in der graphischen Darstellung ersichtlich wird, verlaufen die Reparaturkinetiken der Gruppe der erkrankten Kinder und der Gruppe der gesunden Kontrollkinder ähnlich (Abbildung 11). Die γ H2AX-Induktion ergab, wie bereits für ATM und 53BP1 nachgewiesen

wurde, einen leicht erhöhten Wert um 0,11 Foci bei den Tumorkindern (0,25 h post IR) im Vergleich zu der Kontrollgruppe, jedoch lag mit $p = 0,555$ keine Signifikanz ($p < 0,05$) vor. Nach 24 h konnten in der Gruppe der Tumorkinder durchschnittlich noch 1,49 Foci gezählt werden, während in der Gruppe der gesunden Kontrollkinder nur noch 1,225 Foci nachweisbar waren. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war mit $p = 0,038$ signifikant.

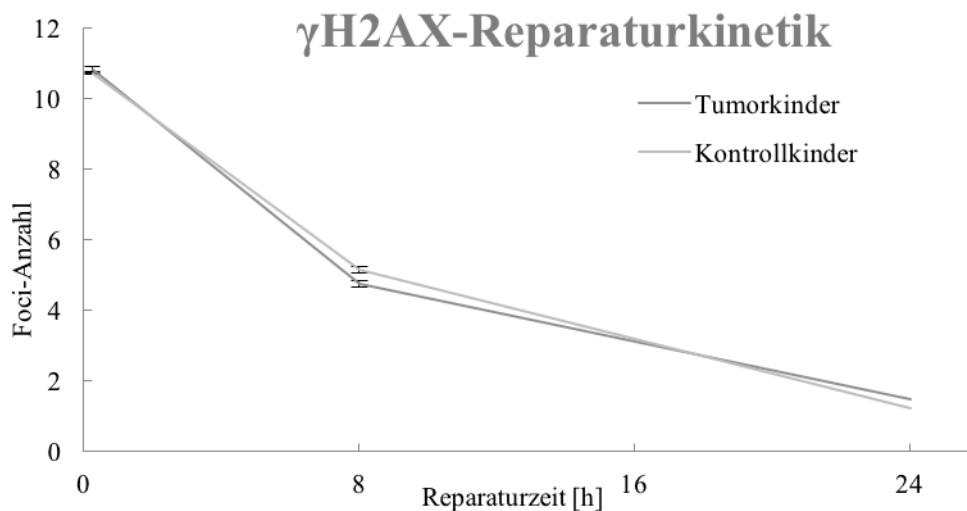


Abbildung 11: Vergleichende Darstellung der γ H2AX-Reparaturkinetik zwischen der gesunden Kontrollgruppe (Kontrollkinder) und den Tumorkindern mit eingezeichnetem Standardfehler.

4.5 Vergleich der unterschiedlichen Antikörperfärbungen

Zum Vergleich der unterschiedlichen Antikörperfärbungen miteinander wurden die Proben aller Probanden betrachtet. In den Proben wurden nach der ATM-Markierung durchschnittlich in der Kontrolle $0,21 \pm 0,01$ Foci, nach 0,25 h $11,27 \pm 0,1$ Foci, nach 8 h $4,94 \pm 0,08$ Foci und nach 24 h $1,69 \pm 0,07$ Foci nachgewiesen. Für 53BP1 konnte durchschnittlich in der Kontrolle $0,23 \pm 0,01$ Foci nach Induktion $10,88 \pm 0,07$ Foci, nach 8 h $4,9 \pm 0,08$ Foci und nach 24 h $1,73 \pm 0,05$ Foci gezählt werden. Für γ H2AX konnten durchschnittlich in der Kontrolle $0,21 \pm 0,01$ Foci, nach 0,25 h $10,82 \pm 0,29$ Foci, nach 8 h $4,79 \pm 0,08$ Foci und nach 24 h $1,41 \pm 0,09$ Foci detektiert werden. (Tabelle 4)

Tabelle 4: Durchschnittliche Foci-Anzahl pro Zellkern und dazugehöriger Standardfehler

	Kontrolle	1 Gy\0,25 h	2 Gy\8 h	2 Gy\24 h
ATM	0,21 ± 0,01	11,27 ± 0,1	4,94 ± 0,08	1,69 ± 0,07
53BP1	0,23 ± 0,01	10,88 ± 0,07	4,9 ± 0,08	1,73 ± 0,05
γH2AX	0,21 ± 0,01	10,82 ± 0,29	4,79 ± 0,08	1,41 ± 0,09

Abbildung 12 zeigt die Foci-Anzahl an den unterschiedlichen Reparaturzeitpunkten mit den zugehörigen Standardfehlern für alle untersuchten Proben. Die Quantifizierung von DSBs durch den Nachweis von ATM/53BP1/γH2AX-Foci war für die jeweils betrachteten Reparaturzeitpunkte sehr ähnlich. Jedoch wurden durch die Markierung von ATM und 53BP1 geringfügig mehr Foci detektiert als bei γH2AX.

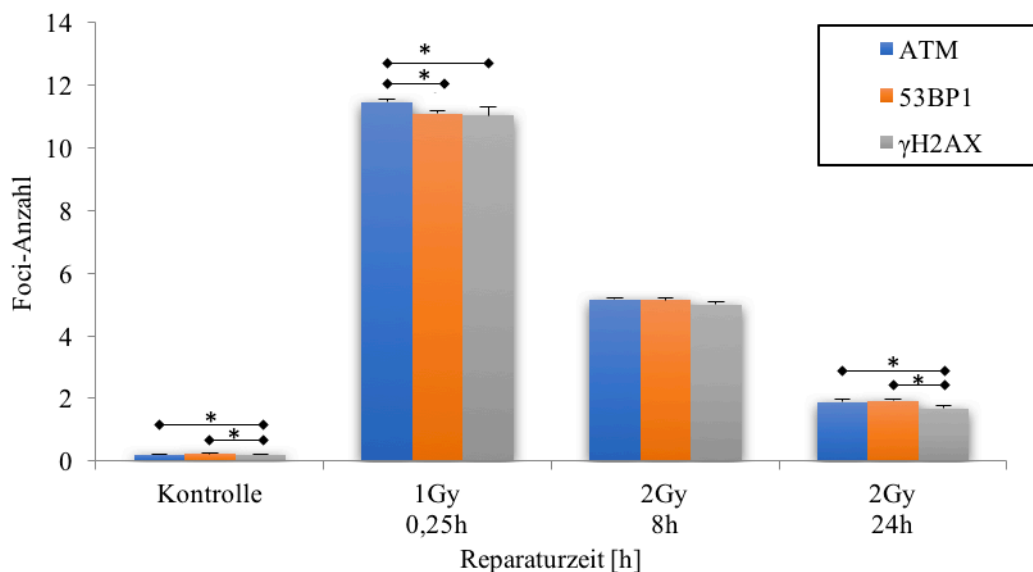


Abbildung 12: Vergleich ATM, 53BP1 und γH2AX. Dargestellt wurde die durchschnittliche Foci-Anzahl der Kontrolle, der Induktion nach 15 min, nach 8- und nach 24 h mit den zugehörigen Standardfehlern. * markiert signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ergebnissen.

Diese Ergebnisse wurden mit dem Mann-Whitney-Test statistisch nachgewiesen. Für ATM und γH2AX wurden mit $p = 0,042$ in der Kontrolle, mit $p = 0,001$ in der Induktion und mit $p = 0,025$ nach 24 h signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede bei der Quantifizierung der Foci nachgewiesen. Beim Vergleich von 53BP1 mit γH2AX lag bei den Kontrollen mit $p = 0,002$ und nach 24 h mit $p = 0,001$ eine Signifikanz vor. Außerdem zeigte sich ein signifikanter

Unterschied zwischen ATM und 53BP1 15 min nach Induktion, welcher bei den späteren Kontrollzeitpunkten nicht mehr nachweisbar war.

Im direkten Vergleich zwischen den drei Reparaturfaktoren bedeutet dies, dass für γ H2AX geringfügig weniger Foci gezählt wurden, als für 53BP1 und ATM.

Tabelle 5: Mann-Whitney Test zum Vergleich der drei Antikörperfärbungen untereinander, Signifikant ab $p < 0,05$ (*)

	ATM vs. γ H2AX	53BP1 vs. γ H2AX	ATM vs. 53BP1
Kontrolle	$p = 0,042^*$	$p = 0,002^*$	$p = 0,173$
15 min	$p = 0,001^*$	$p = 0,392$	$p = 0,013^*$
8 h	$p = 0,117$	$p = 0,194$	$p = 0,79$
24 h	$p = 0,025^*$	$p = 0,001^*$	$p = 0,168$

5 Diskussion

Als mögliche Ursache für die Entstehung von malignen Erkrankungen im Kindesalter wird eine Einschränkung in der DNA-Reparatur, und die damit verbundene Akkumulation von DNA-Schäden und Mutationen diskutiert. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit durch einen Vergleich der DSB-Reparaturkapazität mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bei Kindern mit Tumorerkrankungen und gesunden Kindern nach ex-vivo Bestrahlung der Blutlymphozyten überprüft.

Darüber hinaus war das Ziel dieser Arbeit der Vergleich unterschiedlicher an der Reparatur von DSBs beteiligter Proteine, die möglicherweise zur Etablierung eines prädiktiven Tests zur frühzeitigen Erkennung von unerkannten Defekten in der DNA-Reparatur genutzt werden können. Dies könnte dazu beitragen das Risiko von Nebenwirkungen, die im Rahmen der Strahlentherapie zu schwerwiegenden Komplikationen führen können, vor Therapiebeginn besser einzuschätzen.

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv zeigte eine Tendenz zur vermehrten Ausbildung von Foci nach Bestrahlung im Vergleich zu gesunden Patienten. Da die gemessenen Werte im oberen Normbereich lagen und teilweise Signifikanzen aufwiesen liegt die Vermutung nah, dass Kinder mit malignen Erkrankungen möglicherweise Einschränkungen in der Reparatur von DSBs aufweisen. Hierbei lässt jedoch die geringe Anzahl an Probanden nur eine eingeschränkte Aussage über die Reparaturkinetik von Kindern mit malignen Erkrankungen zu. Darüber hinaus wurden drei Reparaturfaktoren der DSB-Schadensantwort analysiert und miteinander verglichen. Diese stellen jede für sich zuverlässig den Verlauf der DNA-Reparatur mittels Darstellung durch Foci dar.

5.1 Kritische Betrachtung der eigenen Untersuchungen

5.1.1 Vergleich der DSB- Reparaturkinetik von Kindern mit malignen Erkrankungen mit der nicht bestrahlten Kontrollgruppe

Vor der Bestrahlung konnten in der Antikörperfärbung mit 53BP1 signifikante Unterschiede zwischen gesunden Kontrollkindern und erkrankten Kinder festgestellt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass mit $0,23 \pm 0,15$ Foci für die Gruppe der Tumorkinder und $0,25 \pm 0,01$ Foci für die Kontrollgruppe der Unterschied in der Anzahl der Foci vor Bestrahlung sehr

gering ist. Dies ist möglicherweise auf die Darstellung von Foci in der 53BP1 Antikörperfärbung zurück zu führen, bei der es gelegentlich zum Anfärben von Hintergrund kommt, der keinen DSB darstellt.

Die Lymphozyten der Gruppe der Tumorkinder wurden möglichst vor Chemo- oder Strahlentherapie entnommen, so dass Einflüsse auf die DSB-Reparatur und die Anzahl der Foci, die durch die Therapie hervorgerufen werden können, möglichst niedrig gehalten wurde. Die Induktion, die mit 1 Gy durchgeführt wurde, wies in der Gruppe der kranken Kinder mehr Foci im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollkinder auf. Da jedoch in einigen dieser Proben nur eine verminderte Anzahl an Lymphozyten auf den Objektträgern fixiert werden konnte, wurde zu Gunsten einer besseren Auswertbarkeit das Versuchsprotokoll während der laufenden Studie geändert. Die Verdopplung der Fixierzeit von 10 min auf 20 min hatte möglicherweise einen Einfluss auf die quantitative Analyse, da in den hiervon betroffenen Proben eventuell eine Selektion von Zellen stattgefunden hat. Bereits geschädigte Lymphozyten mit vermehrten Foci waren hierdurch möglicherweise nicht mehr vorhanden und nachweisbar, was in einen niedrigeren Foci-Gesamtwert nach Induktion im Vergleich zu den Tumorkindern resultierte. Dieser Unterschied war nach 8 h und 24 h jedoch wesentlich geringer, wodurch er nicht mehr nachweisbar war. Es ist zu berücksichtigen, dass die Induktion mit 1 Gy in erster Linie dem Nachweis von durch Strahlung entstandenen Foci im Sinne von DSBs dient und das wesentliche Augenmerk dieser Arbeit in der Reparaturkinetik von DSBs, also nach 8 h und 24 h, lag.

Es konnten 8 h nach Bestrahlung ähnlich viele Foci in der Gruppe der erkrankten Tumorkinder und der Gruppe der Kontrollkinder gezählt werden. Dabei wiesen einzelne Proben immer wieder deutlich erhöhte Foci Zahlen in allen drei Antikörperfärbungen auf. Die Proben GRJN, GSLA, KNCA und MRNO zeigten dabei durchweg erhöhte Anzahlen von Foci. Bei dem Patient GRJN wurde mit 5,75 Jahren ein Medulloblastom, bei dem Patienten GSLA mit 14,75 Jahren ein Osteosarkom, bei dem Patient KNCA mit 3,02 Jahren eine ALL und bei dem Patient MRNO ein Ewing Sarkom diagnostiziert. Alle Blutproben wurden vor Einleitung einer Radio- oder Chemotherapie abgenommen und untersucht (vgl. Abbildung 5).

Der Patient GRJN erhielt nach Diagnose eines Medulloblastoms, eine kombinierte Radio-Chemotherapie unter der der Patient eine Leukenzephalopathie mit letalem Ausgang entwickelte. Es liegt die Vermutung nahe, dass die erhöhte Anzahl an gemessenen Foci und die mögliche Einschränkung der DSB Reparatur im Rahmen der Radio- Chemotherapie, in direktem Zusammenhang stehen und so zu ausgeprägten Nebenwirkungen geführt haben.

Untersuchungen am gleichen Patientenkollektiv, die die Nebenwirkungen unter Radio-Chemotherapie in Zusammenhang mit Einschränkungen der DSB-Reparaturkinetik betrachtet haben, konnten klinisch Strahlenschäden vom Grad 4, also lebensbedrohlich, bei den Patienten GRJN, HFLA, MRME und SHAA feststellen (SCHULER et al., 2014). Die Proben HFLA, MRME und SHAA wiesen keine Auffälligkeiten in der Betrachtung der Foci 8 h und 24 h nach Bestrahlung auf.

An dieser Stelle soll der Fall der Patientin DRLE (Probe Nr. 200053, vgl. Abbildung 5) exemplarisch diskutiert werden. Mit 12 Jahren wurde ein Glioblastoma multiforme Grad IV mit einem Durchmesser von 6 cm x 4 cm x 6 cm und ein Astrozytom Grad I diagnostiziert. Nach Tumorresektion mit positivem Resektionsrand wurde eine Chemotherapie eingeleitet, die zu Konsolidierung der Erkrankung führte. Außerdem wurde mit einer Bestrahlung des Kopfes begonnen, die auf eine Gesamtreferenzdosis von 59,4 Gy angelegt war und auf 33 Fraktionen mit je 1,8 Gy verteilt wurde. Sieben Monate nach der Erstdiagnose wurde außerdem eine cALL mit hochgradiger Infiltration von Leukämiezellen im Knochenmark, mehr als 95%, diagnostiziert, woraufhin die Chemotherapie studiengerecht umgestellt wurde. Besonders auffallend bei der Patientin war die positive Familienanamnese. Beide Elternteile waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gesund und hatten keinerlei Vorerkrankungen. Der zwei Jahre jüngere Bruder der Probandin verstarb jedoch kurz zuvor an einem Glioblastom. Außerdem sind sowohl väterlicherseits, als auch mütterlicherseits Tumorerkrankungen bei nahen Verwandten bekannt, unter anderem ein malignes Melanom, ein Meningeom und eine Leukämie. Die weiterführende Diagnostik der Humangenetiker ergab keinen Hinweis der die Erkrankung der Patientin und ihres Bruders an der gleichen Tumorart erklären könnte. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um eine noch nicht bekannte, seltene rezessiv vererbte Erkrankung. Auch die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenzmikroskopie erbrachte keinen eindeutigen Hinweis auf eine Einschränkung der DSB-Reparatur. So waren nach der Markierung von ATM in der unbestrahlten Kontrolle 0,18 Foci, nach Induktion 11,98 Foci, nach 8 h 5 Foci und nach 24 h 2,24 Foci vorhanden. Diese Werte zeigen somit keinen eindeutigen Anhalt für einen Reparaturdefekt der DNA.

Im Vergleich dazu zeigte eine vorhergegangene Pilotstudie mit einem deutlich kleineren Probenumfang signifikante Unterschiede zwischen gesunden Kontrollkindern (2 Gy: $2,8 \pm 0,2$) und der Gruppe der Tumorkinder (2 Gy: $3,8 \pm 0,2$) unter Bestrahlung von 2 Gy nach 8 h (RÜBE CE, 2009). Dabei konnte insbesondere in 3 von 23 untersuchten Kinder eine deutlich erhöhte Anzahl von Foci 8 h nach Bestrahlung nachgewiesen werden (RÜBE CE, 2009). Bei

näherer Betrachtung dieser drei Kinder konnten Erkrankungen wie beispielsweise das Turcot-Syndrom diagnostiziert werden, welches mit der fehlerhaften Replikation von DNA einhergehen und somit einen Hinweis für erhöhte Anzahl an Foci liefern kann (RÜBE CE, 2009).

Im Vergleich zu einer weiteren Studie, in der homozygote Kinder mit AT gegenüber heterozygoten Patienten mit AT und gesunden Kontrollen verglichen wurden, konnten mittels der ATM, der 53BP1 und der γ H2AX-Antikörperfärbung deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen dargestellt werden (SCHULER et al., 2014). So konnten in der Gruppe der AT-Kinder 6,52 Foci nach 8 h und 5,57 Foci nach 24 h mit γ H2AX-Antikörperfärbung dargestellt werden, was einen signifikanten Unterschied gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ausmachte. Bei den heterozygoten Patienten konnten 4,94 Foci nach 8 h und 2,94 Foci nach 24 h gezählt werden, während bei den gesunden Kontrollen 3,94 Foci nach 8 h und 2,19 Foci nach 24 h vorlagen (KAISER, 2012). Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit lag die Anzahl der Foci in der Gruppe der gesunden Kontrollen 8 h nach Bestrahlung bei 3,94 Foci gegenüber 5,15 Foci und 24 h nach Bestrahlung bei 2,19 Foci gegenüber 1,23. Es zeigte sich somit ein Unterschied von 1,21 Foci nach 8 h und 0,96 Foci nach 24 h. Da das Probenkollektiv der vorliegenden Arbeit über mehrere Jahre gesammelt und zunächst kryokonserviert wurde, ist zu diskutieren, ob die Kryokonservierung und spätere Aufbereitung Einfluss auf die Anzahl der gezählten Foci nimmt und ob möglicherweise dadurch nicht nur DSBs, sondern auch weitere Strukturen als Foci dargestellt werden. Verglichen mit den erkrankten Kindern aus dieser Arbeit lag ebenfalls ein signifikanter Unterschied 24 h nach Bestrahlung mit $p = 0,038$ in der γ H2AX-Antikörperfärbung vor. So waren $1,49 \pm 0,05$ Foci in der Gruppe der erkrankten Kinder gegenüber $1,225 \pm 0,11$ Foci in der gesunden Kontrollgruppe darstellbar (vgl. Tabelle 3).

5.1.2 Wahl der Reparaturzeitpunkte und Strahlendosen

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Reparatur von DSBs nach 24 h annähernd abgeschlossen ist (GOODARZI et al., 2010). Ebenfalls wird in der Literatur beschrieben, dass die Betrachtung über einen Zeitraum zwischen einem Tag und vier Wochen nach Bestrahlung keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der nachgewiesenen und verbliebenen Foci ergab. Zellen, die mit 2 Gy bestrahlt wurden und nach mehreren Tagen in Apoptose gingen, zeigten keine Anhäufung bezüglich der Ausbildung von 53BP1 und γ H2AX Foci (MARKOVA E, 2011).

Um die Reparaturkinetik zu betrachten, wurden in dieser Arbeit die Proben mit 2 Gy bestrahlt und nach 8 h und 24 h analysiert. Dies bietet den Vorteil, dass ebenfalls Rückschlüsse auf die therapeutische Strahlentherapie gezogen werden können, da die Strahlendosis bei fraktionierter Bestrahlung im Bereich von 1,8 Gy- 2,0 Gy liegt.

Ferner erfolgte die Quantifizierung nach 15 min und 1 Gy Bestrahlung um die Anzahl an induzierten DSBs zuverlässig nachzuweisen. Bei hohen Dosen würden sich hingegen die Fluoreszenzsignale räumlich naher Foci überschneiden, wodurch sie nicht mehr klar zu differenzieren wären, und so die tatsächliche Anzahl unterschätzt würde.

5.1.3 Quantifizierung der Foci

Es gibt verschiedene Verfahren, um DSBs zu quantifizieren: die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), der Komet-Assay und die Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM).

Während bei PFGE und Komet-Assay sehr hohe Strahlendosen (zwischen 20-100 Gy) erforderlich sind, ist der Nachweis von DSBs durch Immunfluoreszenzmikroskopie weitaus sensitiver. Bereits 10 mGy können anhand der Quantifizierung von DSBs durch Foci detektiert werden (ROTHKAMM, LOBRICH, 2003).

Die Histonvariante γ H2AX kann als Foci mittels IFM für die Darstellung der Lokalisation von DSBs verwendet werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein großer Unterschied zwischen der Betrachtung der Reparaturkinetik mittels PFGE und der Auszählung von Foci besteht (KINNER A, 2008). Mit der IFM-Methode wird die Lokalisation von DSBs mittels Foci sichtbar gemacht und kann so den Verlauf der Reparatur von DSB veranschaulichen. Die PFGE weist hingegen die DSBs physikalisch nach und bietet keine Aussage über die Lokalisation von DSB innerhalb der Zelle (KINNER A, 2008).

Die Auszählung der DSBs erforderte einen hohen zeitlichen Aufwand. Da die Foci-Erkennung abhängig vom Untersucher war, wurden die Proben einer Studie stets von der gleichen Person quantifiziert, um die individuelle Abweichung möglichst gering zu halten. Insbesondere die Abgrenzung zwischen dem Hintergrundsignal und den Foci führt zu Unterschieden in den Ergebnissen, die auf die individuelle Zählweise des Untersuchers zurückzuführen sind. Deshalb ist der kinetische Verlauf der Reparatur von großer Bedeutung und nicht die absolute Zahl der Foci.

Mit Hilfe der Lymphozyten aus problemlos zugänglichen Blutproben von Patienten können Rückschlüsse auf die Reaktionen anderer Gewebe unter Bestrahlung gezogen werden (RÜBE et al., 2008). In einer experimentellen Studie an Mäusen wurde die Reparaturkinetik von DSBs nach Bestrahlung mit 2 Gy an Herzmuskel, Dünndarm, Lunge und Lymphozyten untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei Markierung mit γ H2AX-Antikörpern die Reparatur von Foci in den unterschiedlichen Gewebearten ähnlich schnell erfolgt und miteinander vergleichbar ist (RÜBE et al., 2008). Außerdem konnten Mäuse mit eingeschränkter DNA-Reparaturkinetik anhand der Anzahl von Foci deutlich von Mäusen mit suffizienter DNA-Reparatur unterschieden werden (RÜBE et al., 2008). Vor diesem Hintergrund und um die Belastung der Kinder möglichst gering zu halten wurden keine invasiven Maßnahmen wie beispielsweise Probenbiopsien durchgeführt, sondern im Rahmen der regulären Blutentnahme zusätzliches Blut entnommen, um die Lymphozyten für die Versuchsreihe mittels IFM zu analysieren.

In aktuellen Forschungsprojekten wird der Nachweis von Reparaturfaktoren und die Quantifizierung von DSBs mit Hilfe der Transmission-Elektronen-Mikroskopie (TEM) untersucht. Diese Methode bietet aufgrund des wesentlich höheren Auflösungsvermögens die Möglichkeit, Zellstrukturen, die wenige Nanometer groß sind, zu untersuchen. Dabei konnten Unterschiede zwischen einer schnelleren Reparatur von DSBs im Euchromatin im Gegensatz zum Heterochromatin beschrieben werden (GOODARZI et al., 2009; RÜBE et al., 2011). Man vermutet, dass aufgrund des hochgradig organisierten Aufbaus des Heterochromatins die Reparaturproteine langsamer an den DSB anlagern können, als dies im Euchromatin der Fall ist. Mittels goldmarkierter Antikörpern gegen Reparaturproteine (53BP1, ATM, DNA-PKcs, pKu70) und Hetero- beziehungsweise Euchromatin spezifischen Histonmodifikationen, wie H3K9me3 und H3K9ac, konnten chromatinabhängige Unterschiede in der Reparaturkinetik mittels TEM visualisiert und analysiert werden (LORAT et al., 2012). Das TEM bietet den Vorteil, auf molekularer Ebene systematisch Ansammlungen von unterschiedlichen Reparaturproteinen während der Reparatur, sogenannte Cluster, zu analysieren. Auch ist es möglich zwischen „aktivierten“ d.h. phosphorylierten Reparaturproteinen und anderweitig modifizierten Reparaturfaktoren zu unterscheiden (LORAT et al., 2012; RÜBE et al., 2011). Erste Ergebnisse zeigten, dass DSBs im Heterochromatin möglicherweise unvollständig repariert werden, da Tage nach der Bestrahlung (> 48h) 53BP1 in sogenannten „Großclustern“ persistiert, ohne dass weitere Bestandteile eines „aktiven“ Reparaturkomplexes, wie die DNA-PKcs und pKu70 nachweisbar sind (LORAT et al., 2012).

Solche Unterschiede können aufgrund der begrenzten Auflösung mittels Foci-Auszählung unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht betrachtet werden. Daher lassen sich die exakte Lokalisation und Dynamik des DSB mittels IFM nur annähernd beurteilen.

Mittels TEM konnte außerdem gezeigt werden, dass der lineare Energietransfer (LET), also die Energie, die ein ionisiertes Teilchen an Materie beim Durchdringen abgibt, zu unterschiedlich stark ausgeprägten Bildung von Clustern führt (LORAT et al., 2016). Im Vergleich von Bestrahlung durch Kohlenstoffionen, welche einen hohen LET aufweisen, zur Bestrahlung mit Photonen, welche einen niedrigen LET aufweisen, zeigten sich Unterschiede in der Reparaturkinetik. Bei Bestrahlung mit hohem LET konnten nach 5 h deutlich mehr Cluster nachgewiesen werden, als bei Bestrahlung mit niedrigem LET. Im Vergleich dazu reduzierte sich die Anzahl an Cluster bei Bestrahlung mit niedrigem LET, so dass nach 5 h die Reparatur der DSBs annähernd abgeschlossen war. Dabei zeigten sich im Heterochromatin komplexere Cluster als im Euchromatin (LORAT et al., 2016). Es wird daher vermutet, dass Schäden durch hohen LET langsamer und unzureichend repariert werden und somit ein höheres Potential besitzen die DNA dauerhaft zu Schädigen.

5.1.4 Betrachtung von Unterschieden der Foci-Detektion

Die an der Behebung von DSBs beteiligten Reparaturproteine ATM, 53BP1 und die Histonmodifikation γ H2AX wurden für unterschiedliche Reparaturzeitpunkte mittels der IFM nachgewiesen, um mögliche Unterschiede in der Detektion von DSBs zu analysieren. Die Markierung von γ H2AX wies im Gegensatz zu ATM und 53BP1 signifikant weniger Foci in den nicht bestrahlten Kontrollen, 15 min und 24 h nach Bestrahlung auf (vgl. Tabelle 5). 8 h nach Bestrahlung lag die Anzahl der Foci in der γ H2AX-Antikörperfärbung mit 4,79 Foci unter der von ATM mit 4,94 Foci und 53BP1 mit 4,9 Foci, der Unterschied war hier jedoch nicht signifikant (vgl.

Tabelle 4).

Hierbei ist vor allem die Lokalisation von H2AX, 53BP1 und ATM von Bedeutung. Während die Histonmodifikation γ H2AX im Megabasen großen Bereichen phosphoryliert wird, akkumulieren ATM und 53BP1 nur im „direkten“ Umfeld des DSB (ROGAKOU et al., 1998). 53BP1 und ATM werden somit als akkumulierte Reparaturproteine am DSB markiert, hingegen wird durch γ H2AX eine Ausbreitung von phosphorylierten H2AX dargestellt. Diese Unterschiede zeigten sich insbesondere durch die Form und Darstellung der Foci.

53BP1-Foci waren unter dem Fluoreszenzmikroskop im Vergleich zu γ H2AX-Foci deutlich besser darstellbar und daher leichter auszuzählen. Bei der γ H2AX-Markierung war, im Vergleich zur ATM- und 53BP1-Färbung, mehr Hintergrund vorhanden, was die Auszählung der Foci erschwerte und eine mögliche Erklärung für die verminderte Anzahl an gezählten γ H2AX-Foci liefert. Diese unterschiedliche Darstellung unter den Antikörperfärbungen erklärt möglicherweise auch den signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl an 53BP1-Foci und ATM-Foci 15min nach Bestrahlung. Dabei lag die absolute Anzahl der Foci nach 15 min in der ATM-Färbung bei 11,27 und in der 53BP1-Färbung bei 10,88 Foci.

Darüber hinaus war das verwendete Fluorchrom zur Markierung von γ H2AX lichtempfindlicher, was zu einem schnelleren Ausbleichen unter der Lichtquelle des Mikroskops führte und hierdurch möglicherweise kleine γ H2AX Foci nicht ausreichend darstellte.

Betrachtet man jedoch die Reparaturkinetiken der unterschiedlichen Reparaturfaktoren innerhalb einer Probe, so bilden diese annähernd denselben Reparaturverlauf ab. In der Literatur wird beschrieben, dass ATM, 53BP1 und γ H2AX Foci bei DSBs in Kolokalisationen auftreten. Dabei bilden sowohl ATM und 53BP1 Foci (SUZUKI et al., 2010), als auch ATM und γ H2AX Foci (SATO et al., 2010) und 53BP1 und γ H2AX Foci Kolokalisationen am DSB aus (FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2002; GROESSER et al., 2011). Es liegt also nah, dass die Foci in den unterschiedlichen Antikörperfärbungen, DSBs im untersuchten Patientenkollektiv zuverlässig als solche darstellten.

5.2 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen aus der Literatur

In einer groß angelegten Studie aus dem Jahr 2009 zeigten sich Hinweise dafür, dass Kinder, die eine maligne Erkrankung überleben, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine erneute maligne Erkrankung im Erwachsenenalter aufweisen (OLSEN JH, 2009). In einer Folgestudie wurden 47 697 Kinder und Jugendliche, die zwischen 1943 und 2005 an Krebs erkrankt waren, erneut untersucht. Dabei zeigte sich ein deutlich erhöhtes Risiko für eine erneute Krebserkrankung im späteren Leben, gegenüber der gesunden Bevölkerung (OLSEN JH, 2009). Die Ursachen hierfür sind unzureichend verstanden, lassen jedoch einen Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und genetischer Prädisposition vermuten. Da bis heute ungeklärt ist, weshalb Kinder im Vergleich zu Erwachsenen an Tumoren erkranken, wurden verschiedene Theorien entwickelt und erforscht. Eine davon ist die in der

vorliegenden Arbeit untersuchte These, dass Kinder mit malignen Erkrankungen möglicherweise eine Einschränkung in ihrer DNA-Reparaturkapazität besitzen, wie es beispielsweise bei Kindern mit AT der Fall ist.

In einer vorangegangenen Pilotstudie des Labors wurden Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Defekten in der DNA-Reparatur und der Entstehung solider Tumore gezeigt (RÜBE CE, 2009). Es wurde die DNA-Reparaturkapazität von 23 Kindern mit soliden Tumoren, möglichst vor Beginn einer Chemo- oder Strahlentherapie, untersucht. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde die DSB-Reparatur mittels IFM in Lymphozyten analysiert. Die Bestrahlung wurde mit einer Dosis von 2 Gy durchgeführt und nach 8 h die vorhandenen γ H2AX-Foci gezählt. In der Gruppe der Tumorkinder wurden durchschnittlich $3,8 \pm 0,2$ Foci pro Zelle nachgewiesen, was im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied darstellte ($p = 0,006$). Außerdem fielen 4 Kinder durch eine deutliche Einschränkung in der DSB-Reparaturkinetik auf. Zwei der betroffenen Kinder entwickelten infolge der Bestrahlung lebensbedrohliche, beziehungsweise letale Komplikationen, eine radiogene Pneumonitis und eine letale Rückenmarksnekrose. Bei diesen auffälligen Kindern wurden außerdem Syndrome diagnostiziert die mit einer eingeschränkten DNA-Reparatur oder der fehlerhaften Zellteilung einhergehen, wie das Turcot-, das Li-Fraumeni Syndrom und die Fanconi Anämie. Die Ergebnisse der Pilotstudie ließen einen Zusammenhang zwischen der Entstehung maligner Erkrankungen im Kindesalter und einem DSB-Reparaturdefizit vermuten, welche darüber hinaus auch für eine erhöhte Strahlensensibilität verantwortlich sein könnte (RÜBE CE, 2009). Die Arbeit lässt vermuten, dass durch das frühzeitige Erkennen einer eingeschränkten DNA-Reparatur die Therapie, insbesondere die Bestrahlung, besser angepasst werden könnte (RÜBE CE, 2009).

Im Vergleich zur vorherigen Studie konnte in der hier vorliegenden Arbeit trotz erweitertem Patientenkollektiv ($n = 45$) nur geringe Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Tumorerkrankung und eingeschränkter DNA-Reparatur gezeigt werden. Da die gezählte Anzahl an Foci in der Gruppe der kranken Kinder jedoch insbesondere 24 h nach Bestrahlung im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht war, liegt die Vermutung nah, dass möglicherweise in Gruppe der kranken Kinder Einschränkungen in der Reparatur von DSBs vorlagen. Einzelne Proben wiesen eine deutlich erhöhte Anzahl an Foci 8 h und 24 h nach Bestrahlung auf (vgl. Kapitel 5.1.1).

Zu berücksichtigen sind die unterschiedlichen Aufbereitungsarten der Blutproben. So wurden in der vorangegangenen Studie die isolierten Lymphozyten direkt untersucht und ausgewertet,

wohingegen in der vorliegenden Arbeit eine Probenaquirierung und Kryokonservierung über einen Zeitraum von 2 Jahren erfolgte. Die Bestrahlung und Untersuchung der Lymphozyten fand nach Auftauen und Lagerung in entsprechendem Medium statt. Durch die Kryokonservierung erfolgte möglicherweise eine Selektion zwischen Zellen mit und ohne DNA-Schäden, wodurch bereits geschädigte Zellen die Prozedur des Auftauens und Kultivierens vermutlich nicht überlebten.

In der vorliegenden Arbeit konnten bei zuvor kryokonservierten Lymphozyten, die 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy fixiert wurden, $10,82 \pm 0,29$ Foci pro Zelle mit γ H2AX-Antikörpermarkierung detektiert werden. Ähnliche Versuchsaufbauten an direkt nach Entnahme bestrahlten Lymphozyten ergaben bei 1 Gy nach 30 min $9,31 \pm 1,1$ Foci (SCHERTHAN H, 2008). Diese Ergebnisse zeigen im Vergleich eine gemeinsame Tendenz in der Ausbildung von Foci trotz unterschiedlich gewählter Messzeitpunkte für die Induktion.

In der Pilotstudie von 2009 wurden die Kontrollkinder bezüglich des Alters passend zu den Tumorkindern ausgesucht. Dies erfordert einen großen Rekrutierungsaufwand, weshalb in dieser Versuchsreihe darauf verzichtet und auf einen bestehenden Pool von gesunden Kontrollkindern zurückgegriffen wurde. In der Literatur wird jedoch beschrieben, dass die Anzahl der Foci mit dem Alter pro Zelle zunimmt. In einem ähnlich aufgebauten Versuch konnte ein signifikanter Unterschied in der DNA-Reparaturkinetik und dem Auftreten von DSBs vor Bestrahlung zwischen Stammzellen aus Nabelschnurblut von Neugeborenen und Knochenmark von über 50-jährigen festgestellt werden (RÜBE CE, 2011). Im Nabelschnurblut der Neugeborenen konnten in CD34+ Zellen $0,102 \pm 0,006$ Foci, in CD34+ Zellen von unter 50-jährigen Erwachsenen $0,184 \pm 0,015$ Foci und in CD34+ Zellen von über 50-jährigen Erwachsenen sogar $0,245 \pm 0,023$ Foci nachgewiesen werden. Es lagen zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen signifikante Unterschiede vor, die die Vermutung nahe legt, dass sich DSBs über die Lebenszeit akkumulieren (RÜBE CE, 2011). In den untersuchten Proben der vorliegenden Arbeit lag die Anzahl der Foci vor Bestrahlung in der Gruppe der erkrankten Kinder für die ATM-Antikörpermarkierung bei $0,21 \pm 0,01$ Foci, für die 53BP1-Antikörpermarkierung bei $0,23 \pm 0,15$ Foci und für die γ H2AX-Antikörpermarkierung bei $0,22 \pm 0,02$ Foci. Diese Ergebnisse zeigten im Vergleich zur oben genannten Studie ebenfalls eine gemeinsame Tendenz von bereits vor Bestrahlung bestehenden Foci, aufgrund von technischer Ausstattung, Probenmaterial und individueller Zählweise jedoch Unterschiede in der absoluten Anzahl der Foci.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Reparaturkinetik von DSBs unterschiedlich schnell verläuft. So werden zu Beginn der DNA-Reparatur DSBs scheinbar schneller repariert, als 24 h nach der Bestrahlung. Zu noch späteren Zeitpunkten findet kaum noch eine Reparatur von DSBs statt (SEDELNIKOVA OA, 2008). Es wird kontrovers diskutiert, ob dies möglicherweise auf die Schwere der DNA-Schäden zurückzuführen ist, so dass zunächst die vielen einfacheren Schäden repariert werden und anschließend die Gravierenderen (REDON CE, 2009).

5.3 Schlussfolgerungen

Bei dem untersuchten Probenkollektiv konnten geringe Unterschiede in der Anzahl der Foci 8 h und 24 h nach Bestrahlung zwischen Kontrollgruppe und erkrankten Kindern festgestellt werden. Dabei fielen vor allem in der Einzelbetrachtung Proben auf, die eine durchschnittlich erhöhte Anzahl an Foci in allen drei Antikörperfärbungen aufwiesen. Die Tatsache, dass die Anzahl der Foci in der Gruppe der erkrankten Kinder 24 h nach Bestrahlung erhöht war, lässt vermuten, dass es möglicherweise Einschränkungen in der Reparaturkinetik von Kindern mit malignen Erkrankungen gibt. In der γ H2AX-Antikörpermarkierung war der Unterschied zwischen Tumorkindern und gesunder Kontrollgruppe 24 h nach Bestrahlung mit $p = 0,038$ sogar signifikant. Es empfiehlt sich in weiterführenden Studien zu untersuchen inwieweit kryokonservierte Zellen gegenüber sofort untersuchten Zellen Unterschiede in der Anzahl der Foci aufweisen und ob Unterschiede zwischen Kindern mit malignen Erkrankungen und gesunden Kindern, durch Erhöhung des zu untersuchenden Kollektivs, besser dargestellt werden können.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

1. Adams JM, Cory S (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26:1324-1337
2. Alberts B HK, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (eds) (2005) *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 179 ff., 195ff., 649 ff.
3. Assenmacher N, Hopfner KP (2004) MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113:157-166
4. Barnes DE, Tomkinson AE, Lehmann AR, Webster AD, Lindahl T (1992) Mutations in the DNA ligase I gene of an individual with immunodeficiencies and cellular hypersensitivity to DNA-damaging agents. *Cell* 69:495-503
5. Baumann P, Benson FE, West SC (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87:757-766
6. Bhogal N, Jalali F, Bristow RG (2009) Microscopic imaging of DNA repair foci in irradiated normal tissues. *International journal of radiation biology* 85:732-746
7. Boder E, Sedgwick RP (1958) Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* 21:526-554
8. Burma S, Chen BP, Chen DJ (2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 5:1042-1048
9. Chapman JD, Reuvers AP, Borsa J, Greenstock CL (1973) Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro. *Radiat Res* 56:291-306
10. Chun HH, Gatti RA (2004) Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)* 3:1187-1196
11. Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656
12. Cunliff PN, Mann JR, Cameron AH, Roberts KD, Ward HN (1975) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia. *Br J Radiol* 48:374-376

13. Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH (2008) Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet* 49:383-396
14. D'Amours D, Jackson SP (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:317-327
15. Dimitrova N, Chen YC, Spector DL, de Lange T (2008) 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* 456:524-528
16. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516
17. Erbar P (2002) *Onkologie Compact Lehrbuch*. 4. Auflage Schattauer, Stuttgart, New York: 19.
18. Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A (2002) DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* 4:993-997
19. Geuting V, Reul C, Lobrich M (2013) ATM release at resected double-strand breaks provides heterochromatin reconstitution to facilitate homologous recombination. *PLoS Genet* 9:e1003667
20. Goetz JD, Motycka TA, Han M, Jasin M, Tomkinson AE (2005) Reduced repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination in a DNA ligase I-deficient human cell line. *DNA Repair (Amst)* 4:649-654
21. Goodarzi AA, Noon AT, Jeggo PA (2009) The impact of heterochromatin on DSB repair. *Biochem Soc Trans* 37:569-576
22. Goodarzi AA, 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)* 9:1273-1282
23. Gortner L MS, Sitzmann FC (2012) *Duale Reihe Pädiatrie*. 4. Auflage Thieme, Stuttgart:471- 473
24. Groesser T, Chang H, Fontenay G, Chen J, Costes SV, Helen Barcellos-Hoff M, Parvin B, Rydberg B (2011) Persistence of gamma-H2AX and 53BP1 foci in proliferating and

non-proliferating human mammary epithelial cells after exposure to gamma-rays or iron ions. Int J Radiat Biol 87:696-710

25. Gupta RC, Bazemore LR, Golub EI, Radding CM (1997) Activities of human recombination protein Rad51. Proc Natl Acad Sci U S A 94:463-468

26. Harms V (2006) Physik für Mediziner und Pharmazeuten. 17 Auflage Harms Verlag, Lindhöft:200- 205

27. Harten U (2011) Physik für Mediziner. 13. Auflage Springer Medizin Verlag, Heidelberg:334

28. Herold Ge (2011) Innere Medizin. 2011 Herold und Mitarbeiter:60-61

29. Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhattar R, Bedford MT, Jenuwein T, Berger SL (2007) p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. Nature 449:105-108

30. Iliakis GE, Cicilioni O, Metzger L (1991) Measurement of DNA double-strand breaks in CHO cells at various stages of the cell cycle using pulsed field gel electrophoresis: calibration by means of ¹²⁵I decay. Int J Radiat Biol 59:343-357

31. International Commission on Radiation U, Measurements (2011) Report 85: Fundamental quantities and units for ionizing radiation. J ICRU 11:1-31

32. Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. Carcinogenesis 23:687-696

33. Jeggo P LM (2009) Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? Int J Radiat Biol 85:1061-1081

34. Jeggo PA (1998) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. Radiat Res 150:S80-91

35. Kaiser M (2012) Nachweis des DNA-Reparaturdefektes bei Ataxia teleangiectasia Patienten. univ Diss, Universität des Saarlandes

36. Kinderkrebsregister D (2016) Jahresbericht Annual Report 2016 (1980-2015)
Deutsches Kinderkrebsregister DKKR German Childhood Cancer Registry GCCR.

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

38. Koike M YY, Koike A (2011) Accumulation of Ku70 at DNA double-strand breaks in living epithelial cells. *Experimental cell research* 317:2429-2437
39. Kozlov S GN, Keating K, Ramsay J, Lavin MF (2003) ATP activates ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in vitro. Importance of autophosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 278:9309-9317
40. Krieger H (2009) *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. 3 Auflage Vieweg + Teubner, Wiesbaden:383
41. Kurz EU L-MS (2004) DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA repair* 3:889-900
42. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:712-720
43. Lobrich M, Rydberg B, Cooper PK (1995) Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12050-12054
44. Lorat Y, Schanz S, Schuler N, Wennemuth G, Rube C, Rube CE (2012) Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS One* 7:e38165
45. Lorat Y, Timm S, Jakob B, Taucher-Scholz G, Rube CE (2016) Clustered double-strand breaks in heterochromatin perturb DNA repair after high linear energy transfer irradiation. *Radiother Oncol* 121:154-161
46. Mannironi C BW, Hatch CL (1989) H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic acids research* 17:9113-9126
47. Mari PO, Florea BI, Persengiev SP, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Modesti M, Giglia-Mari G, Bezstarosti K, Demmers JA, Luidert TM, Houtsmuller AB, van Gent DC (2006) Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18597-18602
48. Markova E TJ, Belyaev I (2011) Long time persistence of residual 53BP1/gamma-H2AX foci in human lymphocytes in relationship to apoptosis, chromatin condensation and biological dosimetry. *International journal of radiation biology* 87:736-745

49. Mirzayans R, Severin D, Murray D (2006) Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66:1498-1505
50. Moore JK, Haber JE (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16:2164-2173
51. Morrell D, Cromartie E, Swift M (1986) Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia. *J Natl Cancer Inst* 77:89-92
52. Moynahan ME, Jasin M (2010) Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:196-207
53. Munoz IM, Jowsey PA, Toth R, Rouse J (2007) Phospho-epitope binding by the BRCT domains of hPTIP controls multiple aspects of the cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* 35:5312-5322
54. Olsen JH MT, Anderson H et al (2009) Lifelong cancer incidence in 47,697 patients treated for childhood cancer in the nordic countries. *J Natl Cancer Inst* 806- 813
55. Ozaki T, Nakagawara A (2011) Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)* 3:994-1013
56. Panier S, Boulton SJ (2014) Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:7-18
57. Pardo B G-GB, Aguilera A, (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66:1039-1056
58. Pawlik TM, Keyomarsi K (2004) Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59:928-942
59. Redon C PD, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current opinion in genetics & development* 12:162-169
60. Redon CE DJ, Bonner WM, Sedelnikova OA (2009) gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and

artificial skin. *Advances in space research : the official journal of the Committee on Space Research* 43:1171-1178

61. Richardson C (2005) RAD51, genomic stability, and tumorigenesis. *Cancer Lett* 218:127-139
62. Robert- Koch Institut ZfK (2008) *Krebs bei Kindern. 8.Auflage Robert- Koch Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin:108- 111*
63. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868
64. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-916
65. Rothblum-Oviatt C, Wright J, Lefton-Greif MA, McGrath-Morrow SA, Crawford TO, Lederman HM (2016) Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis* 11:159
66. Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23:5706-5715
67. Rothkamm K, Lobrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5057-5062
68. Rube CE, Grudzenski S, Kuhne M, Dong X, Rief N, Lobrich M, Rube C (2008) DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* 14:6546-6555
69. Rube CE, Lorat Y, Schuler N, Schanz S, Wennemuth G, Rube C (2011) DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA Repair (Amst)* 10:427-437
70. Rube CE FA, Schneider R, Simon K, Kühne M, Fleckenstein J, Graber S, Graf N, Rube C (2009) DNA repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 78:359-369

71. Rube CE FA, Widmann TA, Fürst T, Madry H, Pfreundschuh M, Rube C (2011) Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. *PloS one* 6:17487
72. Sandoval C, Swift M (2003) Hodgkin disease in ataxia-telangiectasia patients with poor outcomes. *Med Pediatr Oncol* 40:162-166
73. Sato K, Nishikino M, Okano Y, Ohshima S, Hasegawa N, Ishino M, Kawachi T, Numasaki H, Teshima T, Nishimura H (2010) gamma-H2AX and phosphorylated ATM focus formation in cancer cells after laser plasma X irradiation. *Radiat Res* 174:436-445
74. Scherthan H HL, Braselmann H, Meineke V, Zitzelsberger H (2008) Accumulation of DSBs in c-H2AX domains fuel chromosomal aberrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371:694- 697
75. Schmoll HJ HK, Possinger K (2006) Kompendium internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie. 4. Auflage Springer Verlag, Heidelberg: :6- 17
76. Schuler N, Palm J, Kaiser M, Betten D, Furtwangler R, Rube C, Graf N, Rube CE (2014) DNA-damage foci to detect and characterize DNA repair alterations in children treated for pediatric malignancies. *PLoS One* 9:e91319
77. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM (2002) Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158:486-492
78. Sedelnikova OA HI, Redon C, Nakamura A, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM (2008) Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging cell* 7:89-100
79. Sedgwick RP, Boder E (1960) Progressive ataxia in childhood with particular reference to ataxia-telangiectasia. *Neurology* 10:705-715
80. Song B, Sung P (2000) Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem* 275:15895-15904
81. Staszewski O NT, Kaina B (2008) Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environ Mol Mutagen* 49:734-740

82. Suzuki K, Takahashi M, Oka Y, Yamauchi M, Suzuki M, Yamashita S (2010) Requirement of ATM-dependent pathway for the repair of a subset of DNA double strand breaks created by restriction endonucleases. *Genome Integr* 1:4
83. Swift M, Morrell D, Cromartie E, Chamberlin AR, Skolnick MH, Bishop DT (1986) The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am J Hum Genet* 39:573-583
84. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17:5497-5508
85. Ting NS, Lee WH (2004) The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair (Amst)* 3:935-944
86. van der Schans GP, Bleichrodt JF, Blok J (1973) Contribution of various types of damage to inactivation of a biologically-active double-stranded circular DNA by gamma-radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 23:133-150
87. Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ (2002) 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298:1435-1438
88. Ward IM MK, Jorda KG, Chen J (2003) Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *The Journal of biological chemistry* 278:19579-19582
89. Weiß C (2008) *Basiswissen medizinische Statistik*. 4 Auflage Springer Verlag, Heidelberg:218- 221
90. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP (2002) BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 297:1837-1848
91. Zeeck A GS, Papastavrou I, Zeeck SC (2005) *Chemie für Mediziner*. 6. Auflage Urban & Fischer, München:175-181

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Zellzyklus (ALBERTS B, 2005).	- 6 -
Abbildung 2: Schematische Darstellung der direkten (a) und der indirekten (b) Strahlenwirkung auf die DNA (KRIEGER H, 2009).	- 9 -
Abbildung 3: Model der Reparatur von DSBs mittels NHEJ (links) und HR (rechts) (PANIER, BOULTON, 2014).	- 10 -
Abbildung 4: Reparaturproteine (γ H2AX und 53BP1) wurden in dem abgebildeten Fibroblast mittels Antikörper markiert und durch IFM visualisiert (BHOGAL N et al., 2009).	- 13 -
Abbildung 5: Patientenkollektiv	- 29 -
Abbildung 6: Verteilung der malignen Erkrankungen des untersuchten Patientenkollektivs. In Klammern ist die durchschnittliche Verteilung gemäß Kinderkrebsregister von 2016 des Robert-Koch Instituts (RKI) angegeben (KINDERKREBSREGISTER, 2016).	- 30 -
Abbildung 7: Fluoreszenzaufnahmen von Lymphozyten (600fache Vergrößerung) nach spezifischer Markierung verschiedener Reparaturproteine (grün) an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit 2 Gy. Blau: Zellkern, markiert mit DAPI.....	- 31 -
Abbildung 8: Poisson-Verteilung. Die beiden Graphen zeigen exemplarisch die Verteilung der ATM-Foci innerhalb der Probe CAFO nach 15 min (links) und 8 h (rechts)	- 32 -
Abbildung 9: Vergleichende Darstellung der ATM-Reparaturkinetik zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Tumorkindern mit eingezeichnetem Standardfehler. Das * entspricht dem signifikantem Unterschied von $p = 0,002$ zwischen den beiden Gruppen in der Induktion nach 0,25 h.	- 34 -
Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der 53BP1-Reparaturkinetik zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Tumorkindern mit eingezeichnetem Standardfehler. Das * entspricht dem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Induktion nach 0,25 h.....	- 35 -
Abbildung 11: Vergleichende Darstellung der γ H2AX-Reparaturkinetik zwischen der gesunden Kontrollgruppe (Kontrollkinder) und den Tumorkindern mit eingezeichnetem Standardfehler.	- 36 -

Abbildung 12: Vergleich ATM, 53BP1 und γ H2AX. Dargestellt wurde die durchschnittliche Foci-Anzahl der Kontrolle, der Induktion nach 15 min, nach 8- und nach 24 h mit den zugehörigen Standardfehlern. * markiert signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ergebnissen. - 37 -

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchschnittliche Focizahl und zugehörige Standardfehler der ATM-Reparaturkinetik und Ergebnis des Mann-Whitney Tests, Signifikant ab $p < 0,05$ (*)..... - 33 -

Tabelle 2: Durchschnittliche Focizahl und zugehörige Standardfehler der 53BP1-Reparaturkinetik und Ergebnis des Mann-Whitney Tests, Signifikant ab $p < 0,05$ (*)..... - 34 -

Tabelle 3: Durchschnittliche Focizahl und zugehörige Standardfehler der γ H2AX-Reparaturkinetik und Ergebnis des Mann-Whitney Tests, Signifikant ab $p < 0,05$ (*)..... - 35 -

Tabelle 4: Durchschnittliche Foci-Anzahl pro Zellkern und dazugehöriger Standardfehler - 37 -

Tabelle 5: Mann-Whitney Test zum Vergleich der drei Antikörperfärbungen untereinander..... - 38 -

7 Publikation / Danksagung

Publikation

Veröffentlicht unter: Schuler N, Palm J, Kaiser M, **Betten D**, Furtwaengler R, Rübe C, Graf N, Rübe C.E. (2014) DNA-Damage Foci to Detect and Characterize DNA Repair Alterations in Children Treated for Pediatric Malignancies. PLoS ONE 9: e91319.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt der Leiterin des strahlenbiologischen Labors der Universität des Saarlandes Frau Prof. Dr. med. C. E. Rübe für das Überlassen des Themas dieser Doktorarbeit. Ihre Anregungen und Kritik haben das Projekt stets nach vorne gebracht und mein Interesse für das wissenschaftliche Arbeiten geweckt.

Vielen Dank an Frau Dr. rer. med. Yvonne Lorat, für den letzten Schliff und die Motivation durchzuhalten. Deine konstruktive Kritik gab mir stets neuen Input.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. rer. nat. A. Fricke für die Betreuung während der experimentellen Phase danken.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. N. Schuler für die Unterstützung und Hilfestellung des theoretischen Teils dieser Doktorarbeit, sowie Frau D. Ludwig für die ständige Bereitschaft meine Fragen rund um das Labor zu beantworten.

Vielen Dank auch an Herrn T. Stukowski für die Hilfe beim Akquirieren der untersuchten Blutproben.

Für die unkomplizierte Zusammenarbeit mit der Klinik für Kinderheilkunde möchte ich Herrn Dr. med. Furtwängler danken.

Ohne die Unterstützung und das Vertrauen meiner Familie wäre diese Arbeit wohl nie zustande gekommen. Daher vielen Dank für alles.

