

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie,  
Labor für Molekulare Radioonkologie (unter der Leitung von Prof. Dr. med. C. E. Rube)  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

und

Aus der Abteilung für Wirkungen und Risiken ionisierender und nichtionisierender Strahlung,  
Fachgebiet Strahlenbiologie (unter der Betreuung von Dr. rer. nat. M. Gomolka)  
Bundesamt für Strahlenschutz, Salzgitter und Neuherberg

Reparaturfoci als Biomarker für Strahlenempfindlichkeit  
und chronische Strahlenexposition

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Martin Detlef Wolfgang Bucher

geb. am: 22.10.1989 in Berlin

Tag der Promotion: 02.03.2021

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese

Prof. Dr. med. Claudia E. Rube

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
1. Zusammenfassung .....	6
Abstract .....	8
2. Einleitung .....	10
2.1 Strahlenbelastung der Bevölkerung durch ionisierende Strahlung .....	10
2.2 DNA Schadensantwort nach Exposition mit ionisierender Strahlung .....	11
2.3 Visualisierung von DNA Doppelstrangbrüchen und Chromosomenschäden .....	15
2.4 Individuelle Strahlenempfindlichkeit .....	18
2.5 Strahlenempfindlichkeit aufgrund von genetischen Veränderungen .....	20
2.6 Berufliche Strahlenexposition bei Uran-Bergarbeiter der Wismut SDAG .....	22
2.7 Zielsetzung und experimenteller Ablauf der Arbeit .....	24
3. Material und Methoden .....	26
3.1 Material .....	26
3.1.1 Primäres Zellmaterial und Zelllinien .....	26
3.1.2 Chemikalien .....	27
3.1.3 Antikörper .....	28
3.1.4 Kommerzielle Kits .....	28
3.1.5 Lösungen, Puffer und Medien .....	29
3.1.6 Geräte und Laborbedarf .....	30
3.1.7 Verbrauchsmaterial .....	31
3.1.8 Software und Datenbanken .....	32
3.2 Methoden .....	33
3.2.1 Gewinnung und Kryokonservierung von humanen Lymphozyten .....	33
3.2.2 Methoden für zellbiologische Arbeiten .....	35
3.2.3 Bestrahlung von Zellen mittels radioaktiver Quellen .....	36
3.2.4 Herstellung von Chromosomenpräparaten .....	37
3.2.5 Analyse von Chromosomenschäden mittels mFISH-Färbung .....	39
3.2.6 Bestimmung des Mitoseindex mittels Giemsa-Färbung .....	43
3.2.7 Nachweis von DNA Doppelstrangbrüchen mittels Reparaturfoci-Analysen .....	44
3.2.8 Proteinnachweis mittels SDS-Gel und <i>Western blot</i> Analyse .....	46
3.2.9 Statistische Analyse .....	48
4. Ergebnisse .....	51
4.1 Nachweis einer genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit .....	51
4.1.1 Charakterisierung des Untersuchungskollektivs .....	51

4.1.2	Nachweis genetisch-bedingter Strahlenempfindlichkeit mittels $\gamma$ H2A.X Analyse .....	55
4.1.3	Nachweis genetisch-bedingter Strahlenempfindlichkeit mittels mFISH Analyse .....	61
4.1.4	Proteinuntersuchungen in lymphoblastoiden Zelllinien von strahlenempfindlichen AT Patienten .....	69
4.2	Untersuchung der DNA Schadensantwort mit Hilfe von RIF in kryokonservierten Lymphozyten .....	74
4.2.1	Etablierung der semi-automatischen Reparaturfoci-Analyse von DNA Reparaturproteinen .....	74
4.2.2	Einfluss der Kryokonservierung auf die semi-automatischen Analyse von RIF .....	84
4.2.3	Einbindung von ungeübten Kräften in die Reparaturfoci-Analyse .....	87
4.3	Nachweis einer chronischen Strahlenexposition.....	92
4.3.1	Charakterisierung des Untersuchungskollektivs der Wismut Bergarbeiter .....	92
4.3.2	Untersuchung der DNA-Reparatur in biologischen Proben von Wismut-Bergarbeitern mittels semi-automatischer RIF Analyse.....	94
4.3.3	Stimulierung von kryokonservierten Lymphozyten zur Analyse von Chromosomenschäden mittels mFISH Analyse .....	104
4.3.4	Untersuchung von Chromosomenschäden in biologischen Proben von Wismut-Bergarbeitern mittels mFISH Analyse .....	107
5.	Diskussion.....	113
5.1	Nachweis einer genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit .....	113
5.1.1	AT und molekulare Auswirkungen durch Mutationen im <i>ATM</i> -Gen verursacht.....	114
5.1.2	$\gamma$ H2A.X Analyse gibt Hinweise auf individuelle Unterschiede bei strahlenempfindlichen AT Patienten .....	115
5.1.3	Chromosomenanalyse detektiert zuverlässig strahlenempfindliche AT Patienten.....	117
5.1.4	Signalisierung von DSB kann mit der Qualität der Reparatur zusammenhängen .....	119
5.1.5	Individuelle Unterschiede in AT Patienten sollten genauer charakterisiert werden .....	120
5.2	Untersuchung der DNA Schadensantwort mit Hilfe von RIF in kryokonservierten Lymphozyten .....	121
5.2.1	Semi-automatische Reparaturfoci-Analyse ermöglicht einen hohen Probendurchsatz.....	121
5.2.2	Kryokonservierung lässt die Möglichkeit der zeitlich entkoppelten Probensammlung und semi-automatischen Reparaturfoci-Analyse zu .....	125
5.2.3	Einbindung von ungeübten Mitarbeitern kann die Untersuchungskapazität der Reparaturfoci-Analyse erhöhen .....	126
5.3	Nachweis einer chronischen Strahlenexposition.....	128

5.3.1	Vorerkrankungen, Lebensstil und Umweltnoxen können die Untersuchungen der Wismut Bergarbeiter verzerren .....	129
5.3.2	Individuelle Unterschiede beeinflussen den Nachweis einer chronischen Strahlenexposition mittels semi-automatischer RIF Analyse .....	131
5.3.3	Kryokonservierte Lymphozyten eignen sich zur Auswertung von Chromosomenschäden mittels mFISH Analyse .....	133
5.3.4	mFISH Analyse gibt Hinweise auf eine vergangene und chronische Strahlenexposition bei Wismut Bergarbeitern .....	134
6.	Verzeichnis.....	138
6.1	Bibliografie .....	138
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	154
6.3	Tabellenverzeichnis.....	155
6.4	Abkürzungsverzeichnis .....	156
7.	Publikationen.....	158
8.	Anhang.....	160
	Danksagung .....	181

## 1. Zusammenfassung

Die Etablierung von Biomarkern zur Vorhersage und Erfassung der individuellen Strahlenreaktion spielt vor dem Hintergrund der Zunahme der zivilisatorischen Strahlenexposition eine entscheidende Rolle im personalisierten Strahlenschutz. Das Ziel dieses Forschungsprojektes war es, ein Hochdurchsatzverfahren zur semi-automatischen Analyse von strahlen-induzierten Reparaturfoci Proteinen der DNA Schadensantwort zu etablieren und diese als potenzielle Biomarker zur Vorhersage einer Strahlenempfindlichkeit und zum Nachweis einer zurückliegenden, chronischen Strahlenexposition zu validieren. Ausgangspunkt der Untersuchungen war dabei zum einen die Visualisierung und Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X und weiteren Signalisierungs- und Reparaturproteinen der DNA Schadensantwort mittels Immunfluoreszenzfärbung, welche in der Strahlenbiologie zum Nachweis von DNA Doppelstrangbrüchen nach Exposition mit ionisierender Strahlung Anwendung findet. Zum anderen kann die Analyse von Chromosomenschäden Rückschlüsse auf die Qualität der DNA Schadensantwort liefern. Im Verlauf des Projektes wurde zunächst eine semi-automatische Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Foci und Analyse von Chromosomenaberrationen nach *in vitro* Bestrahlung primärer Lymphozyten von acht Patienten mit Ataxia teleangiectatica durchgeführt, um festzustellen, ob diese Testverfahren und Biomarker zum Nachweis einer ausgeprägten, genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit geeignet sind. Dabei zeigte die Foci Analyse individuelle Variationen in der Signalisierung und Reparatur der DNA Doppelstrangbrüche zwischen den einzelnen Patienten, sodass ein Nachweis der Strahlenempfindlichkeit nicht für alle Patienten möglich war. Im Gegensatz dazu erlaubte die Analyse von Chromosomenschäden den eindeutigen Nachweis der Strahlenempfindlichkeit anhand von erhöhten Aberrationsraten und einer starken Schädigung der Zellen.

Unterschiede in der DNA Schadensantwort zwischen einzelnen Individuen erfordern eine genauere Charakterisierung in großen Untersuchungskollektiven. In solchen molekular-epidemiologischen Studien ist durch das komplexe Versuchsdesign die Sammlung, Lagerung und zeitversetzte Untersuchung von biologischen Proben notwendig. Im Projekt wurde daher eine semi-automatische Reparaturfoci-Analyse für  $\gamma$ H2A.X, 53BP1, MDC1 und pKAP1 in kryokonservierten Lymphozyten etabliert. In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde die Signalisierung und Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen mithilfe einer Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik nachgewiesen. Während für  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 keine signifikanten Unterschiede zwischen kryokonservierten und frisch isolierten Lymphozyten beobachtet wurden, konnten für pKAP1 quantitative Unterschiede nach Bestrahlung festgestellt werden.

Trotz semi-automatischer Testverfahren erreichen Labore schnell ihre Kapazitätsgrenze bei einer hohen Probenanzahl. Im Weiteren wurde daher die Einbindung von ungeübten Mitarbeitern in die Reparaturfoci-Analyse geprüft. Die Untersuchungen konnten zeigen, dass sowohl bei der praktischen Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung als auch bei der manuellen Foci-Zählung der Probendurchsatz durch ungeübte Mitarbeiter erhöht werden kann.

Um zu überprüfen, ob die etablierte, semi-automatische Reparaturfoci-Analyse schließlich in molekular-epidemiologischen Studien eingesetzt werden kann und damit der Nachweis einer vergangenen, chronischen Strahlenexposition möglich ist, wurde die Anzahl der Foci von  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und pKAP1 nach *in vitro* Bestrahlung in kryokonservierten Lymphozyten von 106 ehemaligen Uran Bergarbeitern bestimmt. Dabei wurde mittels Foci Quantifizierung der Effekt einer *in vitro* Bestrahlung in den Proben der Bergarbeiter gezeigt. Hingegen konnte eine lang zurückliegende, chronische Strahlenbelastung oder der Einfluss der Expositionshöhe aufgrund von interindividuellen und interexperimentellen Variationen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Untersuchungen von Chromosomenschäden deuten jedoch daraufhin, dass die Expositionshöhe der chronischen Strahlenbelastung einen Einfluss auf die Anzahl der geschädigten Zellen und komplexen Aberrationen haben könnte.

Zusammenfassend ermöglicht die etablierte, semi-automatische Reparaturfoci-Analyse die Untersuchung der Signalisierung und Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen in kryokonservierten Lymphozyten. Die erhaltenen Ergebnisse sind durch die hohe interindividuelle und interexperimentelle Variation beeinflusst, wodurch die Nutzung als Biomarker zum eindeutigen Nachweis einer genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit oder vergangenen, chronischen Strahlenexposition in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht ohne weiteres möglich war. Im Gegensatz erlaubte die Analyse von Chromosomenschäden die Identifikation einer genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit und gab Hinweise auf eine chronische Strahlenbelastung. Diese Untersuchungsmethoden sind jedoch meist teuer, zeit- und arbeitsaufwändig und daher nicht als Routineanalyse für eine hohe Probenanzahl geeignet. Zur Erforschung von Ursachen und Einflussfaktoren der individuellen Strahlenempfindlichkeit ist die Untersuchung von großen Untersuchungskollektiven mit einer Kombination verschiedener Testverfahren nötig. Der Einsatz der Reparaturfoci-Analyse als Hochdurchsatzverfahren sollte damit einen wichtigen Bestandteil in zukünftigen molekular-epidemiologischen Studien der strahlenbiologischen Forschung darstellen.

## Abstract

Reliable biomarkers detecting and predicting individual adverse effects of ionizing radiation exposure are urgently warranted to implement precautionary radiation protection measures due to an increase in man-made radiation exposure. Visualization and quantification of DNA damage response proteins enables the detection of radiation-induced DNA double-strand breaks and the investigation of DNA damage signaling and –repair. In addition, analysis of number and type of chromosomal aberrations provide an indication of the quality of repair processes.

Therefore, the aim of this study was to establish a high-throughput quantification of radiation-induced foci by semi-automatic immunofluorescence microscopy and to validate them as potential biomarker to predict radiation sensitivity and to detect chronic exposure to ionizing radiation.

First, lymphocytes of eight Ataxia-telangiectasia (AT) patients and ten healthy controls were *in vitro* irradiated and induced DNA damage, DNA repair capacity and quality of DNA repair were analyzed to validate the prediction of genetically determined radiation sensitivity by these biomarkers. DNA damage induction and DNA repair as detected by phosphorylated H2A.X revealed individual differences and were heterogeneous among AT patients. Phosphorylation of H2A.X seems to depend on the underlying individual mutation and thus appears not well suited as a biomarker for general radiation sensitivity in AT patients. By contrast, background and radiation-induced chromosomal aberrations were significantly elevated in AT patients and AT cells demonstrate multiple damaged sites. Using mFISH analysis, chromosomal breakage was confirmed as a reliable biomarker for radiation sensitivity in AT patients.

Detected individual differences in DNA damage repair processes require extended investigations in large study groups. However, the complex study design of molecular-epidemiological studies demand the collection, storage and time-displaced screening of biological samples. On the basis of these facts, a high-throughput quantification of  $\gamma$ H2A.X, 53BP1, MDC1 and pKAP1 was established in cryopreserved lymphocytes by semi-automatic immunofluorescence microscopy. DNA damage signaling and DNA repair were evaluated by generating dose-response curves and time kinetics. No significant differences were noticed for  $\gamma$ H2A.X and 53BP1 between cryopreserved and fresh isolated lymphocytes. However, slightly higher foci number were observed in cryopreserved lymphocytes. In addition, significant higher values for pKAP1 quantification were observed in cryopreserved lymphocytes in comparison to fresh isolated lymphocytes. Despite the use of high-throughput methods like  $\gamma$ H2A.X foci assay, most laboratories will quickly reach their capacity limit in large-scale studies.

Thus, inclusion of inexperienced operators in the radiation-induced foci assay was evaluated to speed up sample flow rate and increase laboratory capacity. The results suggested that inexperienced operators could support slide preparation as well as foci quantification.

To verify subsequently the potential use of the established semi-automatic foci quantification in molecular-epidemiological studies and to detect chronic radiation exposure, the number of  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 and pKAP1 foci were analyzed in cryopreserved lymphocytes of 106 retired uranium miners after *in vitro* irradiation. Thereby, the dose- and time-dependent effect in foci formation was determined before and after *in vitro* irradiation. However, no clear evidence for chronic radiation exposure or an influence of the level of exposure were noticed due to inter-individual and inter-experimental variations. Nevertheless, analysis of chromosomal aberrations indicates an exposure-dependent increase in the number of damaged cells and complex aberrations.

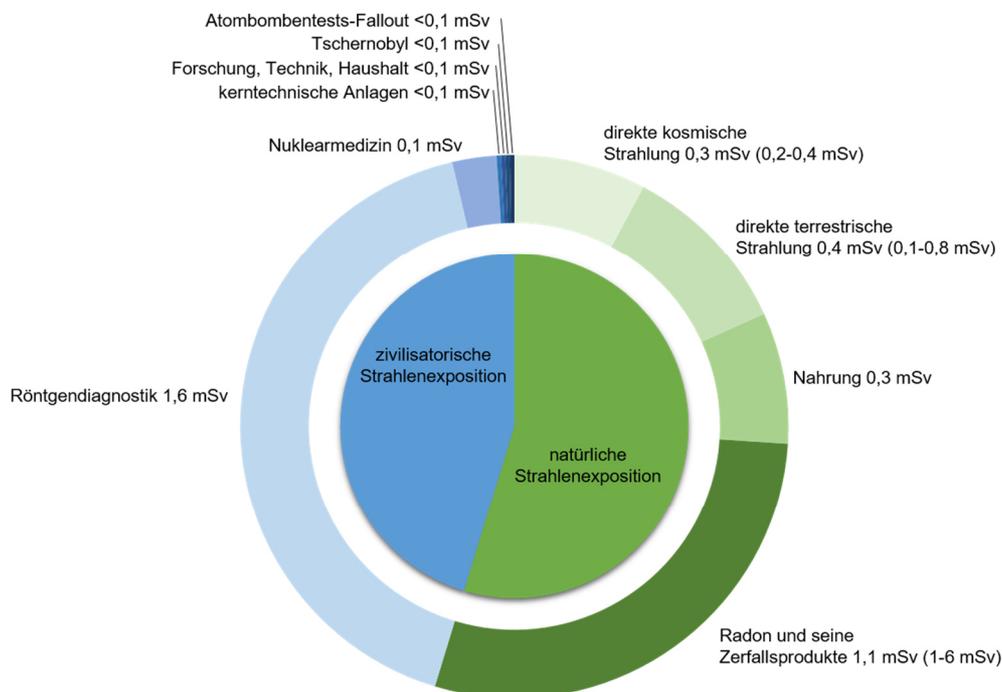
In conclusion, the established semi-automatic quantification of radiation-induced foci enables a high-throughput evaluation of signaling and repair of DNA double-strand breaks in cryopreserved lymphocytes. This study identified that microscopic radiation-induced foci analysis is influenced by inter-individual and inter-experimental differences and less effective for identifying radiation sensitivity or chronic radiation exposure than the mFISH assay for chromosomal aberrations. Nevertheless, mFISH analysis is time-consuming, labor-intensive and expensive, so this technique is not suitable as a rapid screening assay in routine analysis.

A promising future strategy might be the screening of large study groups and the combination of several fast, cost-effective measurable and easy accessible biological markers in blood samples for a reliable prediction and clarification of causes and influencing factors of individual radiation sensitivity. High-throughput analysis of radiation-induced foci should be an inherent part in future molecular-epidemiologic studies in the research field of radiation biology.

## 2. Einleitung

### 2.1 Strahlenbelastung der Bevölkerung durch ionisierende Strahlung

Jeder Mensch ist unbewusst und Tag täglich natürlich-vorkommender ionisierender Strahlung ausgesetzt (Abbildung 1). Zusätzlich trägt die zivilisatorische, also durch den Menschen selbst verursachte, Strahlung zur Strahlenbelastung bei. Den größten Anteil hat hier die Anwendung von radioaktiven Stoffen und ionisierender Strahlung in der Medizin, beispielsweise bei computertomographischen Untersuchungen, Röntgenaufnahmen oder in der nuklearmedizinischen Diagnostik (Abbildung 1) (Trugenberger-Schnabel et al. 2020). Insgesamt ist eine Person in Deutschland einer mittleren effektiven Dosis von 3,8 mSv pro Jahr ausgesetzt (Trugenberger-Schnabel et al. 2020). Unberücksichtigt ist in dieser Expositionsabschätzung der therapeutische Einsatz von ionisierender Strahlung in der Medizin. Im Jahr 2016 kam es zu fast 500.000 Neuerkrankungen an Krebs und für das Jahr 2030 wird angenommen, dass im Laufe seines Lebens jeder zweite Deutsche an Krebs erkrankt (Quante et al. 2016; Robert-Koch-Institut and e.V. 2019). Als eine Säule im Therapiekonzept ist dabei bei jedem zweiten Krebspatienten die Strahlentherapie neben der Chirurgie und Chemotherapie integriert (Barnett et al. 2015).



**Abbildung 1.** Strahlenbelastung der Bevölkerung durch ionisierende Strahlung in Deutschland.

Im Jahr 2017 war ein Mensch in Deutschland einer mittleren, effektiven Dosis von 2,1 mSv ausgesetzt. Dargestellt ist die Zusammensetzung der Strahlenexposition mit der effektiven Jahresdosis und dem Wertebereich einer Person in Deutschland (gemittelt über die Bevölkerung).

Patienten erhalten hierbei in Fraktionen von 2 Gy eine Gesamtdosis von 60 – 75 Gy (Averbeck et al. 2020). Gutartige Tumorerkrankungen und degenerativ-entzündliche Erkrankungen, wie der Fersensporn oder schmerzhafte Reizzustände des Ellenbogens, werden ebenfalls mit Bestrahlung behandelt (Trugenberger-Schnabel et al. 2020). Hierbei liegt die mittlere, applizierte Gesamtdosis mit 6 Gy aber deutlich niedriger als bei der Behandlung von Krebserkrankungen (Niewald et al. 2008).

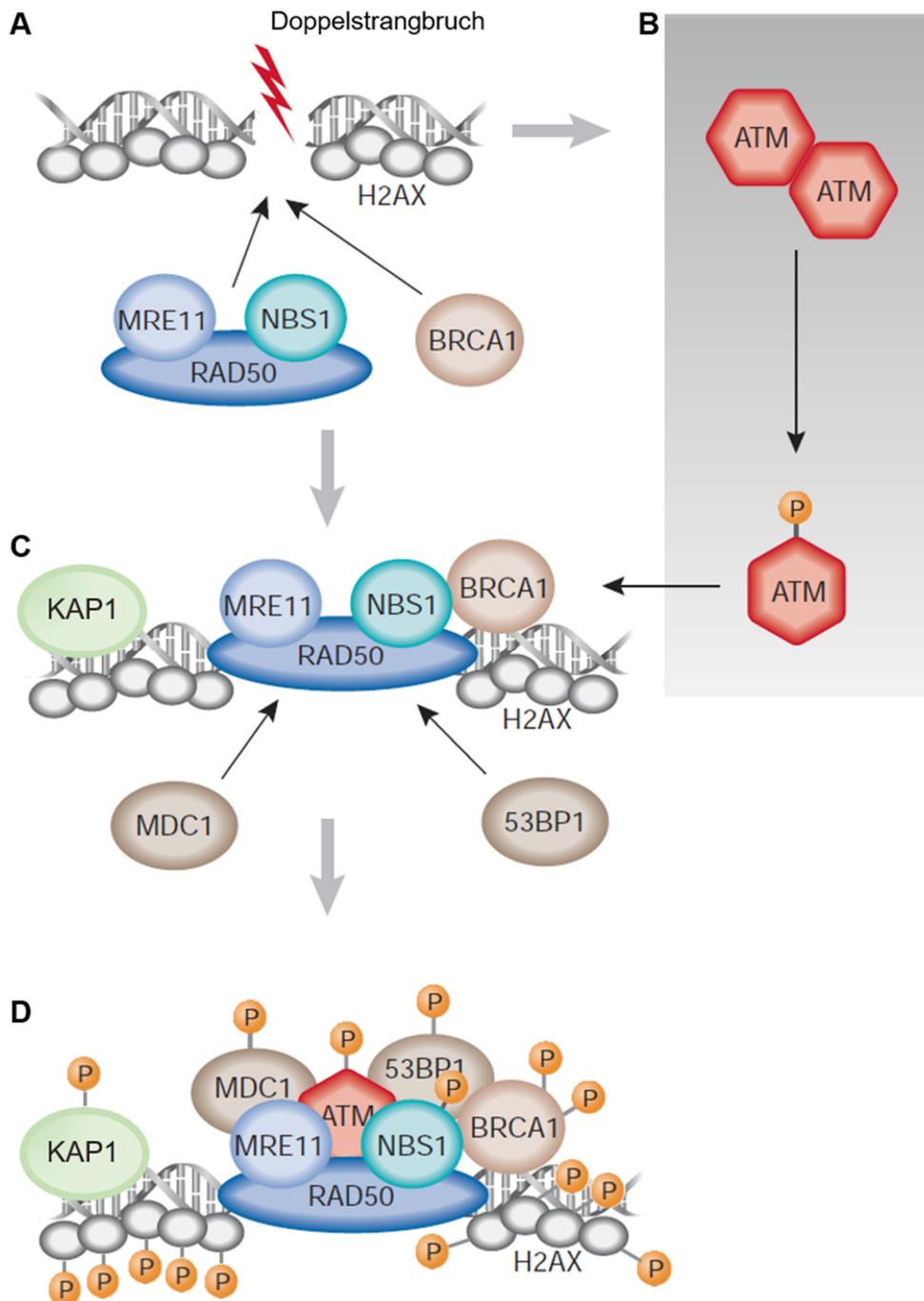
## **2.2 DNA Schadensantwort nach Exposition mit ionisierender Strahlung**

Ionisierende Strahlung verursacht insbesondere Veränderungen an der DNA und ruft damit weitere Reaktionen auf zellulärer und systemischer Ebene hervor (Turesson et al. 2003). Eine der schädlichsten Läsionen sind DNA Doppelstrangbrüche (DSB), bei denen der DNA Strang vollständig durchgeschnitten wird und damit kein komplementärer DNA Strang als Matrize für die Reparatur zur Verfügung steht (Khanna and Jackson 2001; van Gent et al. 2001; Caron et al. 2015). Über das Nicht-homologe *Endjoining* (NHEJ) oder die Homologe Rekombination (HR), und verschiedenen Subtypen beider Reparaturwege, ist die Zelle jedoch in der Lage DSB zu reparieren (Barnes 2001; Thompson and Schild 2001; Shibata and Jeggo 2014; Jachimowicz et al. 2019). Das NHEJ ist der vorherrschende und schnellere, aber auch fehleranfälliger, Reparaturweg für DSB, es ist in allen Zellzyklusphasen aktiv und beinhaltet die Paarung, das Prozessieren und die Ligation von gebrochenen DNA Enden (Barnes 2001; Chang et al. 2017; Jensen and Rothenberg 2020). Die HR verläuft deutlich langsamer, aber dafür präzise und weitgehend fehlerfrei, in der S/G2-Zellzyklusphase und beinhaltet die Resektion von DNA Enden zu Einzelsträngen, die Annäherung und Invasion eines intakten Schwesterchromatids, die Suche nach homologen Bereichen und die Synthese des DNA Stranges (Thompson and Schild 2001; Shibata and Jeggo 2014; Jensen and Rothenberg 2020). Damit ausreichend Zeit für diese Reparaturprozesse bleibt und die Reparatur korrekt ablaufen kann, induzieren Schäden an der DNA zusätzlich einen Zellzyklusarrest (Turesson et al. 2003; Jeggo and Lobrich 2006). Ist der entstandene Schaden zu komplex für eine Reparatur wird eine weitere Zellteilung verhindert oder der Zelltod eingeleitet (Apoptose) (Turesson et al. 2003; Jeggo and Lobrich 2006).

Die Reparatur von DSB ist jedoch nur ein Teil im gesamten Netzwerk der DNA-Schadensantwort (Zhou and Elledge 2000; Scott and Pandita 2006; Shiloh 2014). Zunächst wird eine Läsion in der DNA Struktur durch Sensorproteine erkannt und signalisiert (Khanna and Jackson 2001; Harper and Elledge 2007). Ein Proteinkomplex aus MRE11 (*meiotic recombination protein 11*), Rad50 und NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome protein 1*) (MRN-Komplex) kann an der Schadensstelle diese Funktion als Sensor wahrnehmen (Abbildung 2A) (Stracker et al. 2013; Syed and Tainer 2018).

Sensorproteine aktivieren Transduktorproteine, die das Schadenssignal verstärken und an Effektorproteine für die anschließende Reparatur, Zellzykluskontrolle oder Apoptose weiterleiten (Zhou and Elledge 2000; Khanna and Jackson 2001; Harper and Elledge 2007). Das komplexe Zusammenspiel aus unterschiedlichen Proteinen, die an der Signalisierung und Reparatur von DNA Schäden beteiligt sind, ist trotz intensiver Untersuchungen nicht vollständig geklärt und weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

Aufgrund der herausragenden und vielfältigen Funktion in der DNA Schadensantwort zählt ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) zu einem der Haupt-Transduktoren und ist ein Schlüsselmoleküle in der Schadenserkenkung (Lavin 2008; Bensimon et al. 2010; Guleria and Chandna 2016). ATM ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und neben ATR, DNA-PK und SMG1 ein Mitglied der Familie der Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase-ähnlichen Kinasen (PI3-Kinasen) (Guleria and Chandna 2016). Nach der Generierung eines DSB wird ATM zunächst zu DNA Abschnitten in der Nähe der Schadensstelle rekrutiert und akkumuliert im weiteren Verlauf in unmittelbarer Nähe von 2 bis 10 Kilobasenpaaren um den DSB (Lavin 2008; Caron et al. 2015; Clouaire et al. 2017). Für die Rekrutierung und Aktivierung von ATM sorgt insbesondere NBS1 des *upstream* von ATM agierenden MRN-Komplexes (Uziel et al. 2003; Lee and Paull 2004; Falck et al. 2005; Guleria and Chandna 2016). Die Aktivierung erfolgt über eine Autophosphorylierung an Serin 1981 (Ser1981) und einer Konformationsänderung von einem inaktiven Dimer in ein aktives Monomer (pATM), wodurch ATM zusätzlich am DSB stabilisiert wird (Abbildung 2B) (Bakkenist and Kastan 2003). Als Kinase phosphoryliert ATM zwischen 700 und 1000 Substrate, die in der DNA Schadensantwort involviert sind und ist im Nukleus und zytoplasmatischen Vesikeln lokalisiert (Abbildung 2C) (Watters et al. 1997; Matsuoka et al. 2007; Stracker et al. 2013). Dadurch hat ATM Einfluss auf die Zellzykluskontrolle, die DNA Reparatur und die Apoptose (Riballo et al. 2004; Lavin 2008). Zusätzlich sorgt ATM für die Relaxation von Heterochromatin durch die Phosphorylierung des Transkriptionsrepressors KAP1 (*KRAB-associated protein 1*) an Serin 824 (Ser824), wodurch die Schadensstelle in hochkondensierten und unzugänglichen DNA Bereichen für Reparaturprozesse zugänglich gemacht wird (Ziv et al. 2006; Bonner et al. 2008; Goodarzi et al. 2008; Noon et al. 2010; Lemaître and Soutoglou 2014). Insgesamt ist ATM somit ein zentraler Übermittler in der Signalisierung und Signalvervielfältigung von DSB (Caron et al. 2015; Guleria and Chandna 2016).



**Abbildung 2.** Signalisierung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB).

**A)** Durch ionisierende Strahlung können DSB verursacht werden. Der MRN-Komplex erkennt als Sensor die Schadensstelle und aktiviert das Transduktorprotein ATM, um das Schadenssignal zu verstärken und an Effektorproteine für die DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle oder Apoptose weiterzuleiten. **B)** ATM liegt in der Zelle als inaktives Dimer vor und wandelt sich durch Autophosphorylierung (Ser1981) und Konformationsänderung in ein aktives Monomer um. **C)** Das aktivierte pATM ist an der Schadensstelle lokalisiert und phosphoryliert hier zahlreiche Substrate. **D)** Durch die ATM-abhängige Phosphorylierung von H2A.X, MDC1 und 53BP1 kommt es zur Signalweiterleitung und -verstärkung der DNA Schadensantwort, sodass Reparaturprozesse eingeleitet werden können. Die ATM-abhängige Phosphorylierung sorgt zusätzlich für eine Relaxation des Chromatins, sodass die Schadensstelle für Reparaturprozesse zugänglich ist. 53BP1, *p53-binding protein*; ATM, *ataxia telangiectasia mutated*; BRCA1, *breast-cancer-associated 1*; KAP1, *KRAB-associated protein 1*; MDC1, *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*; MRE11, *meiotic recombination protein 11*; NBS1, *Nijmegen breakage syndrome protein 1*. Abbildung modifiziert nach (McKinnon 2004).

Neben ATM sind die Histonvariante H2A.X, MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) und 53BP1 (*p53-binding protein 1*) zentrale und essentielle Bestandteile in der Signalweiterleitung und –verstärkung der DNA Schadensantwort (Abbildung 2C) (Stucki and Jackson 2004; Lavin 2008; Lorat et al. 2020). H2A.X wird dazu unabhängig von der genomischen Lokalisation des DSB durch die Kinase ATM an Serin 139 (Ser139) phosphoryliert ( $\gamma$ H2A.X) (Rogakou et al. 1998; Savic et al. 2009; Podhorecka et al. 2010; Caron et al. 2015). Dabei dient  $\gamma$ H2A.X als Anker für MDC1, welches ebenfalls durch ATM phosphoryliert wird (Abbildung 2D) (Stucki and Jackson 2004; Lavin 2008; Caron et al. 2015). Durch Interaktion zwischen MDC1 und ATM wird wiederum die Akkumulierung von ATM gesteuert und MDC1 beeinflusst zusätzlich die Interaktion zwischen ATM und H2A.X (Huen and Chen 2008; Lavin 2008). Im Gegensatz zu ATM ist  $\gamma$ H2A.X damit ungleichmäßig und asymmetrisch, und über einen größeren Bereich von 0,5 bis 2 Megabasenpaare um die Schadensstelle vorzufinden (Iacovoni et al. 2010; Caron et al. 2015).

Im Anschluss wird 53BP1 zur Schadensstelle rekrutiert, kann damit den Tumorsuppressor p53 binden, ist essentiell an der Zellzykluskontrolle beteiligt und leitet die DNA Reparatur über das NHEJ ein (Iwabuchi et al. 1994; Wang B et al. 2002; Panier and Boulton 2014). Insgesamt dienen  $\gamma$ H2A.X, MDC1 und 53BP1 als Plattformen für die Rekrutierung von Effektorproteinen, verstärken die DNA Schadensantwort und leiten Reparaturprozesse ein (Stewart et al. 2003; Lavin 2008; Caron et al. 2015).

Ein biologischer Marker für die Qualität der DNA Schadensantwort nach Exposition mit ionisierender Strahlung sind Chromosomenaberrationen. Die genauen, molekularen Mechanismen für die Entstehung von Chromosomenaberrationen und -austauschen ist Gegenstand aktueller Forschung. Während DSB die Grundvoraussetzung für einen Chromosomenschaden darstellen, können eine anschließende, fehlerhafte DSB Reparatur, stark verlangsamte Reparaturprozesse oder Defekte im Zellzyklusarrest zur endgültigen Entstehung von Chromosomenaberrationen beitragen (van Gent et al. 2001; Morgan WF and Sowa 2005; Jeggo and Lobrich 2006; Ponomarev et al. 2014). Für einen Austausch von Chromosomensegmenten zwischen zwei oder mehr Chromosomen wird angenommen, dass DSB in unterschiedlichen chromosomalen Bereichen durch eine Fehlreparatur falsch verbunden werden, wobei möglicherweise die räumliche Nähe der DSB zueinander eine Rolle spielt (Balajee et al. 2018). Dabei können instabile und stabile Chromosomenaberration entstehen. Instabile Aberrationen, wie di- oder polyzentrische Chromosomen, Ringchromosomen und azentrische Fragmente, führen bereits nach wenigen Durchläufen des Zellzyklus zu einer inkorrekten Zellteilung, einem permanenten Zellzyklusarrest oder zum Zelltod durch den Abbruch der Zellteilung und gehen daher im Verlauf von Zellteilungen verloren (Marder and Morgan 1993; Turesson et al. 2003; Keller, Kuechler, et al. 2004).

Hingegen können Zellen mit stabilen Aberrationen, wie symmetrischen Translokationen und Insertionen, über viele Zellteilungen hinweg erhalten bleiben (Turesson et al. 2003). Unreparierte oder falsch reparierte DSB und die daraus entstehenden Chromosomenaberrationen können mit dem Verlust oder der Fusionierung von einzelnen Genen einhergehen, somit zu einer deregulierten Genexpression beitragen, genomische Instabilität auslösen, Tumorsuppressorgene inaktivieren oder Onkogene aktivieren und schlussendlich zur Entstehung von Krebs beitragen (Lengauer et al. 1998; van Gent et al. 2001; Turesson et al. 2003; Keller, Kuechler, et al. 2004; Lavin et al. 2005).

### **2.3 Visualisierung von DNA Doppelstrangbrüchen und Chromosomenschäden**

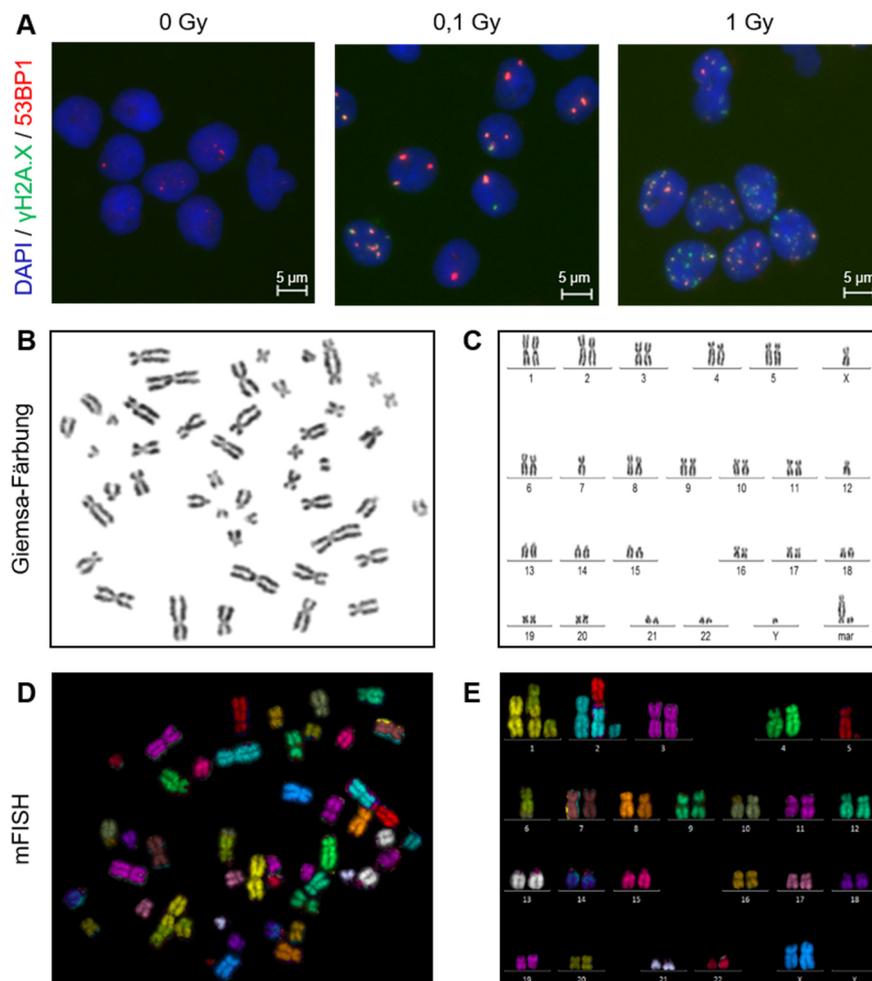
Durch die Rekrutierung und Akkumulation der Signalisierungs- und Reparaturproteine können diese mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Analyseverfahren visuell als diskrete Foci (*radiation-induced foci*, RIF) mit hoher Signalintensität an DNA Schadensstellen nachgewiesen und quantifiziert werden (Rogakou et al. 1998; Huen and Chen 2008; Lavin 2008).

Dabei gliedern sich das Auftreten und die Kinetik dieser RIF der entsprechenden Proteine in zwei Phasen. 1) In der Phase der Foci-Entstehung nimmt die Anzahl der Foci zu und erreicht einen maximalen Wert. Diese Phase zeigt die Erkennung und Signalisierung des DSB an und ist abhängig von der Dosis und weiteren individuellen Faktoren (Bodgi et al. 2013). 2) In der Phase des Foci-Verlustes, nimmt die Anzahl zunächst sehr schnell und später deutlich langsamer auf ein verbleibendes Residualniveau ab und kann den Ausgangswert vor Phase 1 annehmen (Bodgi et al. 2013). Diese Phase spiegelt das Resultat einer DSB Reparatur wieder (Bouquet et al. 2006; Bodgi et al. 2013; Berthel et al. 2019). Damit können RIF und deren Quantifizierung als indirekter Nachweis von DSB und der anschließenden Reparatur genutzt werden.

Sowohl für  $\gamma$ H2A.X, als auch für 53BP1 und MDC1 ist die Bildung von RIF beschrieben. An DSB bilden sich bereits wenige Minuten nach Bestrahlung  $\gamma$ H2A.X, MDC1 und 53BP1 Foci, die ihre maximale Anzahl zwischen 30 Minuten und 1 h erreichen (Rogakou et al. 1999; Schultz et al. 2000; Stewart et al. 2003; Turner et al. 2014). Mit zunehmender Dosis steigt die Anzahl der Foci pro Zelle linear an und mit zunehmender Zeit nach der Bestrahlung kommt es zunächst innerhalb von 2 bis 3 h zu einer sehr schnellen und im weiteren Verlauf zu einer langsameren Abnahme der Anzahl der Foci (Rogakou et al. 1999; Schultz et al. 2000; Bouquet et al. 2006; Turner et al. 2014). Aufgrund der räumlichen Nähe an der Schadensstelle kann eine Kolokalisation von  $\gamma$ H2A.X, MDC1 und 53BP1 beobachtet werden (Schultz et al. 2000; Stewart et al. 2003; Sedelnikova et al. 2004; Markova et al. 2007).

Im Gegensatz dazu breitet sich das pKAP1 Signal wenige Minuten nach Bestrahlung von der Schadensstelle im gesamten Nukleus aus und erreicht ein pan-nukleäres Signal 15 Minuten nach Bestrahlung (Ziv et al. 2006; Noon et al. 2010). Mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung entwickelt sich das pan-nukleäre Signal zu diskreten, dosisabhängigen pKAP1 Foci, die mit  $\gamma$ H2A.X ko-lokalisieren (Noon et al. 2010; White D et al. 2012).

Aufgrund der Eigenschaft zur Visualisierung von DSB nach Exposition mit ionisierender Strahlung zählen Immunfluoreszenz-Färbungen von  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 (Abbildung 3A) zu den in strahlenbiologischer Forschung am häufigsten verwendeten Untersuchungen und finden Anwendung in weiteren Forschungsfeldern.



**Abbildung 3.** Visualisierung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB) und Chromosomenschäden.

**A)** Durch die Einwirkung von ionisierender Strahlung können DSB entstehen. In der Nähe der Schadensstellen kommt es zur Akkumulation von Signalisierungs- und Reparaturproteine der DNA Schadensantwort. Diese können mithilfe von Antikörpern und der Immunfluoreszenz-Mikroskopie als Foci visualisiert werden. **B & C)** Chromosomenschäden können die Folge einer fehlerhaften DNA Reparatur sein. Mit der Giemsa-Lösung werden die Chromosomen einheitlich gefärbt. In der **(B)** Metaphase und im **(C)** Karyogramm können Veränderungen in der Chromosomenanzahl, oder Veränderungen in der Morphologie und Größe detektiert werden. **D & E)** Mit der multiplex Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (mFISH) können in der **(D)** Metaphase und im **(E)** Karyogramm die Schäden den einzelnen Chromosomen genau zugeordnet werden und zusätzlich Austausche zwischen Chromosomen evaluiert werden. Abbildung B & C bereitgestellt von U. Oestreicher, Fachgebiet Biologische Dosimetrie, Bundesamt für Strahlenschutz.

Die Quantifizierung der Foci erlaubt den Nachweis von strahlen-induzierten DSB *in vivo* und *in vitro* und ermöglicht eine Abschätzung der Dosis in der biologischen Dosimetrie, nach Strahlentherapie oder radiologischer Diagnostik, wie Computertomographie (CT)-Untersuchungen (Lobrich et al. 2005; Rube et al. 2010; Redon et al. 2011; Barnard et al. 2015; Viau et al. 2015; Bucher, Duchrow, et al. 2020). Insbesondere in der Untersuchung zur Auswirkung von niedrigen Dosen findet die Foci Analyse Verwendung (Rothkamm and Lobrich 2003; Vandevorde et al. 2015). Außerdem kann die Foci Analyse zur Untersuchung von Alterungsprozessen, in der Krebsforschung, in der Medikamentenentwicklung und als Biodosimeter für Expositionen gegenüber Chemikalien genutzt werden (Bonner et al. 2008; Redon et al. 2011).

Dabei hat die Analyse von  $\gamma$ H2A.X viele Vorteile, um als Biomarker für DNA Schäden und in Populationsstudien Anwendung zu finden: die  $\gamma$ H2A.X Analyse ist hoch spezifisch für die Erkennung von DSB und sehr sensitiv für die Detektion einer geringen Anzahl an DSB, die experimentelle Durchführung zur Visualisierung erfolgt innerhalb kurzer Zeit, es wird nur eine geringe Anzahl an Zellen zur Analyse benötigt und es besteht die Möglichkeit zur (semi-) automatischen Quantifizierung der Foci-Signale (Sánchez-Flores et al. 2015).

Schäden an Chromosomen und die daraus resultierenden Chromosomenaberrationen können durch die Färbung von Chromosomen oder Chromosomenregionen und über verschiedene mikroskopische Analyseverfahren visualisiert und quantifiziert werden. Der Nachweis von Chromosomenaberrationen findet Anwendung in der prä- und postnatalen Diagnostik, Diagnose und Erforschung von Krebserkrankungen, personalisierten Medizin, Toxikologie, Strahlenbiologie und biologischen Dosimetrie (Balajee and Hande 2018). Nachdem die DNA durch ionisierende Strahlung geschädigt wurde, können bereits in der ersten Metaphase nach Exposition Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden (Carrano and Heddle 1973).

Eine breite Anwendung findet hierbei die klassische zytogenetische Färbung von Chromosomen mittels Giemsa-Lösung (Abbildung 3B, 3C) (Liehr et al. 2013; Balajee and Hande 2018). Mit dieser einheitlichen Färbung können jedoch nur Veränderungen in der Morphologie und Größe von einzelnen Chromosomen oder Veränderungen in der Gesamtanzahl der Chromosomen nachgewiesen werden (Liehr et al. 2013). Die Giemsa-Färbung wird daher in der Strahlenbiologie und biologischen Dosimetrie zum Nachweis von di- und polyzentrischen Chromosomen, Ringchromosomen und azentrischen Fragmenten eingesetzt. Die Identifikation von weiteren Aberrationen, wie Translokationen, Insertionen und komplexen Chromosomenaustauschen, mit einer genauen Zuordnung der beteiligten Chromosomen ist durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) möglich (Nederlof et al. 1989; Balajee and Hande 2018).

Bei dieser molekular-zytogenetischen Methode können durch die simultane Färbung mit fluoreszierenden Sonden sowohl einzelnen Chromosomen komplett gefärbt werden, als auch das gesamte Genom auf allen Chromosomen durch multiplex-FISH (mFISH) visualisiert werden (Abbildung 3D, 3E) (Speicher et al. 1996; Liehr et al. 2013; Balajee and Hande 2018). Die genaue Lokalisation der Bruchpunkte oder intrachromosomale Veränderungen können jedoch nicht mit der mFISH-Analyse ermittelt werden (Liehr et al. 2004).

Die dosis-abhängige Zunahme von Chromosomenaberrationen und deren quantitative und qualitative Auswertung erlaubt die Beurteilung des biologischen Effekts oder retrospektiv die Abschätzung der Dosis nach Exposition mit ionisierender Strahlung (Bender, Awa, et al. 1988). Allerdings kommt es über die Zeit zu einer Abnahme in der Rate von strahlen-induzierten Chromosomenaberrationen, wodurch die Giemsa-Färbung mit der Quantifizierung von dizentrischen Chromosomen häufig für Untersuchungen nach einer akuten Strahlenexposition und die (m)FISH Technik mit der Quantifizierung von Translokationen häufig für länger zurückliegende Strahlenexpositionen genutzt werden (Carrano and Heddle 1973; Balajee and Hande 2018; Herate and Sabatier 2020). Aufgrund der hohen informativen und detailreichen Ergebnisse wurde die mFISH Technik daher bereits bei Untersuchungen zur Auswirkung einer zurückliegenden, beruflichen Strahlenexposition von Arbeitern in den kerntechnischen Anlagen von Mayak in Russland genutzt (Hande et al. 2005; Sotnik et al. 2014).

#### **2.4 Individuelle Strahlenempfindlichkeit**

Der biologische Effekt einer Strahlenexposition kann jedoch von Mensch zu Mensch selbst bei gleicher physikalischer Dosis aufgrund von Unterschieden in der individuellen Strahlenempfindlichkeit variieren (Barnett et al. 2015). Dadurch kamen zahlreiche biologische und epidemiologische Studien, die die gesundheitlichen Auswirkungen und Effekte einer Exposition mit niedrigen Dosen ionisierender Strahlung untersuchten, zu unterschiedlichen Aussagen und führten dazu, dass bis heute ein klares und einheitliches Verständnis fehlt (Seibold 2020). Die individuelle Strahlenempfindlichkeit jedes Individuums kann durch eine Vielzahl an endo- und exogenen Faktoren unterschiedlich stark beeinflusst werden und häufig unklare Ursachen haben.

Obwohl die genauen Faktoren und Mechanismen, die die Variation der Ausprägung einer Strahlenempfindlichkeit beeinflussen, trotz intensiver Forschung noch immer Gegenstand aktueller Untersuchungen sind, deutet vieles darauf hin, dass genetische Faktoren zu dieser Variabilität beitragen (Hornhardt et al. 2014; Borrás-Fresneda et al. 2016). Dabei sind häufig Gene betroffen, die an dem komplexen Zusammenspiel der DNA Reparatur, der Zellzyklusregulation und des gerichteten Zelltods, der Apoptose, beteiligt sind (Hornhardt et al. 2014; Borrás-Fresneda et al. 2016).

Zusätzlich sind Defekte in der DNA Reparatur mit genomischer Instabilität und damit mit einem höheren Krebsrisiko verbunden (Wei et al. 1996; Hornhardt et al. 2014). Neben genetischen Komponenten beeinflussen Alter, Gesundheitsstatus, Begleiterkrankungen, Medikation, Lebensstil und zusätzliche Expositionen mit weiteren Noxen die Strahlenempfindlichkeit (Gomolka et al. 2018; Gomolka et al. 2020; Seibold et al. 2020)

Die Auswirkungen einer Strahlenempfindlichkeit sind vielfältig und häufig von der Dosis abhängig. Zum einen kann es bei höherer Strahlenexposition innerhalb von Wochen nach Exposition zu Überempfindlichkeitsreaktionen des Normalgewebes kommen (im Englischen als „*radiation sensitivity*“ bezeichnet) (Gomolka et al. 2020; Seibold et al. 2020). Zum anderen kann nach einer Strahlenexposition das Risiko der Entstehung einer Krebserkrankung bei einigen Menschen im Vergleich zur Gesamtbevölkerung erhöht sein (im Englischen als „*radiation susceptibility*“ bezeichnet) (Gomolka et al. 2020; Seibold et al. 2020). Während die akuten Überempfindlichkeitsreaktionen besonders im klinischen Umfeld relevant sind, ist die Erhöhung des Krebsrisikos insbesondere vor dem Hintergrund einer stetigen Zunahme der Belastung mit zivilisatorischer Strahlung für jegliche Exposition durch ionisierende Strahlung von Bedeutung (Seibold et al. 2020). Auf der einen Seite sind Marker für die Vorhersage einer Strahlenempfindlichkeit dringend nötig, um Strahlentherapiekonzepte mit hohen Expositionsdosen in der Krebsbehandlung anzupassen oder die Auswirkungen einer moderaten (0,1 – 1 Gy) und niedrigen (bis 0,1 Gy) Expositionsdosis abzuschätzen (Seibold et al. 2020). Auf der anderen Seite kann ein besonderes Augenmerk auf den Arbeitsschutz von beruflich strahlenexponierten Personen gelegt werden (Gomolka et al. 2020). Diese Marker können erheblich zur Verbesserung des Schutzes von Menschen vor ionisierender Strahlung beitragen.

Zum Nachweis einer individuellen Strahlenempfindlichkeit wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche zellbasierte Testverfahren und genetische Biomarker entwickelt, die DSB Reparatur, Chromosomenaberrationen, den Molekültransport von ATM zwischen Zellkern und Zytoplasma, zelluläre pATM Konzentrationen, genetische Polymorphismen und Mutationen, Genexpression, Seneszenz, strahlen-induzierte Apoptose bei Lymphozyten oder Zellüberleben untersuchen und quantifizieren (Crompton 1997; Crompton and Ozsahin 1997; Granzotto et al. 2016; Ferlazzo et al. 2017; Pereira et al. 2018; Gomolka et al. 2020). Trotz dieser zahlreichen Testverfahren und großen Entwicklungsfortschritten ist bis heute keine Methode zur Vorhersage einer individuellen Strahlenempfindlichkeit oder Strahlensensitivität in breiter Routineanwendung in Kliniken (Gomolka et al. 2020).

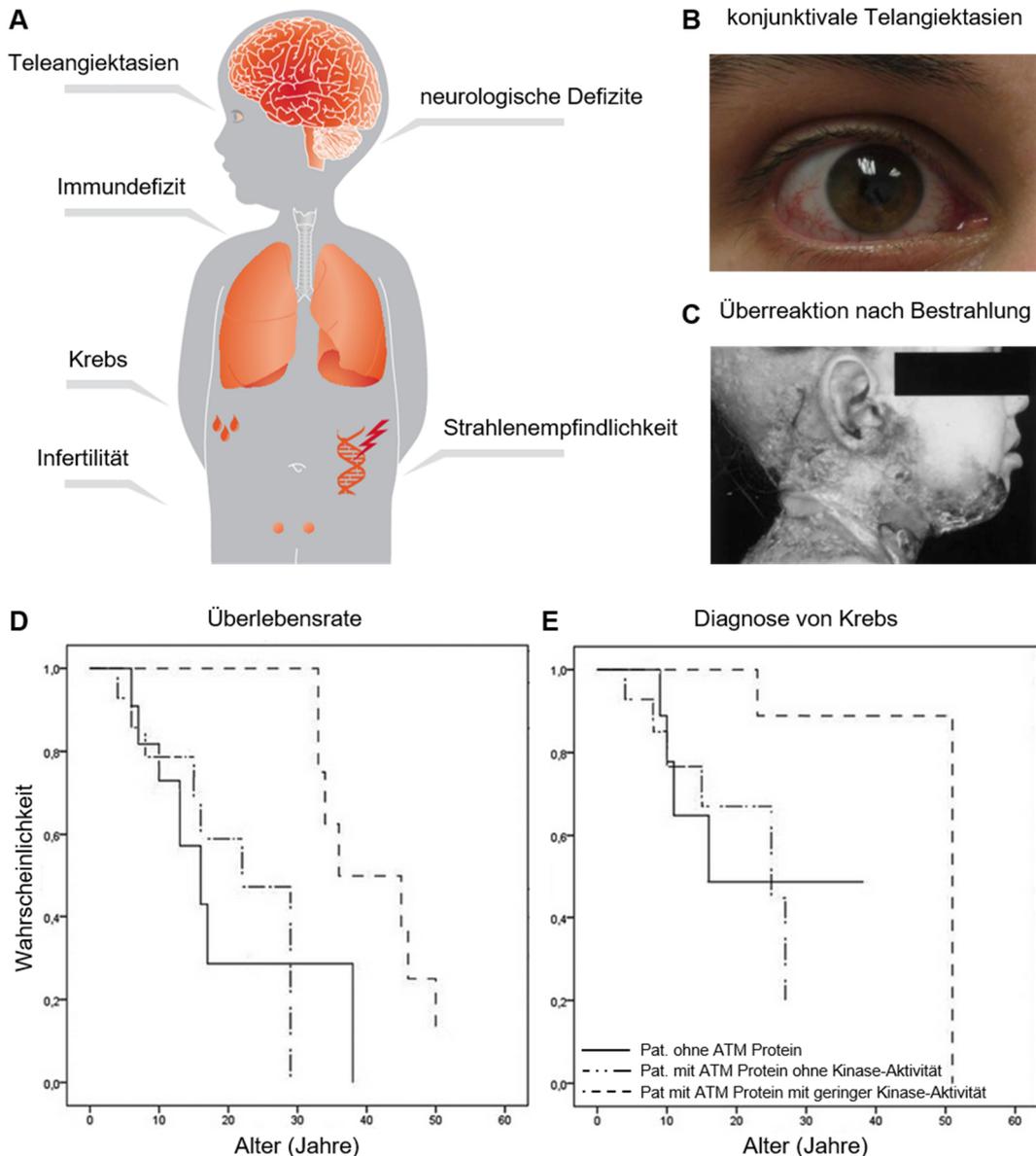
## 2.5 Strahlenempfindlichkeit aufgrund von genetischen Veränderungen

Eine besonders ausgeprägte Strahlenempfindlichkeit und Strahlensensitivität wird durch die seltene genetische Erkrankung Ataxia teleangiectatica (AT; MIM#208900), auch Louis-Bar-Syndrom genannt, hervorgerufen (Rothblum-Oviatt et al. 2016). Diese autosomal-rezessive Erkrankung, mit einer erwarteten Inzidenz zwischen 1 pro 40 000 und 1 pro 300 000 Individuen, betrifft vorrangig das Nerven- und Immunsystem (Abbildung 4A) (Swift et al. 1986; Verhagen et al. 2012). AT wurde 1926 zunächst von Syllaba und Henner und 1941 nochmals von Louis-Bar beschrieben (McFarlin et al. 1972; Woods and Taylor 1992).

Die progressive Erkrankung wird meist in der frühen Kindheit festgestellt und ist charakterisiert durch Störungen bei koordinierten Bewegungen (Ataxien), die Aufweitung von konjunktivalen Kapillargefäßen (Teleangiektasien) (Abbildung 4B), Immundefizienz und vorzeitiges Altern (McFarlin et al. 1972; Woods and Taylor 1992; Nowak-Wegrzyn et al. 2004). Zusätzlich wurde bei AT Patienten ein erhöhtes Krebsrisiko, insbesondere von Leukämien und Lymphomen beobachtet (Hecht et al. 1966; Swift et al. 1976; Rothblum-Oviatt et al. 2016). Bei rund einem Drittel der AT Patienten kommt es zu einer Krebserkrankung (Chun and Gatti 2004). AT Patienten zeigen zudem eine ungewöhnlich sensitive Reaktion auf ionisierende Strahlung (Abbildung 4C) (Gotoff et al. 1967; Morgan JL et al. 1968; Verhagen et al. 2012), die in Bestrahlungsversuchen mit Zellmaterial auch *in vitro* bestätigt werden konnte (Taylor AM et al. 1975). Eine erhöhte Rate von Chromosomenbrüchen in unbestrahlten und bestrahlten Proben von Betroffenen ist ein weiteres Merkmal der Erkrankung (Hecht et al. 1966; Higurashi and Conen 1973; Woods and Taylor 1992). Daher wird AT den Chromosomenbrüchigkeits-Syndromen zugeordnet (Rothblum-Oviatt et al. 2016). Die Lebenserwartung reicht meist nur bis in das frühe Erwachsenenalter und liegt im Durchschnitt zwischen 19 und 25 Jahren (Abbildung 4D) (Crawford et al. 2006). Die häufigsten Todesursachen sind Kachexie, chronische Lungenentzündungen und Krebs (Abbildung 4E) (Verhagen et al. 2012). Trotz intensiver Forschung ist eine Heilung von AT nicht möglich und die Behandlung kann für die verschiedenen Beschwerden nur symptomabhängig erfolgen (Perlman et al. 2003; Rothblum-Oviatt et al. 2016).

Mehr als 50 Jahre nach den ersten beschriebenen Fällen, identifizierten Savitsky et al. inaktivierende Mutationen im *ATM*-Gen als Ursache für diese Erkrankung (Savitsky Bar-Shira (Savitsky et al. 1995). Das *ATM*-Gen ist auf Chromosom 11 (11q22.3) lokalisiert und ist mit 66 Exons und 150 kb DNA vergleichsweise groß (Gatti et al. 1988, Uziel et al. 1996; Concannon and Gatti 1997). Das ATM Protein umfasst 3056 Aminosäure und hat ein Molekulargewicht von 350 kDa (Savitsky et al. 1995). Es spielt eine zentrale Rolle in der Zellteilung, in der normalen Entwicklung und Aktivität des Nerven- und Immunsystems, in der DNA-Schadenserkennung und in diesem Zusammenhang auch in der Signalweiterleitung und Reparatur (Savitsky et al. 1995) (siehe 1.2).

Heterozygote Träger einer *ATM* Mutation, wie Eltern oder Geschwister von AT Patienten, zeigen keinerlei Symptome (Rothblum-Oviatt et al. 2016). Allerdings ist für Heterozygote ein erhöhtes Risiko, an Krebs zu erkranken, beschrieben (Swift et al. 1976; Swift et al. 1991). Dabei können heterozygote Mutationen im *ATM*-Gen besonders für Brustkrebsfälle bei Frauen ursächlich sein (Swift et al. 1991; Perlman et al. 2003; Taylor A M R and Byrd 2005).



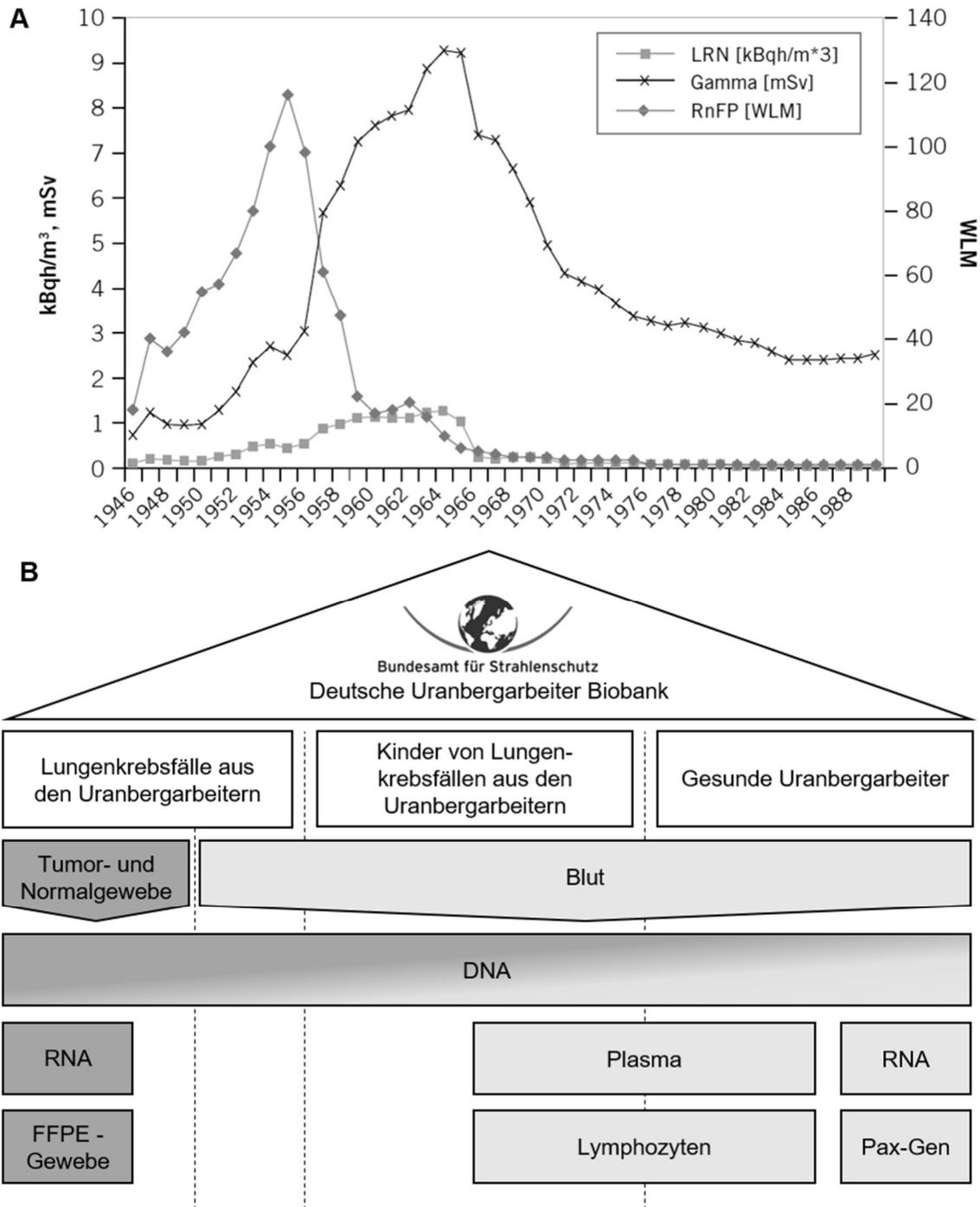
**Abbildung 4.** Merkmale von *Ataxia teleangiectatica* (AT).

**A)** AT ist eine autosomal-rezessive Erkrankung mit einer Vielzahl von Symptomen, die vorrangig das Nerven- und Immunsystem betreffen. **B)** Namensgebend für das Syndrom sind Störungen in der Bewegungskoordination (Ataxien) und Aufweitungen von konjunktivalen Kapillargefäßen (Telangiectasien). **C)** Patienten mit AT reagieren ungewöhnlich empfindlich auf Exposition gegenüber ionisierender Strahlung. Das Bild zeigt einen Patienten nach einer Bestrahlung aufgrund eines Lymphoms. **D)** Die Lebenserwartung von AT Patienten liegt im Durchschnitt zwischen 19 und 25 Jahren. **E)** Eine der häufigsten Todesursachen sind Krebserkrankungen, die bei einem Drittel der Patienten auftreten. **D & E)** Die Auswirkungen der Mutationen im *ATM*-Gen können einen Einfluss auf die Ausprägung der Symptome und den individuellen Krankheitsverlauf der Patienten haben. Abbildung A modifiziert nach (McKinnon 2004); Abbildung B aus (Rothblum-Oviatt et al. 2016), Abbildung C aus (Perlman et al. 2003), Abbildung D & E modifiziert nach (Verhagen et al. 2012).

## **2.6 Berufliche Strahlenexposition bei Uran-Bergarbeiter der Wismut SDAG**

Die Etablierung von Biomarkern zum Nachweis einer Strahlenexposition und zur Evaluierung der individuellen Strahlenempfindlichkeit hat neben dem medizinischen Bereich eine entscheidende Relevanz im Strahlenschutz von beruflich strahlenexponierten Personen. Heutzutage ist die Anzahl beruflich strahlenexponierter Personen deutlich geringer als die Anzahl der medizinisch strahlenexponierten Patienten und beruflich strahlenexponierte Personen sind nur einer sehr geringen Exposition von wenigen mSv pro Jahr ausgesetzt (Gomolka et al. 2020). Im Jahr 2017 waren rund 418.000 Personen in Deutschland beruflich strahlenexponiert, die im Rahmen des Strahlenschutzes mit Dosimetern überwacht wurden (Trugenberger-Schnabel et al. 2020). In der Auswertung der Strahlenbelastung ergab sich eine mittlere effektive Dosis von 0,06 mSv, wobei nur rund 15% der überwachten Personen eine messbare, mittlere effektive Dosis von 0,45 mSv pro Jahr aufwiesen (Trugenberger-Schnabel et al. 2020). Zusätzlich waren rund 44.700 Personen aufgrund ihrer Tätigkeit als fliegendes Personal einer erhöhten kosmischen Strahlung mit einer mittleren effektiven Dosis von 2,1 mSv pro Jahr ausgesetzt (Trugenberger-Schnabel et al. 2020). Diese niedrigen Expositionsdosen sind ein Resultat von konsequent verbesserten Arbeitsplatzbedingungen, Arbeitsschutzmaßnahmen und Strahlenschutzvorgaben.

Im historischen Vergleich war die berufliche Strahlenexposition von Wismut-Uranbergarbeitern um Größenordnungen höher. Zwischen 1946 und 1990 baute die Sowjetisch-Deutsche Aktien Gesellschaft (SDAG) Wismut in Sachsen und Thüringen insgesamt knapp 220.000 Tonnen Uran ab und war mit seinen insgesamt 400.000 Angestellten der drittgrößte Uranproduzent weltweit (Kreuzer et al. 2002). Die Arbeiter waren unter Tage gegenüber ionisierender Strahlung exponiert, die durch den radioaktiven Zerfall von Radon in kurzlebige Radonfolgeprodukte und den Zerfall von Uran in langlebige Nuklide Gamma-Strahlungentstand (Abbildung 5A) (Kreuzer et al. 2010). Zusätzlich spielte die Exposition gegenüber Feinstaub, Quarzfeinstaub und, je nach Gesteinszusammensetzung, arsenhaltiger Feinstaub eine Rolle (Kreuzer et al. 2011). Vor allem in den anfänglichen Betriebsjahren (1946-1954) war die Radon- und Staubexposition besonders hoch (Kreuzer et al. 2002). Erst durch verbesserte Arbeitsbedingungen konnten die Radon- und Staubbelastung gesenkt werden (Kreuzer et al. 2002). Bis 1999 wurden mehr als 7.500 Kompensationszahlungen aufgrund von strahlen-induzierten Lungenkrebskrankungen geleistet und bis 2004 wurden jährlich rund 200 Anträge auf Kompensationszahlung gestellt (Schröder et al. 2002; Koppisch et al. 2004).



**Abbildung 5.** Die deutsche Uranbergarbeiter Biobank (GUMB) mit Expositionsdaten der Bergarbeiter. **A)** Die Bergarbeiter waren in den anfänglichen Betriebsjahren gegenüber Radon und dessen Zerfallsprodukten (RnFP) einer hohen Dosis (in Working Level Month (WLM)) exponiert. Während die Radonexposition durch die Einführung einer künstlichen Bewetterung abnahm, stieg die Exposition gegenüber externer Gamma-Strahlung (in mSv) und langlebigen Radionukliden (LRN) (in kBq/m<sup>3</sup>) durch den optimierten Abbau in uranhaltigeren Gesteinsschichten an (Schnelzer et al. 2014). Dargestellt ist die geschätzte, mittlere jährliche kumulative Strahlenexposition. **B)** Die vom Bundesamt für Strahlenschutz initiierte GUMB beinhaltet biologische Proben von 419 ehemaligen Uranbergarbeitern. Zusätzlich wurden DNA und RNA aus Tumor- und Gewebeprobe extrahiert. Diese Gewebeprobe sind im Wismut Sektionsarchiv am Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung archiviert (Gomolka and Bucher 2019). Ebenfalls wurden biologische Proben von erwachsenen Kindern von ehemaligen, früh an Lungenkrebs verstorbenen Bergarbeitern in der GUMB eingelagert. Abbildung A aus (Schnelzer et al. 2014), Abbildung B aus (Gomolka and Bucher 2019).

Eine entwickelte Job-Expositionsmatrix liefert für jedes Jahr, ausgeübte Tätigkeit, Bergbauobjekt und Arbeitsplatz eine Expositionsabschätzung für die jährliche kumulative Radonbelastung (in *Working Level Month*, WLM), externe Gamma-Strahlung (in mSv), Belastung durch langlebige Radionuklide (in kBq/m<sup>3</sup>) und die Staubexposition (Kreuzer et al. 2002; Lehmann 2004; Schnelzer et al. 2014). Die ermittelte ungewichtete absorbierte Gesamtorgandosis beträgt durchschnittlich 50 bis 60 mGy für das rote Knochenmark (mit einem Maximum von 940 mGy), wobei die externe Gamma-Strahlung den größten Beitrag zur absorbierten Organdosis leistet (Schnelzer et al. 2014). Damit stellen die Wismut Bergarbeiter in ihrer Expositionshöhe und -erfassung ein besonderes Kollektiv für die Strahlenforschung dar.

In experimentellen Studien wurde vereinzelt der biologische Effekt der Uran- und Radonexposition bei den Bergarbeitern, wie die Schädigung der Erbsubstanz oder Veränderungen des Immunsystems untersucht (Schneider et al. 1999; Popp et al. 2000; Schneider et al. 2007). Meist waren diese Studien aber zu klein, um statistisch abgesicherte Aussagen treffen zu können (Gomolka and Bucher 2019). Daher initiierte das BfS 2008 den systematischen Aufbau einer Bioprobenbank von 419 ehemaligen Bergarbeitern, um in Zukunft systematisch biologische Strahlenwirkungen untersuchen zu können (Gomolka and Bucher 2019). Zusammen mit der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung wurden aus Blutproben Lymphozyten, DNA, RNA und Blutplasma in der Deutschen Uranbergarbeiter Biobank (GUMB, *German Uranium Miners Biobank*) eingelagert (Abbildung 5B) (Gomolka and Bucher 2019). Die Deutsche Uranbergarbeiter Biobank stellt in ihrem Probenumfang, Probenqualität, sowie in der Expositionshöhe und -erfassung der ehemaligen Bergarbeiter eine einzigartige Sammlung von chronisch strahlenexponierten Uranbergarbeitern dar (Gomolka and Bucher 2019).

## **2.7 Zielsetzung und experimenteller Ablauf der Arbeit**

Strategien zur Risikoabschätzung und damit zum Schutz des Menschen vor den Auswirkungen ionisierender Strahlung, insbesondere bei der gezielten Anwendung in der Strahlentherapie, wurden bisher nur für Bevölkerungsgruppen und nicht für einzelne Individuen entwickelt und angewendet (Barnett et al. 2015). Um den möglichen Einfluss der individuellen Strahlenempfindlichkeit besser zu verstehen, wurde 2018 durch die „*Multidisciplinary European Low Dose Initiative*“ (MELODI), ein Zusammenschluss von europäischen Forschungseinrichtungen, der dringende Bedarf an Studien zur Identifizierung und Validierung von Biomarkern zum Nachweis einer Strahlenexposition und individueller Strahlenempfindlichkeit festgestellt (Seibold et al. 2020). Trotz intensiver Forschung in den vergangenen 30 Jahren werden keine Biomarker und Testverfahren routinemäßig in Laboren und Kliniken eingesetzt. (Gomolka et al. 2020).

Ausgangspunkt für die Arbeit waren erhebliche Fortschritte in der Untersuchung von RIF Proteinen und die breite Anwendung der Immunfluoreszenz-Färbung zum Nachweis von RIF in strahlenbiologischen Forschungslaboren. Davon ausgehend wurde eine Reihe von Untersuchungen mit dem übergeordneten Ziel der Etablierung und Validierung von Reparaturfoci als Marker einer Strahlenempfindlichkeit und chronischen Strahlenexposition durchgeführt.

Zunächst wurde eine mikroskopische, semi-automatische Analyse von  $\gamma$ H2A.X Foci und mFISH Analyse von Chromosomenaberration nach *in vitro* Bestrahlung primärer Lymphozyten von acht AT Patienten durchgeführt, um festzustellen, ob ein Nachweis der ausgeprägten, genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit mit diesen Testverfahren und Biomarkern möglich ist.

Da neben  $\gamma$ H2A.X weitere DNA Reparaturproteine RIF bilden, wurden im Anschluss semi-automatische Auswertestrategien für 53BP1, MDC1 und pKAP1 etabliert. Trotz semi-automatischer Auswertungen können bei Untersuchungen von großen Bevölkerungsgruppen mit einer Vielzahl von Proben, diese häufig nicht direkt analysiert und ausgewertet werden und Untersuchungslabore können an ihre Kapazitäts- und Personalgrenzen gelangen. Daher wurde untersucht, inwieweit unerfahrene Mitarbeiter in die praktische Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung von RIF oder die manuelle Foci-Zählung eingebunden werden können. Die (Zwischen-)Lagerung von biologischen Proben kann in diesen Fällen ebenfalls sinnvoll sein. Um den Einfluss einer Kryokonservierung von primären Lymphozyten zu untersuchen, wurde die Bildung von RIF in frisch isolierten und kryokonservierte Lymphozyten verglichen.

Mithilfe der etablierten semi-automatischen Auswertestrategien und der erhaltenen Ergebnisse wurde die Eignung der Reparaturfoci-Analyse zum Nachweis einer chronischen Strahlenexposition in Proben von 106 ehemaligen Wismut Uranbergarbeitern untersucht. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Detektion von chronischer Strahlenexposition aufgrund einer potenziell erhöhten Rate an Chromosomenaberrationen möglich ist. Hierfür war es notwendig ein Auftauverfahren von kryokonservierten Lymphozyten für die Untersuchung von Chromosomenaberrationen zu etablieren.

Die durchgeführten Untersuchungen liefern Erkenntnisse zur Eignung von RIF als Biomarker zum Nachweis einer individuellen Strahlenempfindlichkeit und chronischen Strahlenexposition und zur möglichen Nutzung der Reparaturfoci-Analyse in populationsbasierten Studien und der routinemäßigen Anwendung in Laboren.

### 3. Material und Methoden

Für die Durchführung der experimentellen Arbeiten wurden die nachfolgenden Materialien verwendet und die aufgeführte Laborausstattung benötigt.

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Primäres Zellmaterial und Zelllinien

Art	Individuum	Bezugsquelle
<u>Kontrollen (für Etablierung)</u>		
primäre Lymphozyten	P15	FG Strahlenbiologie, Bundesamt für Strahlenschutz, Oberschleißheim, Deutschland
	P24	
	P38	
	P39	
	P44	
	P70	
	P93	
<u>AT Patienten und Kontrollen</u>		
primäre Lymphozyten	AT2	Dr. Dückers, Fachbereich für Kinder- und Jugendmedizin des HELIOS Krankenhaus Krefeld, Deutschland
	AT5	
	AT6	
	AT7	
	AT8	
	AT9	
	AT3	Prof. Dr. Borkhardt, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie, und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Deutschland
	AT4	
	K10	Dr. Kirlum, Kinderchirurgie in der Au, München, Deutschland
	K11	
	K12	
	K13	
	K14	
	K15	
	lymphoblastoide Zelllinie	K16
K17		
K18		
K19		
lymphoblastoide Zelllinie	CKR207	Prof. Dr. Kempkes, AG Gen Vektoren, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
	CKR226	
CKR227		
CKR240		
CKR241		
	GM03189	Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA
	GM03323	
<u>Wismut Uranbergarbeiter</u>		
primäre Lymphozyten	∑ 106 Probanden	FG Strahlenbiologie, Bundesamt für Strahlenschutz, Oberschleißheim, Deutschland

### 3.1.2 Chemikalien

Produkt	Hersteller
2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (Tris) (Trizma® Base)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Biocoll Trennlösung Dichte 1,077 g/mL	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Blockpuffer Odyssey® (TBS)	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Colcemid (10 µg/mL)	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eagle's Minimum Essential Medium mit nicht essentielle Aminosäuren (MEM NEAA)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Essigsäure (100%) Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fetales Rinderserum (FBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Glycerin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glycine	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Harnstoff	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamine	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Methanol CHROMASOLV™ >99,9%	Honeywell, Charlotte, USA
Natriumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natrium-Pyruvat	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Phytohämagglutinin L (PHA)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Pufferlösung pH4,01; pH7,00; pH10,00	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)-1640 mit stabilem L-Glutamine	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
RPMI-1640 ohne L-Glutamine	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
RPMI-1640 mit HEPES	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Salzlösung Natriumcitrat (SSC)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland)
Thioharnstoff	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tris/HCl, 1,5M, pH8.8	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypan Blau Lösung	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Türks Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween 20 (10%)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vectashield Antifade Mounting Medium mit/ohne 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	VECTOR LABORATORIES, INC., Burlingame, USA



### 3.1.5 Lösungen, Puffer und Medien

#### Blockpuffer für Immunfluoreszenzfärbung

BSA	1 %
Glycin	0,15 %
Phosphatpuffer 1x	ad

#### Einfriermedium isolierte Lymphozyten

RPMI-1640 Medium	69 %
FBS	20 %
DMSO	10 %
Pen/Strep	1 %

#### Elektrophoresepuffer

Tris (Trizma Base)	25 mM
Glycine	192 mM
SDS	0,1 %
ddH <sub>2</sub> O	ad

#### Fixativ

Methanol	75 %
Essigsäure (96%ig)	25 %

#### Lämmli-Puffer 1x

Tris/HCL, pH 8.8	25 mM
SDS	2 %
Glycerin	15 %
DTT	1 %
Bromphenolblau	einige Körner
ddH <sub>2</sub> O	ad
pH	7,5

#### Lysepuffer DIGE

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	4 %
Tris (Trizma Base)	25 mM
ddH <sub>2</sub> O	ad

#### Paraformaldehyd (2%ig)

Paraformaldehyd	2 g
Phosphatpuffer 1x	ad

#### Phosphatpuffer 1x

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
ddH <sub>2</sub> O	ad
pH	7,4

#### Trisgepufferte Salzlösung (TBS)

Tris (Trizma® Base)	20 mM
NaCl	150 mM
ddH <sub>2</sub> O	ad

#### Trisgepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBST)

Tris (Trizma® Base)	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1 %
ddH <sub>2</sub> O	ad

#### Wachstumsmedium lymphoblastoide Zelllinien

RPMI-1640 Medium	86,5 %
FBS	10 %
L-Glutamin (2 mM)	1 %
Na-Pyruvat (1 mM)	1 %
NEAA	1%
Pen/Strep	0,5 %

#### Wachstumsmedium zur Lymphozytenstimulierung von Vollblut

RPMI-1640 Medium	87 %
mit Hepes	25 mM
NaHCO <sub>3</sub>	2,0 g/L
NaCl	5,5 g/L
Phenolrot	5 mg/L
FBS	10 % (9,7)
Pen/Strep	1 % (0,4)
PHA	2 % (2,4)

#### Wachstumsmedium zur Lymphozytenstimulierung von kryokonservierten Lymphozyten

RPMI-1640 Medium	87 %
mit Hepes	25 mM
NaHCO <sub>3</sub>	2,0 g/L
NaCl	5,5 g/L
Phenolrot	5 mg/L
FBS	15 %
Pen/Strep	1 %
PHA	2 %

#### Wachstumsmedium kryokonservierte Lymphozyten

RPMI-1640 Medium	80 %
FBS	20 %

#### Waschmedium zur Lymphozytenstimulierung von kryokonservierten Lymphozyten

RPMI-1640 Medium	85 %
mit Hepes	25 mM
NaHCO <sub>3</sub>	2,0 g/L
NaCl	5,5 g/L
Phenolrot	5 mg/L
FBS	15 %

#### Waschpuffer für Immunfluoreszenzfärbung

Triton X-100	0,15%
Phosphatpuffer 1x	ad

### 3.1.6 Geräte und Laborbedarf

Produkt	Hersteller
Absaugpumpe KNF Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Analysenwaage SBC32	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
Autoklav VX-120	System GmbH, Linden, Deutschland
Blotter Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Brutschrank BBD6220	Thermo Scientific, Waltham, USA
CO2-Brutschrank CB210	Fa. Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Elektrophorese Kammer Criterion™ Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mikroskop AxioImager Z2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Hybridsierungsöfen ThermoBrite	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Imager ChemiDoc™ MP	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kolbenhubpipetten Research plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank -20 °C Mediline	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Kühlschrank -80 °C Innova U535	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Milliporeanlage Nanopure Diamond	Thermo Scientific, Waltham, USA
Multipette stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH-Meter CG840	Schott AG, Mainz, Deutschland
Photometer infinite M200	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Pipetten Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Powercell Power Pac universal	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Roller CAT RM5 V-80	Neolab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Röntgenkabinett RS225	Xstrahl Limited, Camberley, Großbritannien
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilwerkbank HSP18	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Stickstofftank 38K	Worthington Industries, Columbus, USA
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge mini G	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Transportinkubator Cell-Trans 4016	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Rosdorf, Deutschland
Vortexer MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Vortexer Vortex 1	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Waage SBC61	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
Waage CP124S	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad W350t	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

Wasserbad WNE7  
 Zentrifuge 1-15PK  
 Zentrifuge mini G  
 Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5810R  
 Zentrifuge Rotofix 32A

Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland  
 Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland  
 IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland  
 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
 Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

### 3.1.7 Verbrauchsmaterial

#### Produkt

Combitips advanced  
 Cryo Box  
 Cryo.s™ 1 ml  
 Deckgläser  
 Deckgläser  
 Färbekasten, nach Hellendahl  
 Gewebekulturplatten Cellstar  
 Gradientengel 4-15% Criterion™ TGX™  
 KIMTECH® Science Präzisionstücher  
 Kosmetiktücher 115-0600  
 LEUCOSEP RÖHRCHEN, 12 ML  
 LEUCOSEP RÖHRCHEN, 50 ML  
 Messpipetten Typ 3, Klasse B  
  
 Mr. Frosty™ Gefrierbehälter  
 Neubauer Zählkammer  
  
 Objektträgermappen  
 Pasteurpipetten  
 Pipettenspitzen ep.T.I.P.S Standard  
 Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes 1,5 mL  
 Rotilabo®-Färbekasten  
 Serologische Einmalpipetten  
 Single Cellfunnel Einweg, mit Filterkarte  
 StainTray™  
 Superfrost-Objektträger Plus  
 Zellkulturflaschen  
 Zentrifugenröhrchen (konisch), 15 mL  
 Zentrifugenröhrchen (konisch), 50 mL

#### Hersteller

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
 Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland  
 Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich  
 VWR International, Radnor, USA  
 Thermo Scientific, Waltham, USA  
 DWK Life Sciences, Wertehim, Deutschland  
 Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich  
 Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland  
 Kimberly-Clark, Irving, USA  
 VWR International, Radnor, USA  
 Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich  
 Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich  
 Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland  
 Thermo Scientific, Waltham, USA  
 Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland  
 Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen Deutschland  
 Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland  
 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland  
 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
 Tharmac GmbH, Wiesbaden, Deutschland  
 Simport Scientific, Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada  
 Thermo Scientific, Waltham, USA  
 Thermo Scientific, Waltham, USA  
 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

### 3.1.8 Software und Datenbanken

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Clinically Relevant Sequence Variations (ClinVar) Datenbank	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, USA
Endnote X7.2	Thomas Reuters, New York City, USA
Image Lab V5.2.1 build 11 2014	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
InkScape V0.91	Free Software Foundation, Inc., Boston, USA
Isis FISH Imaging System, V5.8	MetaSystems Hard & Software GmbH, Altusheim, Deutschland
Leiden Open Variation Database V3.0	Leiden University Medical Center, Leide, Niederlande
MetaClient V2.1.147	MetaSystems Hard & Software GmbH, Altusheim, Deutschland
Metafer4 V3.13.1	MetaSystems Hard & Software GmbH, Altusheim, Deutschland
MetaServer V2.1.147	MetaSystems Hard & Software GmbH, Altusheim, Deutschland
RStudio V0.99.467	RStudio Inc., Boston, USA.
Zen 2.6 blue edition	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Gewinnung und Kryokonservierung von humanen Lymphozyten**

Primäre, humane Lymphozyten wurden für die Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit und chronischen Strahlenexposition, für die Methodenetablierung zur Stimulierung von kryokonservierten Lymphozyten und zur Etablierung und Charakterisierung von Reparaturfoci-Analysen verwendet. Das biologische Material wurde im Rahmen eines Ethikvotums und nach Einverständnis der Spender gewonnen.

#### **Untersuchungskollektiv und Ethikvotum**

Für die Untersuchung der genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit wurde humanes Vollblut von acht Patienten mit Ataxia teleangiectatica in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie Düsseldorf (AT3 und AT4) oder im Fachbereich für Kinder- und Jugendmedizin des HELIOS Krankenhaus Krefeld (AT2, AT5, AT6, AT7, AT8 und AT9) gewonnen. Die Blutentnahme bei zehn gesunden Probanden der Kontrollgruppe wurde in der Kinderchirurgiepraxis in der Au in München oder am Bundesamt für Strahlenschutz in Neuherberg durchgeführt. Das Ethikvotum zur Durchführung der Untersuchungen von AT-Patienten wurde am 12. März 2014 mit der Ethik-Kommissions Nr. 4563R erteilt. Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde konsultiert. Zusätzlich wurde für die Untersuchung von gesunden Kontrollen am 6. Dezember 2011 das Ethikvotum mit der Ethik-Kommissions Nr. 11083 nach Konsultierung der Ethik-Kommission der Bayerischen Ärztekammer erteilt. Die Einwilligungserklärung wurde mit Informationen zur Patientenvorgeschichte und vergangenen, medizinischen Strahlenbelastungen von allen Spendern oder bei Minderjährigen von einem Elternteil abgegeben. Alle Spender oder Erziehungsberechtigten wurden über die Risiken einer Blutabnahme informiert.

Für die Untersuchung der chronischen Strahlenexposition wurde humanes Vollblut von chronisch exponierten Bergarbeitern (71-87 Jahre) in Studienzentren gewonnen. Das Ethikvotum zur Durchführung der Untersuchungen wurde am 29. Oktober 2008 mit der Ethik-Kommission Nr. 08082 erteilt. Die Ethik-Kommission der Bayerischen Landesärztekammer wurde gemäß §15 der Berufsordnung für die Ärzte Bayerns konsultiert. Alle Spender erteilten eine Einwilligungserklärung. Zusätzlich wurden Daten zum Rauchstatus, zu chronischen Erkrankungen, zur Medikamenteneinnahme und einer vorangegangenen, medizinischen Strahlenbelastung erhoben.

Die Methodenetablierung fand im Rahmen der Qualitätssicherung nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki und §15 der Berufsordnung für die Ärzte Bayerns für medizinische Forschung statt. Dazu wurde humanes Vollblut von anonymisierten, gesunden Spendern (18-40 Jahre) am Bundesamt für Strahlenschutz abgenommen und die Spender wurden über die Risiken und die zu etablierende Methoden aufgeklärt. Eine Einwilligungserklärung lag von allen Spendern vor.

### **Gewinnung von humanem Vollblut**

Nach Venenstauung und Hautdesinfektion wurde humanes Vollblut mittels Venenpunktur durch Kanülen der rechts- oder linksseitigen *Vena mediana cubiti* gewonnen. Das Blut wurde in Lithium-Heparin beschichteten Monovetten aufgefangen, mit Identifikationsnummern verblindet und bis zur Verarbeitung (maximal 3 h) bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

### **Isolierung von primären Lymphozyten aus humanem Vollblut**

Die Isolation von primären Lymphozyten aus humanem Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurden 15 mL Biocoll-Separationslösung auf den Trennfilter in 50 mL Leucosepröhrchen™ (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) vorgelegt und mit 1000 x g für 1 min bei RT zentrifugiert, damit sich die Separationslösung im Anschluss unterhalb des Filters befindet. Anschließend wurden 15 mL heparinisiertes Vollblut in das vorbereitete Reaktionsgefäß überführt und mit 1000 x g (Bremse 2) für 10 min bei RT zentrifugiert. Beruhend auf der Dichte von 1,077 g/mL der Trennlösung, wurde das Vollblut in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Der gesamte Überstand mit Blutplasma und Leukozyten wurde in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 5 mL RPMI-1640 Medium gemischt und mit 250 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet in 20 mL RPMI-1640 Medium gelöst. Es wurde je ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und mit Türk'scher-Lösung zur Bestimmung der Lymphozytenzahl oder mit Trypanblau zur Bestimmung der Viabilität gemischt. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow.

### **Kryokonservierung von isolierten Lymphozyten**

Zur Langzeitlagerung wurde das Zellgemisch in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen/mL in eiskaltem Einfriermedium (70 % RPMI-1640, 20 % fetales Rinderserum (FBS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Mithilfe eines Isopropanolbehälters („Mr. Frosty“) kühlten die Kryoröhrchen bis auf -80 °C bei 1°C/min herunter. Die Einfrierröhrchen wurden nach 24 h in flüssigen Stickstoff bei -196 °C gelagert.

### 3.2.2 Methoden für zellbiologische Arbeiten

Die Durchführung von grundlegenden zellbiologischen Arbeiten bilden die Voraussetzung der durchgeführten Untersuchungen zu Chromosomenschäden, Reparaturfoci und Proteinnachweisen.

#### **Auftauen von kryokonservierten Zellen**

Das Zellkulturmedium für isolierte Lymphozyten (80 % RPMI-1640, 20 % FBS) oder für lymphoblastoide Zelllinien (87 % RPMI-1640 mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat) wurde im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und pro Kryoröhrchen 2 mL in ein 15 mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Zellen im Kryoröhrchen wurden durch Erwärmung im Wasserbad vorsichtig aufgetaut, bis ausschließlich ein kleiner Eisklumpen vorhanden war. Die Zellsuspension wurde in das vorbereitete Reaktionsgefäß überführt und das Einfrieröhrchen mit 1 mL Zellkulturmedium gespült. Danach pelletierten die Zellen bei 250 x g für 8 min bei RT. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen, die Zellzahl und Zellviabilität bestimmt und in Zellkulturflaschen kultiviert.

#### **Kultivierung von humanen Lymphozyten**

Die Lymphozyten wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL in einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche oder in 15 mL Reaktionsgefäßen mit angeschraubten Deckel (zum verbesserten Gasaustausch) mit 80 % RPMI-1640 und 20 % FBS kultiviert. Die Kultivierung erfolgte für maximal 48 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

#### **Kultivierung und Passagierung von lymphoblastoiden Suspensionszellen**

Lymphoblastoide Suspensionszellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/mL in 87 % RPMI-1640 mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat in Zellkulturflaschen kultiviert. Zur Passagierung der Zellen wurde die Zellsuspension in Reaktionsgefäße überführt, die Zellkulturflasche zweimal mit Zellkulturmedium ausgespült und anschließend bei 200 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet in einer geringen Menge Zellkulturmedium gelöst, die Zellzahl und Zellviabilität bestimmt und die Zellen erneut in einer entsprechenden Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/mL eingesät. Für die Kryokonservierung von Suspensionszelllinien wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, bei 200 x g für 10 min pelletiert und die Zellen mit 1 mL eiskaltem Einfriermedium (70 % RPMI-1640, 20 % FBS und 10 % DMSO) in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden bis auf -80 °C bei 1°C/min mit Hilfe eines Isopropanolbehälters („Mr. Frosty“) kontrolliert heruntergekühlt. Nach 24 h konnten die Einfrieröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196 °C gelagert werden. Die Zelldichte betrug  $3 \times 10^6$  Zellen/mL.

### Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Die Zellzahl und Zellviabilität von primären Lymphozyten wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Es wurden 10 µL Zellsuspension im Verhältnis zwischen 1:2 und 1:10 mit Türk'scher-Lösung gemischt, für 2 min inkubiert und auf die Zählkammer aufgetragen. Die Leukozyten werden durch Türk'sche-Lösung angefärbt und die Erythrozyten lysiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden vier Großquadraten unter einem Lichtmikroskop gezählt. Jedes Großquadrat hat eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und Zählkammer und Deckglas haben einen Abstand von 0,1 mm. Damit ergibt sich pro Großquadrat ein Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> bzw. 1 µL. Die Zellzahl pro mL errechnet sich aus der Multiplikation des Mittelwertes aus den vier Großquadraten mit dem Kammerfaktor und der Verdünnung:

$$\text{Zellzahl/mL} = \bar{x} (\text{Zellzahl aus den Großquadraten}) * \text{Kammerfaktor} (10^4) * \text{Verdünnung}$$

Für die Bestimmung der Zellviabilität wurden 10 µL Zellsuspension im Verhältnis zwischen 1:2 und 1:10 mit Trypanblau-Lösung gemischt, für 2 min inkubiert und auf die Zählkammer aufgetragen. Trypanblau färbt spezifisch abgestorbene und perforierte Zellen an und wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen. Die Zellzahl von lymphoblastoiden Suspensionszellen wurde ausschließlich mit Trypanblau bestimmt:

$$\text{lebender Zellen (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{trypanblau positive Zellen} * 100}{\text{trypanblau positive Zellen} + \text{trypanblau negative Zellen}} \right)$$

### 3.2.3 Bestrahlung von Zellen mittels radioaktiver Quellen

Für die Untersuchung von Strahlenempfindlichkeit, DNA-Schäden und DNA Reparatur wurden die Zellen mit ionisierender Strahlung bestrahlt und geschädigt.

#### Bestrahlung von Zellen mittels $\gamma$ -Strahlung

Die Zellen wurden mit  $\gamma$ -Strahlung an der Cäsium-137 Quelle HWM-D-2000 (Hans Wälischmiller, Markdorf, Deutschland) am Helmholtz Zentrum München bestrahlt. Dazu wurden die Zellen in Reaktionsgefäßen oder Zellkulturflaschen bei einer Dosisrate von 0,44 Gy/min bei RT bestrahlt. Die applizierte Dosis lag zwischen 50 mGy und 10 Gy. Der Transport der Proben erfolgte in einem tragbaren Inkubator bei 37 °C. Nach der Bestrahlung wurden die Proben bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

#### Bestrahlung von Zellen mittels Röntgenstrahlung

Die Bestrahlung von Zellen mit Röntgenstrahlung wurde an einem Röntgenhochschutzgerät RS225 (X-Strahl GmbH, Ratingen, Deutschland) am Bundesamt für Strahlenschutz durchgeführt. Die Zellen wurden bei 195 kV und 10 mA mit einer Dosisrate von 0,59 Gy/min bei RT bei einer Filterung mit 0,5 mm Kupfer bestrahlt. Eine Styroporschablone mit stehenden 15 mL Reaktionsgefäßen befand sich in einem Abstand von 500 FSD zur Röntgenröhre und war direkt im Zentrum positioniert.

Der maximale Abstand der Reaktionsgefäße zum Zentrum betrug 20 FSD. Es wurde eine Dosis zwischen 50 mGy und 8 Gy appliziert. Die Proben wurden bei RT zur Strahlenquelle transportiert und nach der Bestrahlung bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### **3.2.4 Herstellung von Chromosomenpräparaten**

Für die Präparation von Chromosomen wurden ausdifferenzierte, ruhende G<sub>0</sub>-Lymphozyten zur Zellteilung durch chemische Agenzien angeregt. In der nachfolgenden Zellteilung wurden die Lymphozyten, nach Kondensation der Chromosomen, in der Metaphase festgehalten und die Chromosomen für eine Färbung und Mikroskopie präpariert. Zur Analyse von Chromosomenschäden wurden die Zellen nach Bestrahlung 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit der Kultivierung begonnen.

#### **Stimulieren von primären Lymphozyten in humanem Vollblut**

Es wurden 5 mL Kulturmedium (87 % RPMI-1640 Medium mit Hepes, 10 % FBS, 1 % Pen/Strep und 2 % PHA) in ein Schrägbodenröhrchen vorgelegt, 0,5 mL humanes Vollblut hinzugefügt und mehrfach invertiert. Phytohämagglutinin (PHA) ist eine mitogene Substanz, die die Zellteilung von Leukozyten initiiert (Nowell 1960). Die Kulturdauer der Suspension betrug insgesamt 48 h bei 37 °C.

#### **Auftauen und stimulieren von kryokonservierten Lymphozyten**

Die benötigte Anzahl an Aliquote mit isolierten Lymphozyten wurde abweichend von der beschriebenen Methode angetaut, bis ausschließlich ein kleiner Eisklumpen im Kryoröhrchen vorhanden war. Die Resuspendierung der Zellsuspension erfolgte in einem 15 mL Reaktionsgefäß mit 0,5 mL kaltem RPMI-1640 Medium mit Hepes. Es wurde in Intervallen von 1 min 1 mL, 3 mL und 5 mL kaltes RPMI-1640 Medium mit Hepes zugegeben, resuspendiert und anschließend mit 250 x g für 8 min bei RT zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet mit 5 mL Waschmedium (85 % RPMI-1640, 15 % FBS) bei RT gelöst und erneut mit 250 x g für 8 min bei RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut abgesaugt, das Pellet in FBS gelöst und zur Regeneration für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellzahl und Viabilität wurden bestimmt und die Zellsuspension auf 4x10<sup>6</sup> Zellen/mL eingestellt.

Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden 5 mL Kulturmedium (37 °C) für kryokonservierte Lymphozyten (82% RPMI-1640 Medium mit Hepes, 15% FBS, 1% Pen/Strep, 2% PHA) in ein Schrägbodenröhrchen vorgelegt, 0,5 mL der in FBS inkubierten Zellsuspension hinzugegeben und mehrfach invertiert. Die Kulturdauer der Suspension betrug insgesamt 72 h bei 37 °C.

### **Aufarbeitung und Chromosomenpräparation**

Nach 24 h Kulturdauer wurde die Zellteilung der Lymphozyten in der Metaphase mit 0,072 µg/mL (0,08 schreibt Uschi) Colcemid angehalten. Dazu wurde das Colcemid in die Schrägbodenröhrchen pipettiert, invertiert und die Suspension erneut bei 37 °C bis zur endgültigen Kulturdauer inkubiert.

Nach der gewünschten Kultivierungszeit wurden die Schrägbodenröhrchen mit der Zellsuspension mehrfach invertiert und mit 1000 x rpm (Bremse 2) für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1 mL abgesaugt und das Pellet wurde auf einem Schüttler bei 1500 rpm gelöst. Nach der vollständigen Resuspendierung des Pellet wurden 5 mL 0,075M KCl-Lösung (37 °C) zu der Zellsuspension gegeben. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 37 °C im Wasserbad. Nach dieser hypotonen Phase wurde mit 200 x g (Bremse 2) für 10 min bei RT zentrifugiert, der Überstand bis auf 1 mL über dem Pellet abgesaugt und das Pellet auf einem Schüttler bei 1500 rpm durch Auf- und Abwärtsbewegung vollständig resuspendiert.

Während sich das Schrägbodenröhrchen auf dem Schüttler befand, wurde tröpfchenweise eiskaltes Fixativ-Gemisch hinzugegeben, bis es zu einem dunklen Farbumschlag kam. Die Umdrehungen des Schüttlers wurden kurzzeitig von 1500 rpm auf 1800 rpm erhöht und anschließend tröpfchenweise 4 mL von dem Fixativ hinzugefügt. Bei gleichartiger Aufarbeitung der kryokonservierten Lymphozyten wurde dieser Farbumschlag nicht beobachtet. Hier wurde nach der Zugabe von 1 mL Fixativ die Umdrehung des Schüttlers kurzfristig erhöht und anschließend 4 mL Fixativ tröpfchenweise hinzugefügt. In beiden Fällen folgte ein Zentrifugationsschritt mit 200 x g (Bremse 2) für 10 min bei RT. Der Überstand wurde bis auf 1 mL über das Pellet abgesaugt und das Pellet erneut auf dem Schüttler bei 1500 rpm gelöst und mit 5 mL eiskaltem Fixativ versetzt. Dieser Waschschrift wiederholte sich solange, bis der Überstand nach erneuter Zugabe von Fixativ klar war. Die Chromosomensuspension wurde in Fixativ bei -20 °C gelagert und ist mehrere Monate bis Jahre haltbar.

Vor der Präparation der Chromosomen wurden die Objektträger gewaschen. Dazu wurden diese in einer Färbewanne mit Glasschaukel für 5 min mit heißem Wasser, 5 min mit vollentsalztem Wasser und dreimal mit bidestilliertem Wasser gespült.

Die Objektträger wurden bei 4 °C in bidestilliertem Wasser mit 2 mL Methanol für mindestens 2 h gekühlt und sind für maximal eine Woche verwendbar.

Die zu präparierende Zellsuspension wurde erneut mit eiskaltem Fixativ gewaschen und der Überstand soweit wie möglich abgesaugt, bis die Suspension opaleszent erscheint. Von den aus der Färbewanne entnommenen Objektträgern wurde die überschüssige Flüssigkeit abgestreift.

Es wurden 20 µL Zellsuspension aufpipettiert, die Objektträger getrocknet und die Qualität der Präparation im Lichtmikroskop beurteilt (Anzahl und Dichte der Zellen, Spreitung der Chromosomen und störendes Zytoplasma an den Chromosomen). Bei schlechter Qualität der Präparate wurde die Probe bei 2000 rpm erneut auf dem Schüttler gemischt, das Volumen der Zellsuspension verändert, wiederholt mit Fixativ gewaschen oder der Objektträger nach dem Aufbringen der Zellsuspension mit 20 µL Fixativ überschichtet. Die getrockneten Präparate lagerten bis zur weiteren Verwendung trocken und dunkel bei RT.

### **Zellzykluskontrolle von stimulierten Lymphozyten**

Zur Zellzykluskontrolle bei der Stimulierung von humanen Lymphozyten wurde das Kulturmedium mit 9 µg/mL 5-Brom-2-desoxyuridin versetzt. Das chemische Analogon zu Thymidin wird bei der DNA-Replikation in die neu zu synthetisierende DNA eingebaut (Eidinoff et al. 1959). Die Lymphozytensuspension wurde bei 37 °C kultiviert. 24 h vor Kulturende wurde 0,072 µg/mL Colcemid hinzugegeben, invertiert und erneut bei 37 °C bis zum Kulturende (48 h oder 72 h) inkubiert. Nach Kulturende wurden die Chromosomen auf Objektträgern präpariert.

#### **3.2.5 Analyse von Chromosomenschäden mittels mFISH-Färbung**

Für die genaue Identifikation und Charakterisierung von verschiedenen Schäden an Chromosomen wurde jedes Chromosomenpaar mit einer eigenen Kombination von fluoreszenzmarkierten, hochspezifischen Chromosomen-Sonden angefärbt. Dadurch gelang es mit Fluoreszenzmikroskopie und softwarebasierten Auswerteverfahren jedem Chromosomenpaar eine andere Farbe zuzuordnen und den Chromosomenschaden exakt zu klassifizieren.

#### **mFISH Färbung von Chromosomenpräparaten**

Für die multiplex-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (mFISH) [Nederloff 1989, Speicher 19964] Analyse wurden die Chromosomen zwei bis drei Tage vor der Hybridisierung wie beschrieben präpariert, die Präparate in einer Küvette für 30 min in 2 x SSC-Puffer bei 70 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend für 20 min in der Küvette auf RT abgekühlt. Es folgte eine Inkubation in Intervallen von 1 min in 0,1 x SSC-Puffer (RT), 0,07 Mol/L NaOH Lösung (RT), 0,1 x SSC-Puffer (4 °C), 2 x SSC-Puffer (4 °C) und in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit 70 %, 95 % und 100 % Ethanol die Dehydrierung.

Zeitgleich wurden die fluoreszierenden mFISH Chromosomen-Sonden (MetaSystems Probes GmbH, Altlussheim, Deutschland) im Thermozykler nach folgendem Protokoll denaturiert: 5 min bei 75 °C, 30 sek bei 10 °C, 30 min bei 37 °C. Auf die an der Luft getrockneten Präparate wurden pro Objektträger 10 µL denaturierte Sonde auf den Bereich der Chromosomenpräparation pipettiert und mit einem 22 x 22 mm Deckglas abgedeckt. Zum Schutz vor Austrocknung erwies sich eine Versiegelung des Deckglases mit Fixogum-Kleber (Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland) als vorteilhaft.

Danach schloss sich eine Inkubation für 24 h bei 37 °C in einem Hybridisierungssofen in feuchter Atmosphäre an. Nach der Hybridisierung wurden der Kleber und das Deckglas vorsichtig entfernt, die Präparate für 2 min in 0,4 x SSC-Puffer bei 72 °C im Wasserbad und danach für 2 min in 2 x SSC-Tween-Puffer bei RT inkubiert. Zur Vermeidung der Bildung von Kristallen wurden die Objektträger kurz zweimal in bidestilliertes Wasser getaucht und mit Druckluft getrocknet. Im Anschluss wurde mit 17 µL 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-*Antifade* (MetaSystems Probes GmbH, Altlussheim, Deutschland) gegengefärbt und ein 24 x 50 mm Deckglas aufgelegt. Nach einer Einwirkzeit von 10 min konnten die Präparate mikroskopiert werden. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **Immunfluoreszenzmikroskopie von mFISH gefärbten Chromosomenpräparaten**

Die Präparate wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie semi-automatisch an einem Metafer Scanning System (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland), bestehend aus dem Epifluoreszenzmikroskop Zeiss Axioimager Z2 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einer s/w CCD CoolCube Kamera (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland), einem motorisierten Objektträgertisch für 8 Objektträger (Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, Deutschland) und der Metafer4 Software (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland) aufgenommen. Zunächst wurde der zu mikroskopierende Bereich durch den Operator definiert und anschließend automatisch im DAPI-Filter und mit 10 x Objektivvergrößerung nach Metaphasen im Modus *MSearch Fluorescence* abgesucht. Die Grundlage der Metaphasenauswahl bildete der Klassifikator *Bm10*. In diesem Suchalgorithmus werden alle Strukturen erfasst, bei denen es sich um Metaphasen handelt. Im Setup wurde die Sensitivität so tolerant gewählt, dass möglichst alle Metaphasen eines Präparates erfasst wurden. Anschließend wurden manuell Metaphasen ausgewählt und im Modus *AutoCapt* mit dem Klassifikator *ACmFISH* aufgenommen. Dabei wurde jede ausgewählte Metaphase erneut durch das Mikroskop angesteuert und in den Fluoreszenzkanälen DAPI, FITC, Spectrum Orange, Texas Red, Cy5 und DEAC mit 63 x Objektivvergrößerung aufgenommen.

Zur weiteren Auswertung in ISIS (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland) wurden die aufgenommen Bilddateien in das Dateiformat *.mci* exportiert.

### **Klassifizierung von Chromosomenschäden**

Die Auswertung der Metaphasen erfolgte mit der Software ISIS (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland). Dabei wurde angestrebt pro Bedingung und Proband 200 Metaphasen auszuwerten. Es wurden nur vollständige Metaphasen mit  $46 \pm 1$  Centromeren ausgewertet.

Metaphasen mit schlechter Färbung, Fremdkörpern, unscharfen Bildaufnahmen, unklaren Überlagerungen von Chromosomen, unvollständiger Kondensation oder mehreren Metaphasen innerhalb einer Bilddatei wurden nicht in die Auswertung einbezogen. In den Bilddateien wurden die einzelnen Chromosomen einer Metaphase ausgeschnitten und entsprechend ihrer Färbung den Positionen im Karyogramm zugeordnet. Anschließend erfolgte die Zuordnung und Beschreibung des Chromosomenschadens an Anlehnung der mPAINT Nomenklatur (Tabelle 1) (Loucas and Cornforth 2001).

Chromosomenbrüche ohne erkennbaren Austausch (non-exchange) wurden in drei Gruppen unterschieden: verkürztes Chromosom mit dem dazugehörigen azentrischen Fragment (TTD), verkürztes Chromosom ohne begleitendes azentrisches Fragment (LTCr) und azentrisches Fragment ohne verkürztes Chromosom (LLAF).

Aberrationen, bei denen es durch zwei Chromosomenbrüche zwischen zwei Chromosomen zu einem Austausch von Chromosomenmaterial gekommen ist, wurden als einfache Translokation bezeichnet. Einfache Translokationen können vollständig (alle gebrochenen Chromosomenfragmente sind vereint), unvollständig (die gebrochenen Chromosomenfragmente sind nicht alle vereint, aber liegen in der Metaphase vor), oder einseitig sein (die gebrochenen Chromosomenfragmente sind nicht alle vereint und ein Fragment fehlt).

Eine Spezialform dieses Austausches von Chromosomenabschnitten sind dizentrische Chromosomen, bei denen sich zwei Chromosomenfragmente, die jeweils ein Centromer enthalten, zusammenlagern. Dizentrische Chromosomen wurden ebenfalls in vollständig, unvollständig und einseitig kategorisiert und in der Auswertung getrennt von einfachen Translokationen berücksichtigt.

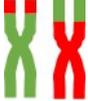
Aberrationen, bei denen es durch mindestens drei Chromosomenbrüche zwischen zwei oder mehr Chromosomen zu einem Austausch von Chromosomenmaterial gekommen ist, wurden als komplexe Chromosomenaustausche bezeichnet. Insertionen zählen zu komplexen Aberrationen und entstehen aus mindestens drei Brüchen. Dizentrische Chromosomen innerhalb von komplexen Aberrationen werden zusätzlich als dizentrisches Chromosom gewertet und getrennt berücksichtigt.

Schäden an Chromatiden (z.B. Brüche und Austausch) wurden nur als Chromatidschaden klassifiziert und nicht genauer spezifiziert. Zellen mit Chromatidschäden wurden als geschädigte Zelle bewertet, aber nicht die Lokalisation des Schadens aufgeführt.

Aberrationen, die mehrmals in gleicher Form und mit gleichem Bruchmuster, aber in verschiedenen Zellen auftreten (Karyotyp ist identisch), wurden als Klon bezeichnet und die Aberration nur einmal gewertet.

**Tabelle 1.** Übersicht der klassifizierten Chromosomenschäden mittels mFISH-Analyse.

Die beschriebenen und schematisch dargestellten Chromosomenaberrationen wurden in der mFISH-Analyse identifiziert und ausgewertet.

Aberration		Beschreibung		
Chromosomenbrüche ohne Austausch	TTD ( <i>true terminal deletion</i> )			
	LTCr ( <i>lone truncated chromosome</i> )			
	LLAF ( <i>lone linear acentric fragment</i> )			
einfacher Chromosomenaustausch (2 Brüche, 2 Chromosomen)	vollständig (alle Fragmente sind vereint)			
	unvollständig (Fragmente sind nicht alle vereint, aber in der Metaphase vorhanden)			
	einseitig (Fragmente sind nicht alle vereint und ein Fragment fehlt)			
	komplexer Chromosomenaustausch (≥ 3 Brüche, ≥ 2 Chromosomen)			
	Chromatidschaden			
			Chromatidbruch	Chromatidaustausch

Bei Zellen mit sehr komplexen Aberrationen, in denen viele Chromosomen aufgrund einer starken Schädigung betroffen sind, handelt es sich um sogenannte *rogue cells* (Awa and Neel 1986). Diese Zellen wurden separat gezählt, auch wenn nicht 46 Centromere vorhanden waren.

### 3.2.6 Bestimmung des Mitoseindex mittels Giemsa-Färbung

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden Chromosomenpräparate mit Giemsa-Lösung angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Zusätzlich erfolgte die Zellzykluskontrolle von stimulierten Lymphozyten.

#### Giemsa-Färbung von Chromosomenpräparaten

Die Chromosomen wurden wie beschrieben auf Objektträgern präpariert und in Küvetten für 5 min mit 3 % Giemsa-Lösung in PBS gefärbt. Die Präparate wurden dreimal in bidestilliertem Wasser gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Für die Analyse von dizentrischen Chromosomen wurden die Proben mit Eindeckmedium und Deckglas eingedeckt und für 24 h getrocknet.

#### Fluoreszenz- und Giemsa-Färbung von Chromosomenpräparaten

Die Zellreplikation wurde in vorbereiteten Chromosomenpräparate mit einer kombinierten Fluoreszenz- und Giemsa-Färbung überprüft (Perry and Wolff 1974). Dazu wurden die Präparate in Küvetten für 12 min mit Hoechst 33258 in PBS inkubiert, zweimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen, mit 20 µL bidestilliertem Wasser überschichtet und mit einem Deckglas bedeckt. Die Proben wurden für 20 min auf einer Heizplatte bei 60 °C und unter UV-Beleuchtung inkubiert. Danach wurde das Deckglas entfernt, die Objektträger einmal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und für 6 min mit 10 % Giemsa-Lösung in PBS gefärbt. Die Proben wurden dreimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen, mit Druckluft getrocknet, mit Eindeckmedium überschichtet und ein Deckglas aufgelegt. Die Präparate waren nach 24 h vollständig getrocknet und wurden mikroskopiert.

#### Durchlichtmikroskopie und Auswertung

Der Mitoseindex wurde mit dem Axio Lab.A1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) im Durchlicht bestimmt. Beginnend in der Mitte des Giemsa-gefärbten Präparates wurden pro Gesichtsfeld die Anzahl der Metaphasen und der Lymphozytenkerne gezählt. Tote Zellen und nicht-stimulierte Lymphozytenkerne wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Insgesamt wurden pro Objektträger 500 Zellen gezählt und der Mitoseindex berechnet:

$$\text{Mitoseindex [\%]} = \frac{\# \text{Metaphasen} * 100}{\# \text{Metaphasen} + \# \text{Lymphozytenkerne}}$$

Die Zellzykluskontrolle wurde am Metafer Scanning System (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland) bestehend aus dem Epifluoreszenzmikroskop Zeiss Axioimager Z2 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einer s/w CCD CoolCube Kamera (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland), einem motorisierten Objektträgertisch für 8 Objektträger (Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, Deutschland) und der Metafer4 Software (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland) durchgeführt. Das gesamte Präparat wurde automatisch im Durchlicht und mittels 10 x Objektivvergrößerung nach Metaphasen abgesucht. Anschließend wurden die identifizierten Metaphasen aufgenommen und durch den Experimentator überprüft.

### **3.2.7 Nachweis von DNA Doppelstrangbrüchen mittels Reparaturfoci-Analysen**

Für die Evaluierung der Folgen von ionisierender Strahlung auf die Zelle wurden DNA-Doppelstrangbrüche durch Reparaturfoci nachgewiesen. So ließen sich Signal- und Reparaturproteine an den DNA Schadensstellen mit Immunfluoreszenzfärbungen detektieren und deren Akkumulation und Verringerung im Zeitverlauf beobachten.

#### **Herstellung von mikroskopischen Präparaten und Fixierung zellulären Strukturen**

Zur Herstellung von mikroskopischen Präparaten wurde die Zellsuspension mithilfe der Rotofix 32A (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) auf Objektträger zentrifugiert. Dazu wurde ein Einmaltrichter durch ein spezielles Spanngestell (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) auf einen Objektträger befestigt und 100 µL Zellsuspension ( $10^5$  Zellen) in den Einmaltrichter pipettiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation von 700 x rpm (54 x g) für 5 min bei RT auf den Objektträger aufgebracht. Der Trichter und das Gestell konnte nach der Zentrifugation entfernt und die Zellsuspension auf dem Objektträger kurz an Luft getrocknet werden.

Die Zellen wurden auf den Objektträgern in 2 %igem Paraformaldehyd (PFA) für 15 min fixiert. Danach wurden die Objektträger in PBS überführt und bis zur weiteren Bearbeitung für maximal zwei Wochen in PBS bei 4 °C gelagert.

#### **Immunfluoreszenzfärbung von Reparaturfoci-Proteinen**

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen auf den Objektträgern dreimal für 5 min mit 0,15% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und die nicht-spezifischen Bindungsstellen dreimal für 10 min mit 1 % BSA/0,15 % Glycin in PBS gesättigt. Der Erst-Antikörper wurde in 1 % BSA/0,15 % Glycin in PBS verdünnt, 75 µL Antikörperlösung auf jeden Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt. Die Antikörper-Inkubation erfolgte in einer dunklen und feuchten Kammer für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C.

Nach der Inkubation wurde das Deckglas entfernt und die Objektträger zum Entfernen von nichtgebundenem Antikörper für 5 min mit PBS, für 10 min mit 0,15 % Triton X-100 in PBS, für 5 min mit PBS und für 7 min mit 1 % BSA/0,15 % Glycin in PBS gewaschen. Der Zweit-Antikörper wurde in 1 % BSA/0,15 % Glycin in PBS verdünnt und 75 µL der Antikörperlösung auf jeden Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt. Es folgte eine Inkubation von 45 min bei RT in einer dunklen und feuchten Kammer. Anschließend wurde das Deckglas entfernt und die Objektträger zweimal für 5 min mit 0,15 % Triton X-100 in PBS und anschließend für 10 min und danach für 7 min mit PBS gewaschen. Die Lymphozyten-DNA wurde mit DAPI oder Hoechst 33342 gegengefärbt. Dazu wurden pro Objektträger 17 µL Vectashield Eindeckmedium mit darin enthaltenem DAPI aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Alternativ wurden die Proben für 2 min mit Hoechst 33342 in PBS inkubiert, zweimal 2 min in PBS gewaschen und mit 17 µL Vectashield Eindeckmedium und einem Deckglas eingedeckt. Die gefärbten Objektträger wurden bis zur mikroskopischen Auswertung dunkel und bei 4 °C gelagert.

### **Immunfluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung von fluoreszenzmarkierten Reparaturfoci-Proteinen**

Die Präparate wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie semi-automatisch aufgenommen und die Signale pro Zelle analysiert. Zur Aufnahme diente ein Metafer Scanning System (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland) bestehend aus dem Epifluoreszenzmikroskop Zeiss AxioImager.Z2 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einer s/w CCD CoolCube Kamera (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland), einem motorisierten Objektträgertisch für 5 Objektträger (Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, Deutschland), einer externen, motorisierten Objektträgerereinspeisung und der Metafer4 Software (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Deutschland). Dadurch konnten bis zu 80 Präparate in einem Messverfahren in zufälliger Reihenfolge mikroskopiert werden. Der zu mikroskopierende Bereich und die zu analysierende Zellzahl wurden durch den Operator festgelegt. Die anschließende automatische Reparaturfoci-Analyse erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde das Präparat automatisch im DAPI-Filter und mittels 40 x Objektivvergrößerung fokussiert.

Bei einer 40 x Objektivvergrößerung werden 1360 x 1024 Pixel große Areale aufgenommen, die gegengefärbten Zellkerne der Lymphozyten im DAPI-Filter identifiziert und die Fluoreszenzsignale der markierten Reparaturfoci im FITC-Filter oder Spectrum-Orange-Filter dokumentiert. Im Anschluss erfolgte die softwarebasierte Verrechnung der aufgenommenen Fluoreszenzsignale pro Lymphozyt. Die Grundlage dafür bildet der eingesetzte Klassifikator mit dessen Hilfe punktförmige Signale, die in ihrer Sättigung und Intensität über dem Hintergrundsignal liegen, identifiziert und gezählt werden. Die Ergebnisse wurden in das .txt Format exportiert.

### **Datenauswertung und Evaluierung der semi-automatischen Reparaturfoci-Analyse**

Die weitere Auswertung der Reparaturfoci-Analyse erfolgte mittels Excel (Version 2013, Microsoft Corporation, Redmond, USA) und RStudio (Version 0.99.467, RStudio Inc. Boston, USA). In den exportierten Ergebnislisten im *.txt* Format, kann jeder analysierten Zelle die detektierten Fluoreszenzsignale zugeordnet werden. Diese Rohdaten wurden mittels deskriptiver und analytischer Statistik ausgewertet. Neben den Rohdaten wurden auch bewertete Datensätze in die Untersuchungen einbezogen. Dazu sind vom Experimentator die aufgenommenen Bilddateien nach der automatischen Mikroskopaufnahme mittels zuvor festgelegter Qualitäts- und Klassifizierungskriterien evaluiert worden. Bilddateien mit z.B. unscharfer Fokusebene, Fremdkörpern oder stark autofluoreszierende Strukturen wurden von der softwarebasierten Analyse ausgeschlossen und die Verrechnung der Fluoreszenzsignale erneut durchgeführt.

#### **3.2.8 Proteinnachweis mittels SDS-Gel und *Western blot* Analyse**

Zum Nachweis von endogenen Proteinen und deren Quantifizierung wurde die Gesamtproteinmenge aus Zellen isoliert, die Proteine nach ihrer Größe mittels SDS-Gel aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern in der *Western blot* Analyse nachgewiesen.

#### **Ernte von Zellen zum Nachweis von endogenen Proteinen**

Die zu analysierenden Suspensionszellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer *in vitro* Bestrahlung in 50 mL Reaktionsgefäße überführt und dreimal mit reinem RPMI-1640 Medium bei 300 x g für 10 min bei 4 °C gewaschen, der Überstand vorsichtig abgesaugt und die verbleibende Flüssigkeit mit Zellstoff entfernt. Anschließend wurde das Zellnassgewicht der Zellpellets bestimmt und das Pellet bis zur Proteinanalyse bei -80 °C gelagert.

#### **Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinmenge**

Die eingefrorenen Zellpellets wurden aufgetaut und mit 8 µL DIGE-Lysepuffer pro 1 mg Zellnassgewicht lysiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen bei 20,000 x g für 30 min bei RT zentrifugiert. Das sich im Überstand befindliche Proteingemisch wurde abgenommen.

Die Proteinmengenbestimmung erfolgte photometrisch nach Bradford (Bradford 1976) mit dem RC DC™ Protein Analyse Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bei einer Absorption von 750 nm. Als Standardkurve diente eine Verdünnungsreihe mit bovinem  $\gamma$ -Globulin 0 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL und 1 mg/mL. Für die anschließende SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben auf eine Proteinkonzentration von 2 µg/µL mit 3x Lämmli-Puffer eingestellt.

### **Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Gel und deren Nachweis mit *Western blot* Analyse**

Die Proteine wurden mit 4-15 %igen Criterion™ TGX™ Gradientengelen (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) aufgetrennt. Dazu mussten die Gele mit bidestiliertem Wasser gespült, mit den Gelkassetten in die Elektrophorese-Apparatur Criterion™ Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) eingesetzt und mit 1x Elektrophoresepuffer aufgefüllt werden. Die Auftrennung erfolgte für 15 min bei 50 Volt und für 40 min bei 200 Volt. 15 µL Probe (30 µg Proteingesamtmenge) und 5 µL Precision Plus Protein™ Proteinmarker (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) (verdünnt mit zusätzlichen 10 µL Lämmli-Puffer) wurden aufgetragen.

Nach dem Trennlauf wurde das Gel aus der Kassette gebrochen und mit bidestiliertem Wasser gespült. Es folgte eine *Stain free* Aufnahme (Gurtler et al. 2013) am Kamerasystem ChemiDoc™ MP (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit einer Aktivierungszeit von 45 sek automatischer Belichtungszeit.

Es folgte eine *Western blot* Analyse. Geblottet wurde im *semi-dry* Verfahren mit dem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und dem Trans-Blot® Turbo™ RTA Midi PVDF Transfer Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Die Filterpapiere wurden in Transferpuffer equilibriert und auf die Anoden-Kassette gestapelt, darauf wurden die PVDF-Membran und das Gel glatt und luftblasenfrei aufgelegt. Die PVDF-Membran musste zuvor in Methanol aktiviert und bis zur Verwendung in bidestiliertem Wasser gelagert werden. Das Gel wurde mit equilibriertem Filterpapier und der Kathoden-Kassette bedeckt. Der Blot erfolgte je nach Molekulargewicht der Proteine für 7 oder 10 min bei konstanten 2,5 A und 25 Volt.

Im Anschluss wurde die Membran kurz in bidestiliertem Wasser gespült und eine *Stain free* Aufnahme mit automatischer Belichtungszeit durchgeführt und dann die Membran für 2-3 h bei RT in 20 mL Blockpuffer (Li-Cor, Bad Homburg, Deutschland) geblockt. Die Inkubation der Membran mit dem Erst-Antikörper (gelöst in 10 mL Blockpuffer) erfolgte über Nacht bei RT und unter Rotation.

Nach der Inkubation wurde die Membran fünfmal für 5 min mit TBST Puffer nach Gilda und Gomes (Gilda and Gomes 2013) gewaschen und mit dem Zweit-Antikörper (anti-Maus/anti-Kaninchen IgG StarBright™ Blue 700 Goat; Bio-Rad Laboratories GmbH, 1:10,000) in 10 mL Blockpuffer für 1 h bei RT unter Rotation inkubiert. Die Membran wurde anschließend viermal für 5 min in TBST und einmal für 5 min in TBS gewaschen und abschließend mit bidestiliertem Wasser gespült.

Die Dokumentation der Fluoreszenzsignale erfolgte am Kamerasystem ChemiDoc™ MP (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Von der feuchten Membran wurde zunächst das Signal des Antikörpers mit dem blauen LED Modul aufgenommen. Die manuelle Belichtungszeit wurde so eingestellt, dass das Signal der Banden knapp unter der beginnenden Sättigung lag. Anschließend wurde das Signal des Markers mit dem roten LED-Modul (Cy5) aufgenommen. Anschließend wurde die Membran für 2 bis 3 h auf Filterpapier und in Dunkelheit getrocknet und die Aufnahmen erneut durchgeführt. Dadurch konnten schärfere und klare Signale für die Auswertung erzielt werden. Die Speicherung der Fotodateien als *Multichannel*-Datei für die Auswertung schloss sich an.

### **Quantifizierung von Proteinmengen in *Western blot* Analysen mittels *Stain free* Technologie**

Für einige Proteine wurde eine Quantifizierung der *Western blot* Signale vorgenommen. Dazu wurden die Proteinbanden mithilfe der Software ImageLab (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) densitometrisch quantifiziert. Für die Auswertung wurde die *Stain free* Aufnahme der Membran nach dem Blot (Gesamtintensität der Spuren) und die Aufnahme der Membran nach der Inkubation mit dem Antikörper (Signalintensität Zielprotein) verwendet. Mit dem Analysewerkzeug (*Lanes and Bands*) der Software wurden zunächst die einzelnen Spuren und Banden definiert und in eine zweidimensionale Darstellung überführt. Es wurde die Fläche unter der Signalkurve berechnet und damit die Bande mittels absoluter Volumenintensität quantifiziert. Die Signalintensität des Zielproteins wird bei der *Stain free* Methode nicht zu einem Referenzprotein, sondern zur Gesamtintensität der jeweiligen Spur (der Gesamtproteinmenge) normalisiert. Zur Vergleichbarkeit von Signalen innerhalb eines Blots und zwischen verschiedenen Blots erfolgte eine Relativierung zu einer eingesetzten Kontrolle. Durch diese Methode verzerrt eine mögliche Strahlenregulation eines Referenzproteins nicht die Ergebnisse des zu untersuchenden Proteins (Gurtler et al. 2013).

### **3.2.9 Statistische Analyse**

Zur Beschreibung und Auswertung der experimentell erzielten Ergebnisse wurden statistische Methoden genutzt. Dadurch gelang auf der einen Seite eine Abschätzung und Einordnung der Ergebnisse und auf der anderen Seite der Vergleich zwischen verschiedenen Replikaten und Individuen.

#### **Statistische Auswertung der Reparaturfoci-Analyse**

Objektträger mit Abweichungen im Färbe- oder Messprotokoll, schlechter Färbequalität, auffälliger Zellmorphologie, weniger als 500 auswertbaren Zellen oder unscharfen, falsch fokussierten Bereiche wurden von der Analyse ausgeschlossen. Ausnahme hiervon bildet die Etablierung der semi-automatischen Reparaturfoci-Analyse von DNA Reparaturproteinen, bei der zusätzlich die Rohdaten ohne Qualitätskontrolle ausgewertet wurden.

In der Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit von AT Patienten wurde der Mittelwert der  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern für jeden Objektträger ermittelt. Waren technische Replikate vorhanden, so wurden diese aufgrund geringer technischer Variationen zusammengefasst. Der Wilcoxon-Mann-Whitney Test wurde angewendet um Unterschiede zwischen AT Patienten und Kontrollen für die einzelnen Dosis- und Zeitpunkte zu vergleichen. Der Anteil reparierter Foci wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Anteil reparierter Foci (\%)} = \frac{(\text{Foci pro Zellkern 1h} - \text{Foci pro Zellkern 6h})}{\text{Foci pro Zellkern 1h}}$$

In der Etablierung der semi-automatischen Reparaturfoci-Analyse und der Untersuchung des Einflusses der Kryokonservierung wurde der Mittelwert der Foci pro Zellkern für jeden Objektträger und anschließend der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes für jeden Dosis- und Zeitpunkt aus den unabhängigen Replikate ermittelt, um die Messgenauigkeit der etablierten Quantifizierung einzuschätzen. Der Anteil der reparierten Foci wurde wie zuvor beschrieben bestimmt. Der Unterschied in der mittleren Foci Anzahl zwischen zwei Dosispunkten oder zwischen frisch isolierten und kryokonservierten Lymphozyten wurde mit dem Welch T-Test evaluiert. Die Unterschiede in der mittleren Foci Anzahl bei der Präparation von Objektträgern zwischen ungeübten Mitarbeitern und Experten wurden ebenfalls mit dem Welch T-Test evaluiert. Dafür wurde angenommen, dass die Mittelwerte ungefähr normalverteilt sind und Gruppen ungleiche Varianzen aufweisen. Zusätzlich wurde der Mittelwert mit dem 95 %igen Konfidenzintervall für alle präparierten Objektträger der Experten oder ungeübten Mitarbeiter berechnet. Zur Einschätzung der manuellen Foci Zählung von ungeübten Mitarbeitern wurde zunächst eine semi-automatische Quantifizierung durchgeführt. Dazu wurde der Mittelwert der Foci pro Zellkern für jeden Objektträger und anschließend der Mittelwert aus den technischen Replikaten berechnet, eine Spline-Regression 3.Grades bestimmt und das 95 %ige Konfidenzintervall ermittelt. Für die manuelle Zählung wurde ebenfalls eine Spline-Regression 3.Grades für die Zählung des Experten und der ungeübten Mitarbeiter (zusätzlich mit 95 %igen Konfidenzintervall) bestimmt. Die Unterschiede in der Zählung zwischen jedem einzelnen Anfänger und dem Experten wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test evaluiert, bei dem jede Zelle als eigenständige Beobachtung gewertet wurde.

In der Untersuchung der chronischen Strahlenexposition von Wismut Bergarbeitern wurde die mittlere Foci Anzahl pro Zellkern für jeden Objektträger und Bergarbeiter oder die interne Kontrolle bestimmt. Zur Einschätzung der interexperimentellen Variation wurde der normalisierte Interquartilsabstand (Interquartilsabstand/Median) für jeden Dosispunkt bestimmt, um die Schwankungen zwischen den Versuchen zu ermitteln. Zur Analyse des Zusammenhangs zwischen Anzahl der Reparaturfoci und Strahlenexposition wurde die

Spearman's Rangkorrelation verwendet. Zusätzlich wurden die Wismut Bergarbeiter nach der Expositionshöhe gruppiert und die Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney Test verglichen.

### **Statistische Auswertung der Chromosomenanalyse**

Probanden mit weniger als 50 auswertbaren Metaphasen wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die Aberrationsrate der untersuchten Parameter wurde zunächst im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten Zellen bestimmt.

In der Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit von AT Patienten wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney Test angewendet, um Unterschiede zwischen AT Patienten und Kontrollen für die einzelnen Dosis- und Zeitpunkte zu vergleichen. Zur Analyse des Effektes der Bestrahlung, wurde ein Regressionsmodell angewendet und der Interaktionseffekt von Dosis und Probandengruppe (AT oder Kontrolle) bestimmt. Der strahlen-induzierte Anstieg wurde als Differenz zwischen der Anzahl der Aberrationen beider Dosispunkte (1 Gy vs. 0 Gy) definiert. Um dem Versuchsaufbau Rechnung zu tragen, wurde ein Mehrebenenmodell mit Hilfe des R-Paketes *lmerTest* angewendet (Kuznetsova et al. 2017). Dieses Modell wurde ebenso genutzt, um die Unterschiede und die Interaktion zwischen Dosis und Probandengruppe im Hinblick auf die Chromosomenübergänge zu ermitteln. Ein entsprechender Chromosomenübergang muss dafür in mindestens fünf Individuen ermittelt worden sein. Die Betrachtung von multiplen Testproblemen mit der Anpassung der Falscherkennungsrate erfolgte dabei nach Benjamini und Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995). Zur Bestimmung der erwarteten Anzahl an Brüchen pro Chromosomen wurde die gesamte Anzahl der Brüche zur Länge der Chromosomen ins Verhältnis gesetzt. Die Anzahl der Basenpaare pro Chromosom wurde dabei von <http://www.ensembl.org> übernommen (Yates et al. 2019).

In der Untersuchung der chronischen Strahlenexposition von Wismut Bergarbeitern wurden die Anzahl der geschädigten Zellen und Aberrationen mit der absorbierten Gesamtorgandosis auf das rote Knochenmark oder die kumulative Radonbelastung korreliert. Zur Analyse des Zusammenhanges zwischen Chromosomenschäden und Strahlenexposition wurde die Spearman's Rangkorrelation verwendet. Zusätzlich wurden die Wismut Bergarbeiter nach der Expositionshöhe gruppiert und die Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney Test verglichen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Nachweis einer genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit

Zum Nachweis von Strahlenempfindlichkeit wurden zunächst Biomarker in primären Lymphozyten von Patienten mit Ataxia teleangiectatica (AT) validiert, die die bekannte genetisch-bedingte Überempfindlichkeit auf ionisierende Strahlung nachweisen können. Dazu wurde die Signalisierung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB) direkt nach einer Exposition mittels Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2A.X analysiert. Zusätzlich wurden chromosomale Aberrationen als Endresultat und Qualitätsmerkmal der DNA Reparatur evaluiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden in einem Manuskript zur Veröffentlichung zusammengestellt und eingereicht (Bucher, Endesfelder, et al. 2020).

#### 4.1.1 Charakterisierung des Untersuchungskollektivs

Die Validierung der Biomarker erfolgte in einem Kollektiv von acht AT Patienten (AT2 – AT9) und zehn gesunden Kontrollen (K10 – K19). Bei den AT Patienten handelt es sich um drei weibliche und fünf männliche Probanden in einem Alter zwischen zwei und 20 Jahren (Median: 12 Jahre). Die Probanden AT6 und AT7 und die Probanden AT8 und AT9 sind Geschwisterkinder (Tabelle 2). Alle AT Patienten zeigten den typischen klinischen Phänotyp und befanden sich zum Zeitpunkt der Probengewinnung in dauerhafter ärztlicher Behandlung und erhielten als Medikation Antibiotika und eine IgG Substitution. Zu diagnostischen Zwecken erfolgte in vorhergehenden Untersuchungen bei sechs Patienten eine genauere Bestimmung der Mutation im *ATM*-Gen mittels Sequenzierung an den jeweiligen Kliniken. Als Referenz-Sequenz wurde NM\_000051.3 zu Grunde gelegt und die Exon-Zuordnung erfolgte nach der *ATM* Datenbank der *Leiden Open Variation* Datenbank (LOVD) (Fokkema et al. 2005) v.3.0 Build 23 <https://databases.lovd.nl/shared/view/ATM>. Die Sequenzierung ergab, dass bei vier der sechs untersuchten Patienten eine unterschiedliche Mutation im *ATM*-Gen vorliegt. Die Geschwisterkinder wiesen jeweils die gleiche Mutation auf. Die homozygoten Mutationen von vier Patienten waren bereits in der *Leiden Open Variation* Datenbank hinterlegt. Die Kontrollgruppe umfasst neun männliche und einen weiblichen Probanden im Alter zwischen fünf und 19 Jahren (Median: 7 Jahre). Bei den Probanden K13 und K14 handelt es sich um Geschwisterkinder (Tabelle 2). Alle Probanden der Kontrollgruppe waren unauffällig in Bezug auf AT. Sechs der zehn gesunden Probanden waren im Rahmen von chirurgischen Routineeingriffen von Phimosen oder Hernien in ambulanter ärztlicher Behandlung in der kinderchirurgischen Praxis in der Au in München.

**ATM-Gen kann von zahlreichen Mutationen betroffen sein und unterschiedliche Auswirkungen haben**

Die molekulare Ursache der identifizierten ATM Mutationen wurden mithilfe der LOVD des Leiden *University Medical Center* und der ClinVar Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* genauer analysiert (Landrum et al. 2018) (Tabelle 2).

Die Sequenzierung des ATM-Gens für Patient AT4 zeigte eine homozygote Deletion der Nukleinsäure Adenin im Exon 34 an Position 4844 in der cDNA (c.4844delA). Durch diese Deletion kommt es zu einer Leserasterverschiebung (*frameshift* Mutation), wodurch das Codon für die Aminosäure Lysin (Lys; K) nicht mehr abgelesen wird, sondern stattdessen die Aminosäure Arginin (Arg; R) gebildet wird. Diese Mutation wurde bereits im Zusammenhang mit AT und mit der Interpretation „krankheitsauslösend“ in ClinVar übermittelt.

Für Patient AT5 wurde homozygot eine einzelne Nukleinsäuresubstitution in Exon 43 ermittelt. An der Position 6047 kam es zu einer Punktmutation und zu einem Austausch von Adenin zu Guanin (c.6047A>G). Durch diese nicht-synonyme Mutation (*missense* Mutation) wird statt der Aminosäure Asparaginsäure (Asp; D) die Aminosäure Glycin (Gly; G) codiert. Diese Mutation wurde einmal als „wahrscheinlich krankheitsauslösend“ in ClinVar übermittelt.

Die Geschwisterkinder AT6 und AT7 wiesen homozygot im Exon 54 an Position 7788 eine Substitution der Nukleinsäure Guanin zu Adenin (c.7788G>A) auf. Durch diesen einzelnen Nukleotidaustausch verändert sich das Codon von Guanin, Adenin, Guanin (GAG) zu Guanin, Adenin, Adenin (GAA). Beide Codons kodieren jedoch für die gleiche Aminosäure Glutaminsäure (Glu; E). Die molekulare Konsequenz ist damit zunächst in beiden Fällen synonym (*stille* Mutation). Diese Mutation wurde in ClinVar zweimal im Zusammenhang mit AT als „krankheitsauslösend“ und „wahrscheinlich krankheitsauslösend“ interpretiert.

Der Patient AT8 und AT9 zeigten eine heterozygote Deletion der Nukleinsäuren Thymidin und Guanin an Position 4096 und 4097 (c.4096\_4097delTG) im Exon 27. Durch diese Deletion kommt es in gleich zwei Codons zu einem Fehler, sodass die Aminosäuren Cystein (Cys; C) und Asparaginsäure (Asp, D) nicht codiert werden. Stattdessen wird nun durch die Deletion ein Stoppcodon codiert (*nonsense* Mutation). Zu dieser Mutation liegen in ClinVar zwei Einträge im Zusammenhang mit AT vor, die diese Mutation als „krankheitsauslösend“ und „wahrscheinlich krankheitsauslösend“ interpretieren. Zusätzlich wurde in beiden Patienten eine heterozygote Substitution von Guanin zu Thymidin an der Position 5762+1 (c.5762+1G>T) im Intron 38 identifiziert. ClinVar enthält zwei Einträge im Zusammenhang mit AT, die diese Mutation als „wahrscheinlich krankheitsauslösend“ charakterisieren.

Von allen Probanden wurde humanes Vollblut gewonnen und Präparate zur Chromosomenanalyse angefertigt, Lymphozyten isoliert und kryokonserviert oder durch die AG Gen Vektoren des Helmholtz Zentrums München lymphoblastoide Zelllinien generiert.

**Tabelle 2. Übersicht der untersuchten Untersuchungskollektive.**

Acht Patienten mit Ataxia teleangiectatica und zehn gesunde Kontrollen wurden mit verschiedenen Testverfahren auf Strahlenempfindlichkeit untersucht. Angegeben ist die Probanden ID, Geschlecht, Alter, ethnische Herkunft, Mutation mit der Auswirkung der identifizierten Veränderungen im ATM-Gen und Komorbiditäten. Die Probanden in der Kontrollgruppe hatten keine bekannte Mutation im ATM-Gen und waren in ambulanter chirurgischer Behandlung oder freiwillige Blutspender.

ID	Geschlecht	Alter <sup>1</sup>	ethnische Herkunft	ATM-Gen Mutation	Mutationsart	Proteinveränderung	Komorbidität
<b>A72</b>	m	20	TUR	klinisch auffällig			anfällig für bakterielle Infektionen
<b>A73</b>	w	16	MAR	klinisch auffällig			wiederkehrende Pneumonien
<b>A74</b>	m	11	MAR	HOM Exon 34 c.4844delA	Deletion ( <i>frameshift</i> )	p.Lys1615Argfs	Diabetes mellitus Herpes-simplex-Enzephalitis
<b>A75</b>	m	5	TUR	HOM Exon 43 c.6047A>G	Einzel Nukleotid Variante ( <i>missense</i> )	p.Asp2016Gly	wiederkehrende Pneumonien und Otitis media
<b>A76<sup>2</sup></b>	m	13	TUR	HOM Exon 54 c.7788G>A	Einzel Nukleotid Variante ( <i>silent</i> )	p.Glu2596=	Hypogammaglobulinämie (IgG, IgA, IgM) anfällig für bakterielle Infektionen
<b>A77<sup>2</sup></b>	m	2	TUR	HOM Exon 54 c.7788G>A	Einzel Nukleotid Variante ( <i>silent</i> )	p.Glu2596=	wiederkehrende Pneumonien Zysten der Haut und Café-au-lait-Flecken
<b>A78<sup>3</sup></b>	w	14	GER	HET Exon 27 c.4096-4097delTG/Intron 38 c.5762+1	Deletion ( <i>nonsense</i> )/ Einzel Nukleotid Variante (Veränderung Spleißstelle)	p.Cys1366_Asp1367delinsTer/u nbekannt	Hypogammaglobulinämie (IgG, IgA) anfällig für bakterielle Infektionen wiederkehrende Pilz-Infektionen
<b>A79<sup>3</sup></b>	w	8	GER	HET Exon 27 c.4096-4097delTG/Intron 38 c.5762+1	Deletion ( <i>nonsense</i> )/ Einzel Nukleotid Variante (Veränderung Spleißstelle)	p.Cys1366_Asp1367delinsTer/u nbekannt	Candida-Sepsis Infektion des Blutkreislaufes postinfektiöse Enzephalitis Thrombose der Vena subclavia sinistra prä-B akute lymphatische Leukämie (im Alter von 7 Jahren)
				G>T			Exitus letalis (im Alter von 11 Jahren)

<b>K10</b>	m	5	SEE
<b>K11</b>	m	8	SEE
<b>K12</b>	m	5	SEE
<b>K13<sup>4</sup></b>	m	5	SEE
<b>K14<sup>4</sup></b>	m	10	SEE
<b>K15</b>	w	5	SEE
<b>K16</b>	m	6	GER
<b>K17</b>	m	17	GER
<b>K18</b>	m	16	GER
<b>K19</b>	m	19	GER

Abkürzungen: w, weiblich; m, männlich; TUR, Türkei; MAR, Marokko; GER, Deutschland; SEE, Südosteuropa; HOM, homozygote Mutation; HET, kombiniert heterozygote Mutation; <sup>1</sup> Patientenalter zum Zeitpunkt der Probengewinnung; <sup>2</sup> AT6 und AT7 sind Geschwister; <sup>3</sup> AT8 und AT9 sind Geschwister; <sup>4</sup> K13 und K14 sind Geschwister.

#### **4.1.2 Nachweis genetisch-bedingter Strahlenempfindlichkeit mittels $\gamma$ H2A.X Analyse**

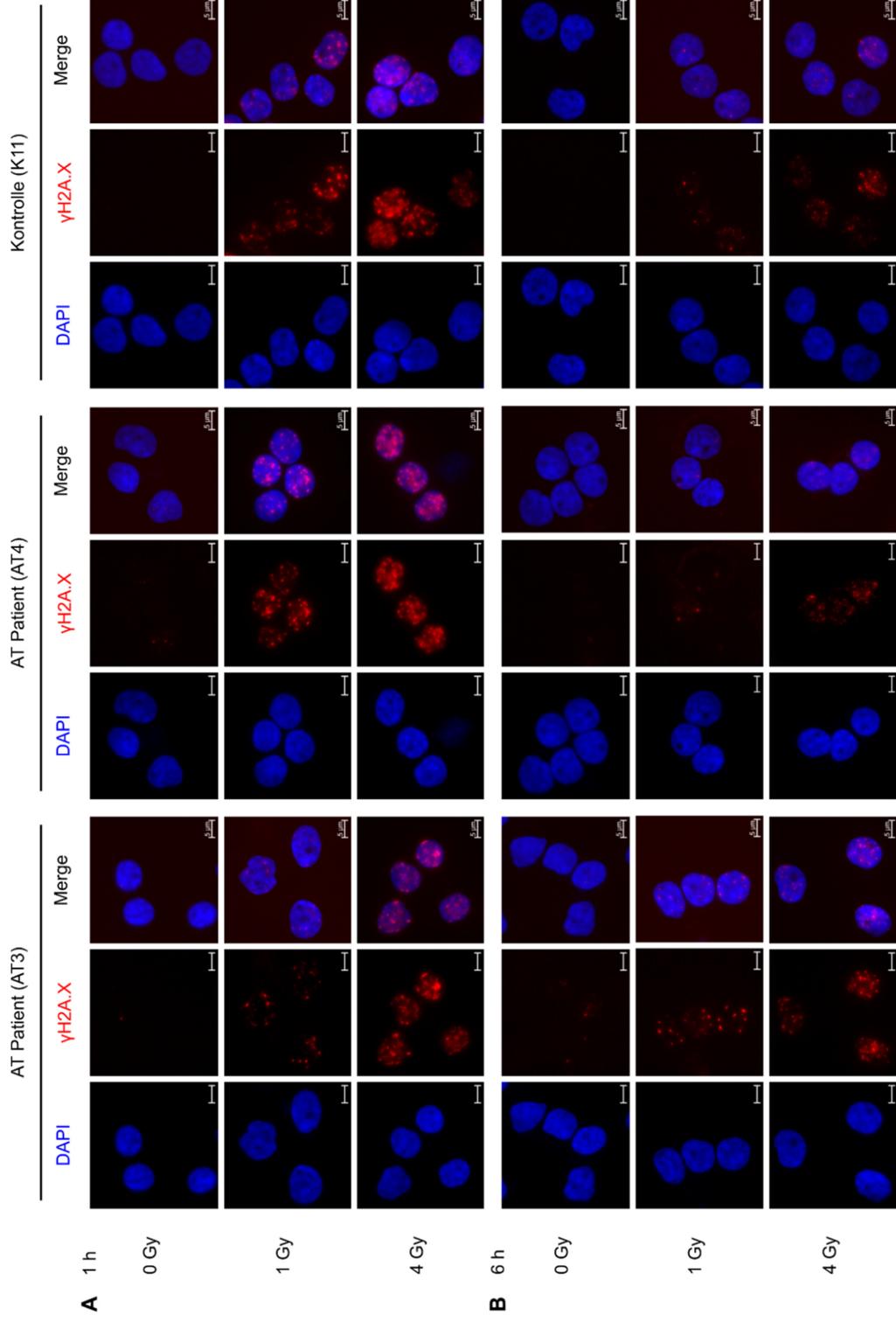
Die Signalisierung und Reparatur von DSB wurde mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung von phosphoryliertem H2A.X (Ser139,  $\gamma$ H2A.X) 1 und 6 h nach *in vitro* Bestrahlung mit einer Cäsium-137 Quelle (0, 1 und 4 Gy) in isolierten und kryokonservierten Lymphozyten analysiert (Kapitel 3.2.2, 3.2.3 und 3.2.7). Mit der Visualisierung von  $\gamma$ H2A.X sollten mögliche Unterschiede zwischen AT Patienten und den gesunden Kontrollen im induzierten DNA Schaden und der Reparaturkapazität detektiert und  $\gamma$ H2A.X für den Nachweis einer Strahlenempfindlichkeit validiert werden. Abbildung 6 zeigt repräsentative Aufnahmen der  $\gamma$ H2A.X Signale zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Bestrahlung.

Nach Evaluierung der angefertigten Objektträger (Kapitel 3.2.7 und 3.2.9) mussten die Proben von drei AT Patienten (AT2, AT7 und AT9) von der Auswertung ausgeschlossen werden. Insgesamt wurden in der semi-automatischen Analyse 672.167 Zellen, mit einer mittleren Zellzahl von 2.636 Zellen pro Objektträger, untersucht.

##### **Initiale $\gamma$ H2A.X Foci Bildung zeigt individuelle Unterschiede bei AT Patienten**

Ohne Bestrahlung wurden in wenigen Zellkernen einzelne punktförmige Signale von  $\gamma$ H2A.X beobachtet. Die Anzahl der spontanen  $\gamma$ H2A.X Signalen war in AT-Patienten (Median: 1,3 Foci/Zellkern) und Kontrollen (Median: 1,5 Foci/Zellkern) annähernd gleich ( $P=0,22$ ). Dabei lag der Wertebereich der mittleren Foci Anzahl zwischen 1,4 (AT4) und 2,5 Foci pro Zellkern (AT8) in den AT-Patienten und zwischen 1,1 (AT17) und 2,2 (AT12) Foci pro Zellkern in den Kontrollen (Abbildung 7B).

In beiden Gruppen wurde die Bildung von punktförmigen  $\gamma$ H2A.X Signalen 1 h nach Bestrahlung mit einem dosis-abhängigen Anstieg (0 vs. 1 vs. 4 Gy) in der Foci Anzahl beobachtet und deutet damit auf die Erkennung von DSB hin (Abbildung 7A). Bei einer Dosis von 4 Gy waren die einzelnen  $\gamma$ H2A.X Signale aufgrund ihrer Vielzahl mit dem Auge nur noch schwer voneinander zu unterscheiden. Die Signale waren in allen Fällen über den gesamten Zellkern verteilt (Abbildung 6). Bei Betrachtung der Unterschiede beider Gruppen, zeigten AT Patienten tendenziell eine geringere Induktion von Foci im Vergleich zu den Kontrollen nach Bestrahlung mit 1 Gy (Abbildung 7C; Median: 7,1 vs. 20,5 Foci/Zellkern;  $P=0,52$ ) und 4 Gy (Abbildung 7D; Median: 30,4 vs. 42,3 Foci/Zellkern;  $P=0,66$ ). Jedoch wurden starke individuelle Unterschiede bei den AT Patienten festgestellt. Die mittlere Foci Anzahl der zwei AT Patienten (AT4, AT8) war für 1Gy vergleichbar mit dem oberen Wertebereich der Kontrollen (Abbildung 7C; Wertebereich Kontrollen: 11,6 – 31,4 Foci/Zellkern vs. Wertebereich AT4/AT8: 25,6 – 33,4 Foci/Zellkern) und für 4 Gy höher als die mittlere Foci Anzahl der Kontrollen (Abbildung 7D; Wertebereich Kontrollen: 31,8 – 51,4 Foci/Zellkern vs. Wertebereich AT4/AT8: 65,7 – 78,5 Foci/Zellkern).



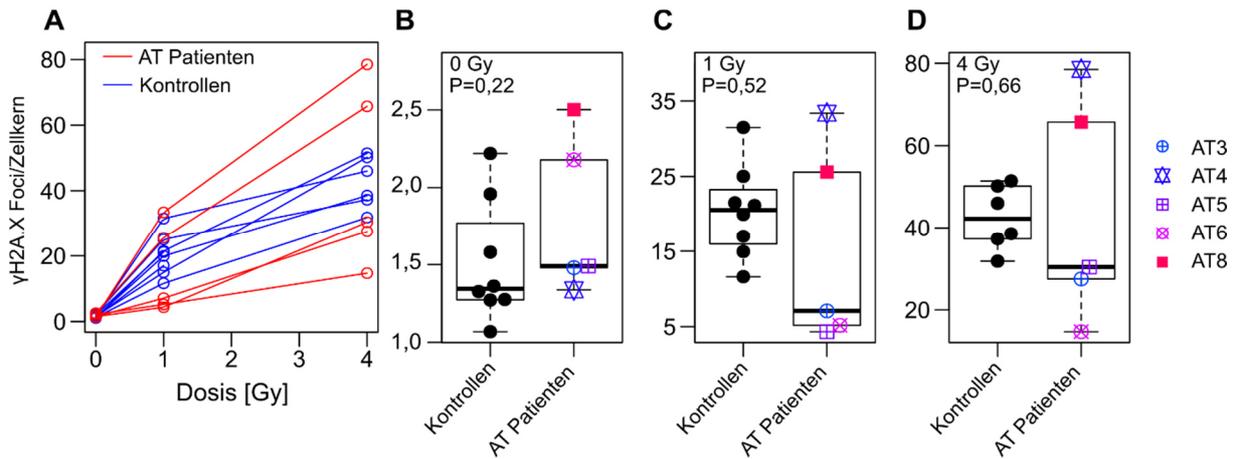
**Abbildung 6. Lokalisation von  $\gamma$ H2A.X in AT Patienten und in Kontrollen.** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von  $\gamma$ H2A.X Foci (rot) in Zellkernen (blau) von bestrahlten Lymphozyten (0, 1 und 4 Gy) von AT Patienten (AT3/AT4) und einer Kontrolle (K11). Nach Bestrahlung wurde die Bildung von  $\gamma$ H2A.X Foci mit A) einer dosisabhängigen Zunahme und B) einer zeitabhängigen Abnahme in der Anzahl der Foci in AT Zellen und Kontrollen beobachtet. Bei AT Patienten wurden individuelle Unterschiede festgestellt. Während bei AT4 eine A) klare Foci-Induktion und B) geringe Anzahl residueller Foci festgestellt wurde, wurde bei AT3 eine A) niedrige Induktion und B) hohe Anzahl an residuellen Foci beobachtet. Die Zellen wurden nach Bestrahlung fixiert, auf Objektträger aufgebracht und  $\gamma$ H2A.X Foci mit Kaninchen anti-phospho-H2A.X (Ser139) (1:200) und AlexaFluor555-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper (1:1000) detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Fluoreszenzaufnahmen und Reparaturfoci-Analyse wurde mit einem Metafer Scanning System bestehend aus dem Epifluoreszenzmikroskop Zeiss AxioImager.Z2 und der Metafer4 Software durchgeführt. Die Maßstabsskala entspricht 5  $\mu$ m bei 40x Vergrößerung.

Währenddessen war die mittlere Anzahl der Foci in den restlichen AT Patienten (AT3, AT5 und AT6) geringer im Vergleich zu allen Kontrollen für 1Gy (Abbildung 7B, Wertebereich AT3/AT5/AT6: 4,3 – 7,1 Foci/Zellkern) und 4Gy (Abbildung 7C, Wertebereich AT3/AT5/AT6: 14,7 – 30,4 Foci/Zellkern). Abbildung 6 zeigt beispielhaft Lymphozyten mit  $\gamma$ H2A.X Signalen von einer Kontrolle und zwei gegensätzlichen AT Patienten 1 h nach *in vitro* Bestrahlung mit 1 Gy und 4 Gy.

#### **Reparaturkapazität von DNA Schäden ist individuell unterschiedlich in AT Patienten**

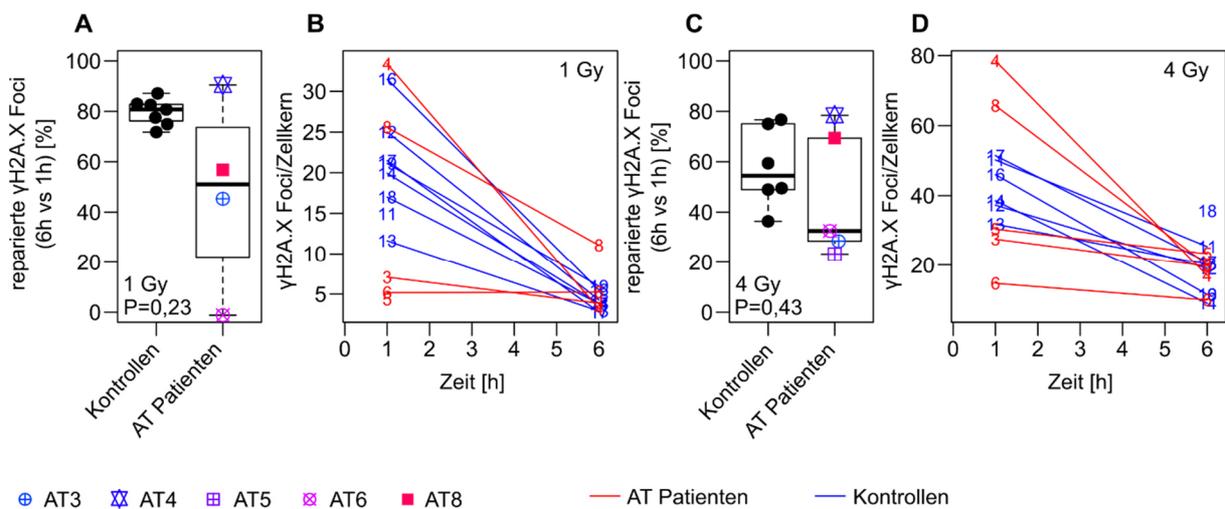
Anschließend wurde die zeitabhängige Abnahme der Foci Anzahl in Folge von ablaufenden DNA-Reparaturprozessen analysiert. Zur Evaluierung der Reparaturkapazität wurden die  $\gamma$ H2A.X Signale 6 h nach Bestrahlung quantifiziert und der prozentuale Anteil an reparierten Foci zwischen 1 h und 6 h nach Bestrahlung berechnet.

Im Vergleich zu den Kontrollen wurden in AT Patienten tendenziell weniger induzierte Foci nach einer Bestrahlung mit 1 Gy (Abbildung 8A; 51 % vs. 80,7 %;  $P=0,23$ ) und für 4 Gy (Abbildung 8C; 32,5 % vs. 54,5 %;  $P=0,43$ ) repariert. Jedoch wurden in der Gruppe der AT Patienten erneut individuelle Unterschiede für 1 Gy (Interquartilsabstand (IQA): 31,5 % vs. 6,5 %) und für 4 Gy (IQA: 41 % vs. 22 %) festgestellt. Der prozentuale Anteil reparierter Foci war vergleichbar mit den Kontrollen für 1 Gy für AT4 (Abbildung 8A; Wertebereich Kontrollen: 71,8 % - 87,1 %; AT4 90,4 %) und für 4 Gy für AT4 und AT8 (Abbildung 8B; Wertebereich Kontrollen: 36 % - 77 %; Wertebereich AT4/AT8 69 % - 78 %). Im Gegensatz dazu war die Reparaturkapazität für AT3, AT5 und AT6 geringer im Vergleich zu allen Kontrollen für 1 Gy (Abbildung 8A; Wertebereich AT3/AT5/AT6: 0 % - 45 %) und für 4 Gy (Abbildung 8C; Wertebereich AT3/AT5/AT6: 23,3 % - 32,5 %). Nichtsdestotrotz, zeigten die beiden Gruppen der AT Patienten bei Betrachtung der absoluten Foci Anzahl vergleichbare Werte zu den Kontrollen für 1 Gy (Abbildung 8B; Wertebereich Kontrollen: 2,8 – 6,0 Foci/Zellkern, Wertebereich AT4/AT8: 3,2 – 11,1 Foci/Zellkern; Wertebereich AT3/AT5/AT6: 3,9 – 5,2 Foci/Zellkern) und für 4 Gy (Abbildung 8D; Wertebereich Kontrollen: 9,0 – 35,6 Foci/Zellkern, Wertebereich AT4/AT8: 17,0 – 20,1 Foci/Zellkern; Wertebereich AT3/AT5/AT6: 9,9 – 23,3 Foci/Zellkern).



**Abbildung 7. Semi-automatische Analyse der Induktion von  $\gamma$ H2A.X Foci nach Bestrahlung.**

Die Anzahl von  $\gamma$ H2A.X Foci 1 h nach Bestrahlung (0, 1 und 4 Gy) wurde semi-automatische in Lymphozyten von AT Patienten und Kontrollen quantifiziert. **A)** In beiden Gruppen kommt es mit zunehmender Bestrahlungsdosis zu einer Zunahme der mittleren  $\gamma$ H2A.X Foci Anzahl pro Zelle. Dargestellt ist die mittlere Anzahl  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern bei den Probanden. **B)** Die mittlere Anzahl spontaner  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern ist in unbestrahlten AT Zellen tendenziell höher im Vergleich zu den Kontrollen. **C-D)** Nach Bestrahlung ist die Anzahl induzierter  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern in den AT Patienten geringer als in den Kontrollen. In Zellen von AT Patienten wurden starke individuelle Unterschiede beobachtet. Dargestellt ist die mittlere Anzahl an Signalen jedes einzelnen Probanden und der Median der Gruppe mit oberem und unterem Quartil und Whisker.



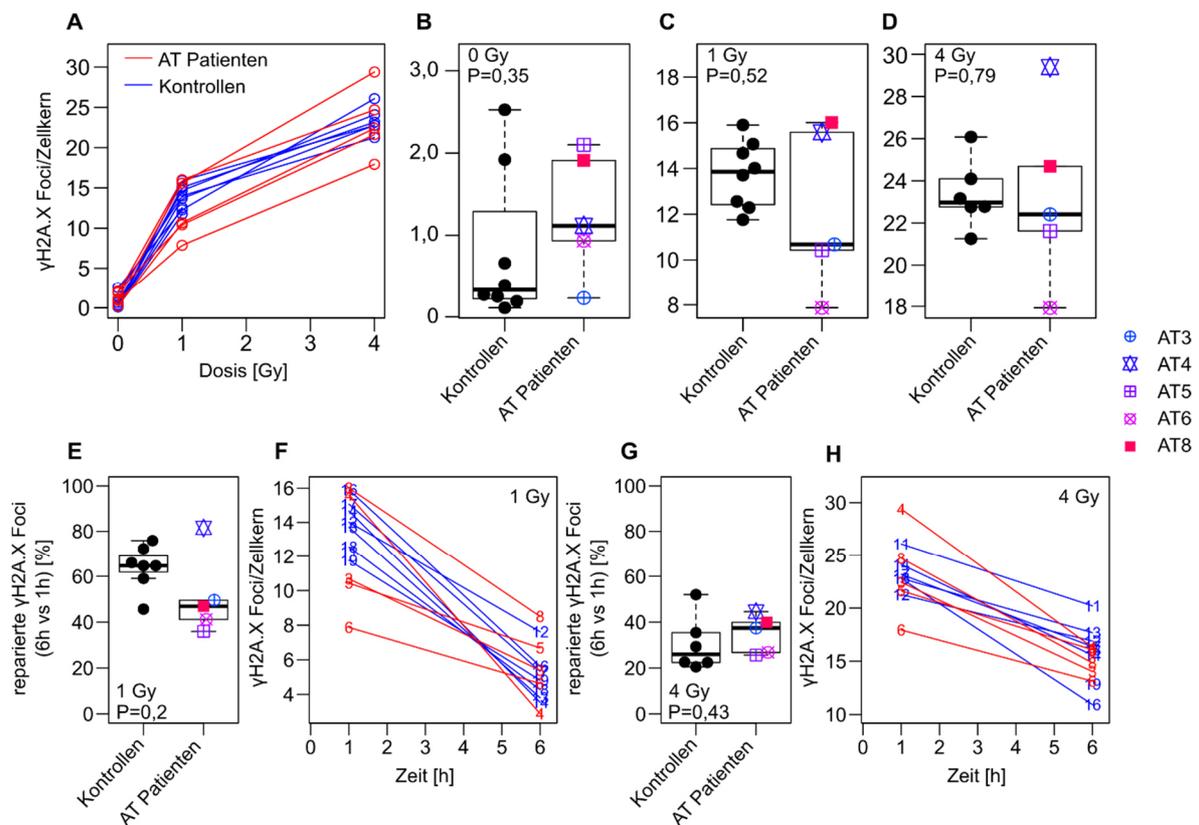
**Abbildung 8. Semi-automatische Analyse der Zeitkinetik von  $\gamma$ H2A.X Foci nach Bestrahlung.**

Die Anzahl von  $\gamma$ H2A.X Foci 6 h nach Bestrahlung (0, 1 und 4 Gy) wurde semi-automatisch in Lymphozyten von AT Patienten und Kontrollen quantifiziert und aus der Abnahme des Signals der Anteil reparierter Foci zwischen 1 h und 6 h ermittelt. **A, C)** Für AT Patienten wurde im Mittel ein geringerer Anteil an reparierten Foci im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet. Die Reparaturkapazität ist damit in AT Patienten geringer. In der Gruppe der AT Patienten wurden individuelle Unterschiede festgestellt. Dargestellt ist der Anteil reparierter  $\gamma$ H2A.X Foci jedes einzelnen Probanden und der Median der Gruppe mit oberem und unterem Quartil und Whisker. **B, D)** Mit längerer Kulturdauer kommt es zu einer Abnahme der induzierten  $\gamma$ H2A.X Foci in beiden Gruppen. Die absolute Anzahl an residualen  $\gamma$ H2A.X Foci nach 6 h befindet sich in einem ähnlichen Wertebereich für AT Patienten und Kontrollen. Dargestellt ist die mittlere Anzahl  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern bei den Probanden (mit ID).

## Manuelle Auswertung von $\gamma$ H2A.X Foci bestätigt Ergebnisse der semi-automatischen Auswertung

Zur Verifikation der semi-automatischen Foci Analyse wurde die Anzahl der  $\gamma$ H2A.X Foci manuell mit dem Auge in 100 Zellen pro Objektträger ausgezählt. Dabei bestätigte die Foci Auszählung per Auge die Beobachtungen der semi-automatischen Auswertung.

Erstens zeigte die manuelle Auszählung einen dosisabhängigen Zunahme (Abbildung 9A) und zeitabhängige Abnahme (Abbildung 9F, 9H) in der Anzahl  $\gamma$ H2A.X Foci. Im Vergleich mit der semi-automatische Analyse, wurde in der manuellen Auszählung jedoch insgesamt eine geringere, absolute Anzahl an  $\gamma$ H2A.X Foci gezählt.



**Abbildung 9.** Manuelle Analyse der Induktion und Zeitkinetik von  $\gamma$ H2A.X Foci nach Bestrahlung.

Die Anzahl von  $\gamma$ H2A.X Foci wurde (A-D) 1 h und (E-H) 6 h nach Bestrahlung (0, 1 und 4 Gy) per Auge in Lymphozyten von AT Patienten und Kontrollen quantifiziert und der Anteil reparierter Foci ermittelt. **A)** In beiden Gruppen kommt es mit zunehmender Bestrahlungsdosis zu einer Zunahme der mittleren  $\gamma$ H2A.X Foci Anzahl pro Zelle. Dargestellt ist die mittlere Anzahl  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern bei den Probanden. **B)** Die mittlere Anzahl spontaner  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern ist in unbestrahlten AT Zellen tendenziell höher im Vergleich zu den Kontrollen. **C-D)** Nach Bestrahlung ist die Anzahl induzierter  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern in den AT Patienten geringer als in den Kontrollen. In Zellen von AT Patienten wurden starke individuelle Unterschiede beobachtet. Dargestellt ist die mittlere Anzahl an Signalen jedes einzelnen Probanden und der Median der Gruppe mit oberem und unterem Quartil und Whisker. **E, G)** Für AT Patienten wurde im Mittel für 1 Gy ein geringerer und für 4 Gy ein höherer Anteil an reparierten Foci im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet. Die Reparaturkapazität ist damit in AT Patienten für 1 Gy geringer. In der Gruppe der AT Patienten wurden individuelle Unterschiede nach Bestrahlung mit 1 Gy festgestellt. Dargestellt ist der Anteil reparierter  $\gamma$ H2A.X Foci jedes einzelnen Probanden und der Median der Gruppe mit oberem und unterem Quartil und Whisker. **F, H)** Mit längerer Kulturdauer kommt es zu einer Abnahme der induzierten  $\gamma$ H2A.X Foci in beiden Gruppen. Die absolute Anzahl an residualen  $\gamma$ H2A.X Foci nach 6 h befindet sich auf einem ähnlichen Niveau für AT Patienten und Kontrollen. Dargestellt ist die mittlere Anzahl  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern bei den Probanden (mit ID).

Zweitens wurde in AT Patienten im Mittel eine tendenziell höhere Anzahl spontaner  $\gamma$ H2A.X Foci in Schein-bestrahlten Lymphozyten als in Kontrollen beobachtet (Abbildung 9B; 1,1 vs. 0,33 Foci/Zellkern;  $P=0,3$ ). Im Gegensatz zur semi-automatischen Auswertung war die Anzahl von spontanen  $\gamma$ H2A.X Foci geringer. Drittens wurde bei AT Patienten eine geringere Anzahl induzierter Foci für 1 Gy (Abbildung 9C; 10,7 vs. 13,9 Foci/Zellkern;  $P=0,52$ ) und für 4 Gy (Abbildung 9D; 22,4 vs. 23 Foci/Zellkern) festgestellt und eine gleiche Gruppierung der AT Patienten (AT4/AT8 vs. AT3/AT5/AT6) aufgrund von individuellen Unterschieden beobachtet. Viertens wurde bei AT Patienten im Mittel eine geringere Reparaturkapazität für 1 Gy ermittelt (Abbildung 9E, 9F; 46,9 % vs. 64,7 %;  $P=0,2$ ). Diese Beobachtung konnte jedoch nicht für 4 Gy bestätigt werden, wo eine höhere Reparaturkapazität in AT Patienten ermittelt wurde (Abbildung 9G, 9H 37,4 % vs. 25,9 %). In Übereinstimmung mit der semi-automatischen Analyse zeigten AT3, AT5 und AT6 eine geringe Reparaturkapazität für 1 Gy (Abbildung 9E), die Gruppierung der AT Patienten konnte jedoch nicht für 4 Gy beobachtet werden (Abbildung 9G).

Zusätzlich wurde bei der manuellen Betrachtung und Bewertung der Bilddateien in allen Proben Zellen mit einem stark fluoreszierenden und pan-nukleären  $\gamma$ H2A.X Signal festgestellt. Dabei wurde eine Zunahme in der Anzahl der Zellen mit pan-nukleärem Signal zwischen 1 h und 6 h Kulturdauer für AT Patienten und Kontrollen beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen Anzahl der Zellen und Phänotyp oder Bestrahlungsdosis wurde nicht festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ergab die Immunfluoreszenzanalyse von  $\gamma$ H2A.X für drei von fünf AT Patienten eine niedrigere Induktion und geringere Reparaturkapazität nach *in vitro* Bestrahlung im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Währenddessen zwei der fünf AT Patienten in der DNA Schadenssignalisierung und Reparatur ähnlich wie die Kontrollen reagierten.

#### **Bildung von pATM Foci ist in AT Patienten reduziert**

Die zugrundeliegenden Mutationen im *ATM*-Gen haben Einfluss auf das Genprodukt. Der Schwerpunkt der mikroskopischen Untersuchungen zur Validierung eines Biomarkers lag auf der Evaluierung von strahlen-induzierten DSB und deren Signalisierung mit  $\gamma$ H2A.X Foci. Aufgrund von Limitierung im Material wurde daher nur in drei AT Patienten, aber in allen Kontrollen phosphoryliertes ATM (pATM) visualisiert (Abbildung Anhang 1). In Schein-bestrahlten Lymphozyten wurden in der Mehrheit der Zellkerne von AT Patienten und Kontrollen keine pATM Signale detektiert. Nach Bestrahlung konnte in den drei AT Patienten ebenfalls keine Bildung von diskreten pATM Foci festgestellt. Im Vergleich wurde in den Kontrollen 1 h nach Bestrahlung deutliche, punktförmige pATM Signale beobachtet. Dabei wurden eine dosisabhängige Zunahme und eine zeitabhängige Abnahme in der Anzahl der pATM Foci detektiert (Abbildung Anhang 2).

### 4.1.3 Nachweis genetisch-bedingter Strahlenempfindlichkeit mittels mFISH Analyse

Nicht alle strahlenempfindlichen Individuen konnten mittels der angewendeten  $\gamma$ H2A.X Analyse identifiziert werden. Daher wurden chromosomale Aberrationen als möglicher Endpunkt der DNA Schadensantwort evaluiert (Abbildung 10A). Chromosomenschäden stellen dabei das Ergebnis der DNA-Reparatur dar, repräsentieren fehlerhaft reparierte Verknüpfung von DSB und geben einen Hinweis auf die Qualität der durchgeführten Reparatur.

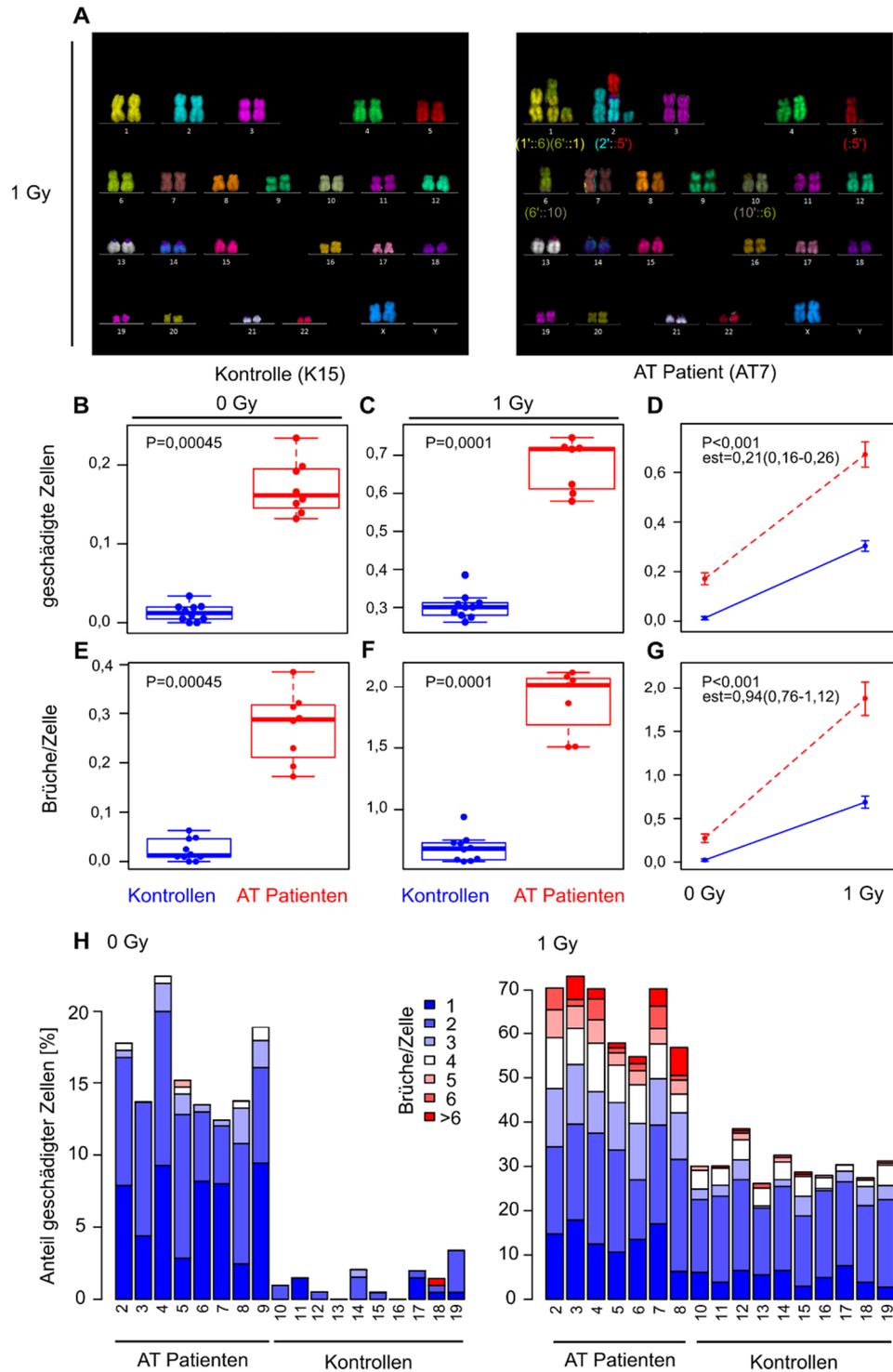
Das Vollblut der Probanden wurde *in vitro* an einer Cäsium-137 Quelle bestrahlt (1 Gy), die ruhenden G0-Lymphozyten stimuliert und in der nachfolgenden Metaphase durch Zugabe von Colcemid festgehalten, um nach 48 h Kulturdauer die Chromosomen zu präparieren (Kapitel 3.2.3, 3.2.4). Mittels multiplex Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (mFISH) sollten Chromosomenschäden in 200 Metaphasen pro Proband und Bestrahlungsdosis analysiert werden (Kapitel 3.2.5). Bei den AT Patienten konnten insgesamt 1698 Metaphasen für 0 Gy und nur 951 Metaphasen (statt der geplanten 1600 Metaphasen) für 1 Gy analysiert werden. Präparate mit weniger als 50 auswertbaren Metaphasen (AT9 nach 1 Gy) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu wurden für die Kontrollen rund 2000 Metaphasen pro Bestrahlungsdosis evaluiert. Die Ergebnisse der mFISH Analyse sind für jeden Probanden in Tabelle 3 dargestellt.

#### Zellen von AT Patienten sind häufiger und stärker geschädigt

Bei allen untersuchten AT Patienten waren im Mittel bereits in 17,1 % der unbestrahlten Lymphozyten Schäden nachweisbar, während in Kontrollen 1,3 % der Zellen geschädigt waren (Abbildung 10B). Nach *in vitro* Bestrahlung wurde bei AT Patienten ein Anstieg der geschädigten Zellen auf 67,2 % und bei den Kontrollen auf 30,3 % beobachtet (Abbildung 10C). Zusätzlich wurde die Anzahl der gesamten Chromosomenbrüche auf die Gesamtheit der analysierten Zellen ermittelt (Brüche pro Zelle). Bei Probanden mit AT war die Anzahl der Brüche pro Zelle ungefähr 13-mal höher vor Bestrahlung (Abbildung 10E; 0,273 vs. 0,023 Brüche/Zelle;  $P=0,00045$ ) und ungefähr 2,7-mal höher nach Bestrahlung (Abbildung 10F; 1,88 vs. 0,681 Brüche/Zelle;  $P=0,0001$ ) im Vergleich zu den Kontrollen. Die Verteilung der Brüche pro Zelle gibt einen Hinweis darauf, wie stark die Zellen geschädigt sind (Abbildung 10H). Dazu wurde für jeden Probanden die tatsächliche Anzahl der Brüche in den geschädigten Zellen korreliert. Im Gegensatz zu den Kontrollen, zeigten unbestrahlte Proben von AT Patienten eine höhere Anzahl an geschädigten Zellen mit einem (6,56 % vs. 0,39 %) oder  $\geq 2$  Brüchen (9,38 % vs. 0,84 %). Nach Bestrahlung ist die Anzahl der geschädigten Zellen mit  $\geq 3$  Brüchen in AT Patienten deutlich erhöht gegenüber den Kontrollen (30,9 % vs. 7,04 %) (Abbildung 10H).

**Tabelle 3. Übersicht von Chromosomenschäden bei genetisch-bedingter Strahlenempfindlichkeit.**  
 Chromosomenschäden wurden mittels mFISH Analyse von unbestrahlten und *in vitro* bestrahlten (1 Gy) Präparaten der einzelnen AT Patienten und Kontrollen ermittelt und quantifiziert. Der Mittelwert mit Standardabweichung wurde für beide Gruppen bestimmt und der Unterschied zwischen AT Patienten und Kontrollen statistisch ausgewertet.

Dosis	analysierte Zellen		geschädigte Zellen [%]		Brüche pro Zelle		Chr.aberrationen ohne Austausch pro Zelle		Translokationen pro Zelle		Chr.austausche komplexe pro Zelle		dizentrische Chr. pro Zelle		Chromatidschäden pro Zelle		
	0Gy	1Gy	0Gy	1Gy	0Gy	1Gy	0Gy	1Gy	0Gy	1Gy	0Gy	1Gy	0Gy	1Gy	0Gy	1Gy	
AT Patienten																	
A72	203	61	19.1	72.1	0.29	2.02	0.094	0.426	0.094	0.295	0	0.131	0.005	0.328	0.02	0.115	
A73	205	134	15.1	74.6	0.23	2.12	0.063	0.448	0.078	0.425	0	0.142	0.005	0.254	0.015	0.075	
A74	205	128	23.4	71.9	0.39	2.09	0.098	0.375	0.102	0.438	0.02	0.078	0.015	0.258	0.01	0.094	
A75	211	178	16.6	62.4	0.31	1.51	0.052	0.287	0.114	0.303	0.005	0.067	0.009	0.230	0.014	0.062	
A76	208	126	13.9	57.9	0.19	1.51	0.082	0.294	0.043	0.262	0.005	0.087	0.005	0.222	0.005	0.04	
A77	250	229	13.2	71.6	0.17	2.06	0.092	0.507	0.040	0.306	0	0.122	0	0.310	0.008	0.026	
A78	204	95	15.7	60.0	0.28	1.86	0.039	0.189	0.054	0.347	0.015	0.137	0.054	0.284	0.02	0.032	
A79	212	--	19.8	--	0.32	--	0.104	--	0.066	--	0.019	--	0.019	--	0.019	--	
Mittelwert			<b>17.1</b>	<b>67.2</b>	<b>0.27</b>	<b>1.88</b>	<b>0.078</b>	<b>0.361</b>	<b>0.074</b>	<b>0.339</b>	<b>0.008</b>	<b>0.109</b>	<b>0.014</b>	<b>0.269</b>	<b>0.014</b>	<b>0.063</b>	
±SD			3.4	6.85	0.07	0.27	0.024	0.110	0.028	0.068	0.009	0.031	0.017	0.040	0.006	0.033	
Kontrollen																	
K70	206	213	0.5	30.0	0.01	0.68	0	0.094	0.005	0.113	0	0.028	0	0.15	0	0	
K11	204	206	1.5	30.1	0.01	0.69	0.015	0.053	0	0.131	0	0.019	0	0.16	0	0	
K12	200	200	0.5	38.5	0.01	0.94	0	0.1	0.005	0.19	0	0.05	0	0.175	0	0	
K13	204	199	0	26.1	0	0.59	0	0.065	0	0.141	0	0.01	0	0.101	0	0	
K14	195	200	2.1	32.5	0.05	0.73	0	0.08	0.015	0.155	0.005	0.02	0	0.145	0	0	
K15	210	202	1.0	28.7	0.01	0.72	0	0.05	0.005	0.163	0	0.035	0	0.134	0.005	0	
K16	207	204	0	27.9	0	0.58	0	0.059	0	0.132	0	0.015	0	0.103	0	0.005	
K17	202	211	2.0	30.8	0.02	0.58	0.015	0.104	0.005	0.118	0	0.009	0	0.109	0.005	0.005	
K18	208	208	1.9	27.4	0.05	0.60	0.005	0.087	0.005	0.144	0.005	0.024	0	0.087	0.005	0	
K19	207	218	3.4	31.2	0.06	0.75	0.005	0.046	0.024	0.124	0	0.05	0.005	0.183	0	0.005	
Mittelwert			<b>1.3</b>	<b>30.3</b>	<b>0.02</b>	<b>0.69</b>	<b>0.004</b>	<b>0.074</b>	<b>0.006</b>	<b>0.141</b>	<b>0.001</b>	<b>0.026</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.135</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	
±SD			1.1	3.45	0.02	0.11	0.006	0.022	0.008	0.023	0.002	0.015	0.0015	0.034	0.002	0.002	
AT Patienten vs. Kontrollen P-Wert			<b>0.00045</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.00045</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.00035</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.00044</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.069</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0013</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.00049</b>	



**Abbildung 10.** mFISH Analyse geschädigter Zellen und Brüche pro Zelle von AT Patienten.

**A)** Repräsentative mFISH Färbung und Karyogramm einer Zelle einer Kontrolle (K15) und eines AT Patienten (AT7). **B-C, E-F)** Bei AT Patienten ist die Anzahl geschädigter Zellen und Brüche pro Zelle signifikant höher als bei den Kontrollen. Dargestellt sind die Anzahl der einzelnen Probanden und der Median mit unterem und oberem Quartil und dem Whisker. **D, G)** Durch Bestrahlung steigt die Anzahl der geschädigten Zellen und Brüche pro Zelle in beiden Gruppen an. Der strahlen-induzierte Anstieg war bei AT Patienten signifikant stärker. Dargestellt ist die mittlere Anzahl geschädigter Zellen und der ermittelte Effekt einer Bestrahlung mit P-Wert und geschätzte Regression mit 95 %igem Konfidenzintervall. **H)** Im Vergleich zu den Kontrollen, wurden in AT Patienten mehr Zellen mit  $\geq 2$  Brüchen beobachtet. Nach Bestrahlung ist die Anzahl der geschädigten Zellen mit  $\geq 3$  Brüchen in AT Patienten deutlich erhöht gegenüber den Kontrollen. Dargestellt ist die Verteilung der geschädigten Zellen mit der Anzahl der Brüche pro geschädigte Zelle in einzelnen Individuen (mit ID).

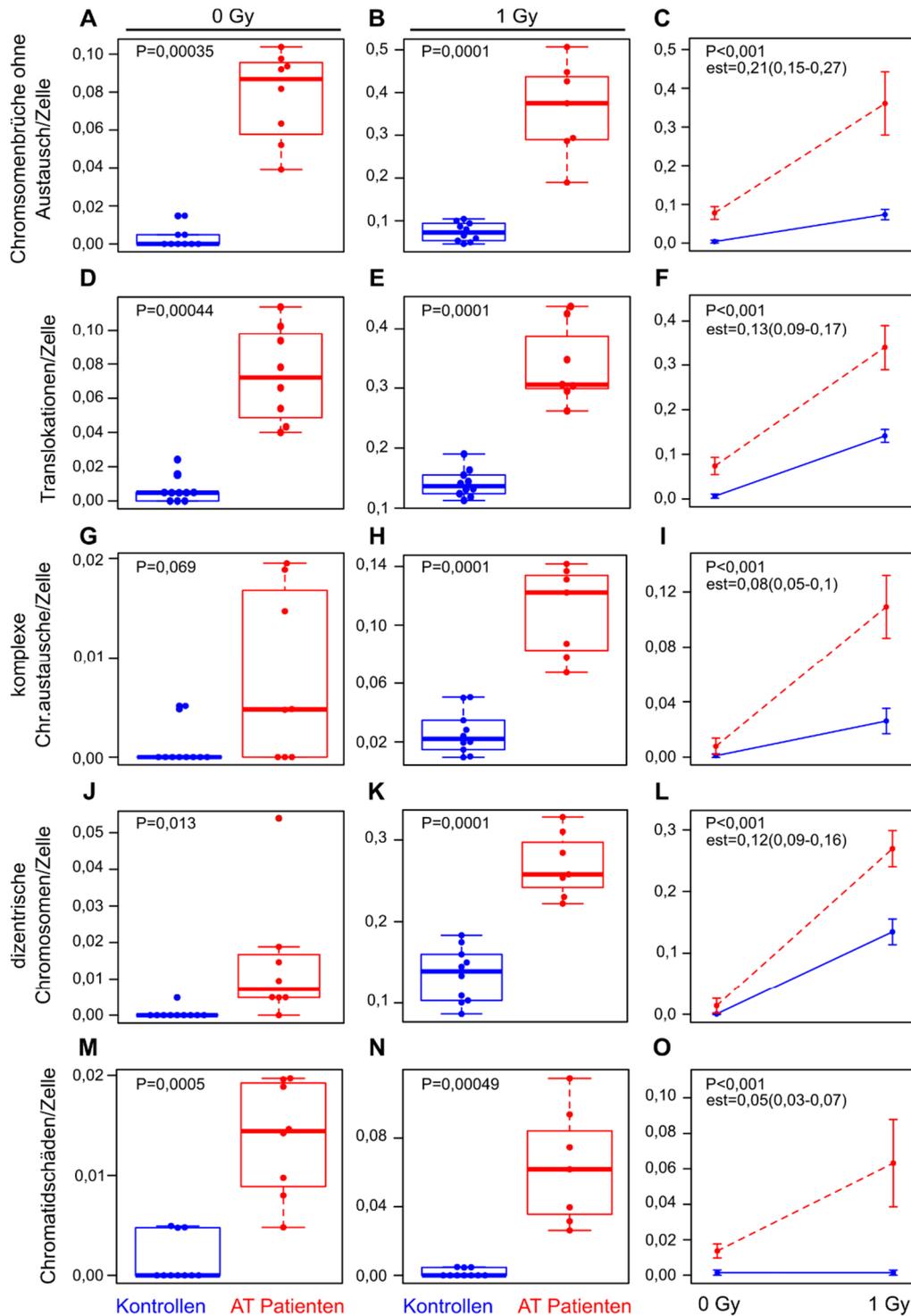
### **Häufigkeit der Chromosomenschäden der untersuchten Aberrationsklassen ist in AT Patienten erhöht**

Aufgrund der Färbung einzelner Chromosomenpaare ermöglicht die mFISH Analyse eine Kategorisierung von Chromosomenschäden in Aberrationsklassen und die Zuordnung der Schäden zu einzelnen Chromosomen (Abbildung 11). In der Auswertung von einzelnen Aberrationsklassen wurde festgestellt, dass Chromosomenbrüche ohne Austausch (0,078 Aberrationen/Zelle) und Translokationen (0,074 Aberrationen/Zelle) vor Bestrahlung und nach Bestrahlung (0,361 bzw. 0,339 Aberrationen/Zelle) die häufigsten Aberrationen bei AT Patienten waren.

Hingegen wiesen Zellen von Kontrollen Chromosomenbrüche ohne Austausch (0,004 Aberrationen/Zelle) und Translokationen (0,006 Aberrationen/Zelle) vor der Bestrahlung und Translokationen (0,141 Aberrationen/Zelle) und dizentrische Chromosomen (0,135 Aberrationen/Zelle) nach der Bestrahlung am häufigsten auf. Komplexe Aberrationen wurden in den AT Patienten (0 Gy: 0,008; 1 Gy: 0,109 Aberrationen/Zelle) und Kontrollen (0 Gy: 0,001; 1 Gy: 0,26 Aberrationen/Zelle) am wenigsten beobachtet. Die Anzahl der Chromosomenbrüche ohne Austausch und Translokationen war in AT Patienten signifikant höher bei 0 Gy (Abbildung 11A, 11D;  $P=0,00035$  und  $P=0,00044$ ) und bei 1 Gy (Abbildung 11B, 11E; jeweils  $P=0,0001$ ) im Vergleich zu den Kontrollen. In unbestrahlten Zellen wurde bei AT Patienten eine signifikant höhere Anzahl dizentrischer Chromosomen (Abbildung 11J;  $P=0,0013$ ) und höhere Anzahl komplexer Aberration (Abbildung 11G;  $P=0,069$ ) als bei den Kontrollen ermittelt. Nach Bestrahlung waren beide Aberrationsarten signifikant erhöht in AT Patienten (Abbildung 11H, 11K; jeweils  $P=0,0001$ ).

Das deutlich höhere Basalniveau spontaner Chromosomenschäden bei AT Patienten könnte ursächlich für die Unterschiede zwischen AT Patienten und Kontrollen nach Bestrahlung sein. Daher wurde der Interaktionseffekt der Bestrahlungsdosis und Probandengruppe genauer untersucht. AT Patienten zeigten nach Bestrahlung ein signifikant größeren Unterschied zwischen 1 Gy und 0 Gy bei geschädigten Zellen, Brüchen pro Zelle (Abbildung 10D, 10G) und allen identifizierten Aberrationsarten (Abbildung 11C, 11F, 11I, 11L) im Vergleich zu den Kontrollen (jeweils  $P<0,001$ ).

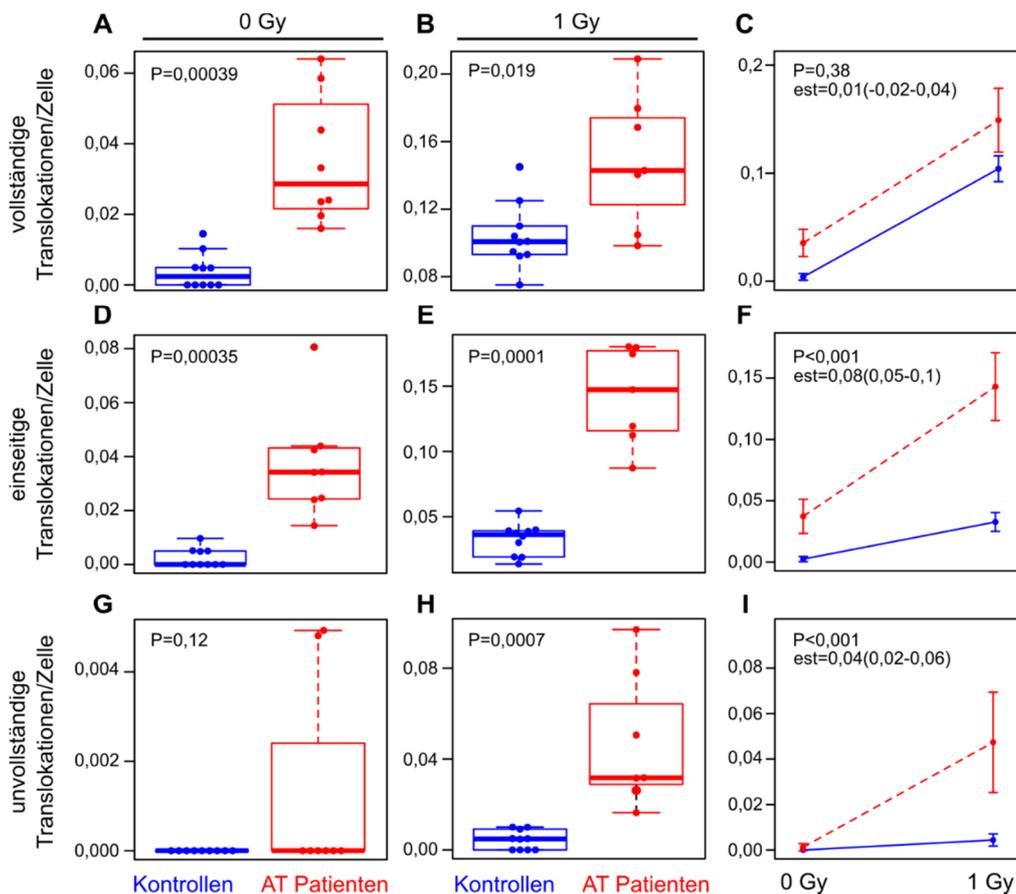
Die Aberrationsgruppe der einfachen Translokationen kann anhand des Grades ihrer Vollständigkeit in „vollständige“, „unvollständige“ oder „einseitige“ Translokation genauer unterschieden werden. Bei der genaueren Betrachtung der verschiedenen Translokationsarten wurde festgestellt, dass AT Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen einen signifikant höheren Anteil an vollständigen Translokationen bei 0 Gy (Abbildung 12A; 0,035 vs. 0,0039 Aberrationen/Zelle;  $P=0,00039$ ) und 1 Gy (Abbildung 12B; 0,15 vs. 0,1 Aberrationen/Zelle;  $P=0,019$ ) zeigen.



**Abbildung 11.** mFISH Analyse verschiedener Aberrationsarten von AT Patienten.

Die Anzahl von (A, B) Chromosomenbrüchen ohne Austausch, (D, E) Translokationen, (G, H) komplexen Aberrationen, (J, K) dizentrischen Chromosomen und (M, N) Chromatidschäden wurde vor und nach Bestrahlung bestimmt. Unabhängig von der Bestrahlung zeigten AT Patienten eine höhere Anzahl an Aberrationen pro Zelle im Vergleich zu den Kontrollen. Dargestellt sind die Anzahl der einzelnen Probanden und der Median mit unterem und oberem Quartil und dem Whisker. C, F, I, L) Zusätzlich wurde ein Anstieg in der Anzahl der Aberrationen durch ionisierende Strahlung in beiden Gruppen beobachtet, wobei der Anstieg in AT Zellen signifikant stärker war. O) für Chromatidschäden konnte nur in AT Zellen ein Anstieg der Schäden pro Zelle nach Bestrahlung beobachtet werden. Dargestellt ist die mittlere Anzahl der Aberrationen pro Zelle und der ermittelte Effekt einer Bestrahlung mit P-Wert und geschätzte Regression mit 95 %igem Konfidenzintervall.

Allerdings führte die Bestrahlung in beiden Gruppen zu einem parallel verschobenen Anstieg der Aberrationen, der nicht signifikant unterschiedlich zwischen beiden Gruppen war (Abbildung 12C;  $P=0,38$ ). Einseitige Translokationen waren hingegen in der Gruppe der AT Patienten vor Bestrahlung (Abbildung 12D; 0,037 vs. 0,0025 Aberrationen/Zelle;  $P=0,00035$ ) und nach Bestrahlung (Abbildung 12E; 0,14 vs. 0,033 Aberrationen/Zelle;  $P=0,0001$ ) signifikant erhöht und zeigte bei AT Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere Zunahme der Aberrationen nach Bestrahlung auf (Abbildung 12F;  $P<0,001$ ). Unvollständige Translokationen wurden weniger häufig beobachtet als vollständige und einseitige Translokationen (Abbildung 12G, 12H). Dennoch wurde nach der Bestrahlung in AT Patienten ein signifikant höherer Anstieg für unvollständige Translokationen nachgewiesen, als in der Kontrollgruppe (Abbildung 12I;  $P<0,001$ ).



**Abbildung 12.** mFISH Analyse verschiedener Translokationsarten von AT Patienten.

In AT Zellen wurde vor und nach Bestrahlung eine signifikant höhere Anzahl von (A, B) vollständigen Translokationen, (D, E) einseitigen Translokationen, (G, H) und unvollständigen Translokationen festgestellt. Dargestellt sind die Anzahl der einzelnen Probanden und der Median mit unterem und oberem Quartil und dem Whisker. C) Während vollständige Translokationen bei AT Patienten und Kontrollen nach einer Bestrahlung im gleichen Maße zunehmen, wurde für (F) einseitige und (G) unvollständige Translokationen ein signifikant stärkerer Anstieg beobachtet. Dargestellt ist die mittlere Anzahl Aberrationen pro Zelle und der ermittelte Effekt einer Bestrahlung mit P-Wert und geschätzte Regression mit 95 %igem Konfidenzintervall.

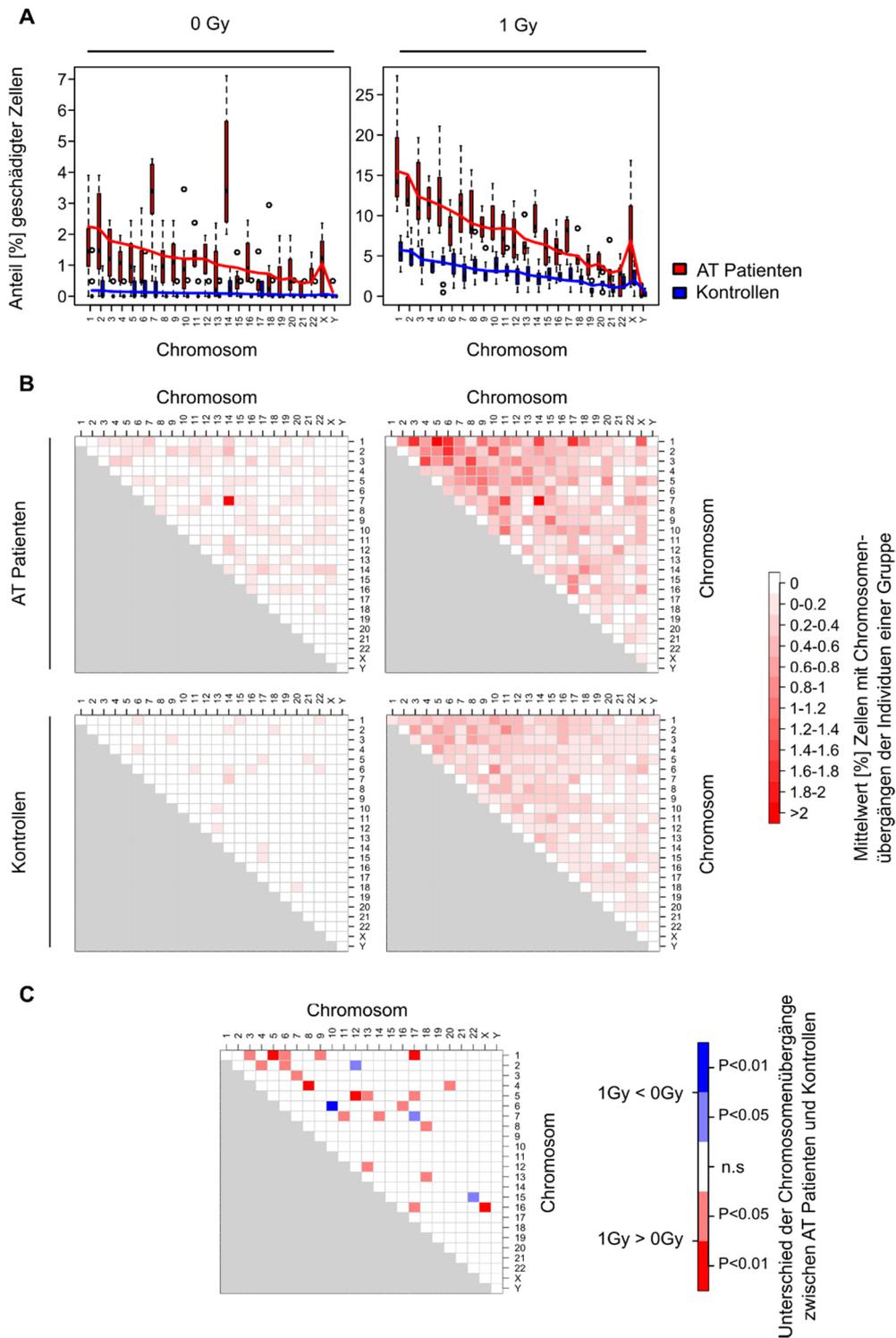
**Anteil von Chromatidschäden ist in AT Patienten erhöht**

Neben Schäden in kompletten Chromosomen wurden mit der mFISH Analyse ebenfalls Schäden in den Chromatiden untersucht. Vor Bestrahlung wurden in AT Zellen signifikant mehr Chromatidschäden beobachtet als in den Kontrollen (Abbildung 11M; 0,014 vs. 0,0015 Aberrationen/Zelle;  $P=0,0005$ ). Während die Anzahl der Chromatidschäden durch eine Bestrahlung anstieg, blieb die Anzahl in den Kontrollen annähernd gleich (Abbildung 11N; 0,063 vs. 0,0014 Aberrationen/Zelle;  $P=0,00049$ ). Demzufolge wurde ein signifikant stärkerer, strahlen-induzierter Anstieg von Chromatidschäden in AT Zellen ermittelt (Abbildung 11O;  $P<0,001$ ).

**Einzelne Chromosomen sind in AT Patienten häufiger von Brüchen betroffen**

Die mFISH Analyse ermöglicht die Untersuchung von Schäden in jedem einzelnen Chromosom und die genaue Zuordnung von Farbübergängen. Um festzustellen ob einzelne Chromosomen häufiger von Brüchen betroffen sind als andere, wurde die Anzahl der geschädigten Chromosomen bestimmt. Wie erwartet, waren Chromosomen von AT Patienten häufiger von Brüchen betroffen, als die Chromosomen der Kontrollen. Die Anzahl der Brüche pro Chromosom nahm mit abnehmender Größe und geringerem DNA Gehalt in beiden Gruppen ab. Besonders auffällig waren dabei die Chromosomen 7 und 14, die in unbestrahlten Proben der AT Patienten deutlich häufiger Brüche aufwiesen als aufgrund der Chromosomengröße zu erwarten ist. Nach einer Bestrahlung blieb diese Beobachtung für Chromosom 14 weiterhin bestehen (Abbildung 13A).

Um weitere Einblicke in die Beteiligung von verschiedenen Chromosomen in die Zusammenlagerung von geschädigten Chromosomen zu erhalten, wurde die Anzahl und Lokalisation von Chromosomenübergängen bestimmt (Abbildung 13B). Bereits ohne Bestrahlung waren in AT Patienten 10-mal mehr Chromosomenübergänge vorhanden als in der Kontrollgruppe (29 vs. 3 Chromosomenübergänge). In 7 von 8 AT Patienten und 2,66 % der AT Zellen wurden Chromosomenübergänge zwischen den Chromosom 7 zu 14 beobachtet. Eine Translokation zwischen den beiden Chromosomen 14 wurde in drei Patienten festgestellt. In Proband ID 9 zeigten knapp 9 % der Zellen diese Translokation. Nach der Bestrahlung nahm die Anzahl der Chromosomenübergänge in beiden Gruppen deutlich zu (145 vs. 109 Chromosomenübergänge) und generell waren größere Chromosomen häufiger betroffen. Die Zusammenlagerung von Chromosom 7 und 14 wurde nach einer Bestrahlung weiterhin beobachtet (Abbildung 13B).



**Abbildung 13.** Analyse der Schäden pro Chromosom und Chromosomenübergänge.

**A)** Die Anzahl der Brüche pro Chromosom nimmt mit der Größe und steigendem DNA Gehalt in beiden Gruppen zu. AT Patienten weisen generell mehr Schäden in den einzelnen Chromosomen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. In AT Patienten sind in unbestrahlten Proben die Chromosomen 7 und 14 und in bestrahlten Proben das Chromosom 14 besonders häufiger geschädigt, als aufgrund der Größe zu erwarten ist. **B)** Vor der Bestrahlung wurden in AT Patienten häufig Chromosomenübergänge nachgewiesen, in denen größere Chromosomen öfter involviert waren. Nach Bestrahlung nahm die Anzahl der Chromosomenübergänge zu. In AT Zellen wurde signifikant häufiger ein Chromosomenübergang zwischen den Chromosom 7 und 14 beobachtet. **C)** Durch ionisierende Strahlung weisen AT Patienten in 21 Fällen eine signifikant erhöhte und in vier Fällen eine signifikant niedrigere Anzahl von Chromosomenübergänge im Vergleich zu den Kontrollen auf.

Anschließend wurde der Unterschied der Chromosomenübergänge zwischen AT Patienten und Kontrollen analysiert. Nach einer Bestrahlung konnten 21 Chromosomenübergänge signifikant häufiger und vier Chromosomenübergänge signifikant weniger häufig in AT Patienten beobachtet werden im Vergleich zu den Kontrollen (jeweils  $P < 0,05$ ) (Abbildung 13C). Nach der multiplen Testkorrektur zur Anpassung der Falscherkennungsrate wurde nur noch für zwei Chromosomenübergänge (Chromosomen 4 und 8, 5 und 12) ein signifikanter Unterschied ermittelt ( $P < 0,05$ ).

Die Daten der mFISH Analyse zeigten eine erhöhte Rate an Chromosomenschäden in jedem untersuchten AT Patienten. AT Zellen waren zudem stärker geschädigt und es wurde eine erhöhte Anzahl der untersuchten Aberrationen beobachtet, wobei signifikant stärkere Zunahmen der Aberrationsraten in AT Zellen nach Bestrahlung nachgewiesen wurden. Zusätzlich waren in AT Patienten die Chromosomen 7 und 14 besonders häufig von Brüchen und Chromosomenübergängen betroffen.

#### 4.1.4 Proteinuntersuchungen in lymphoblastoiden Zelllinien von strahlenempfindlichen AT Patienten

Insbesondere in der Untersuchung von  $\gamma$ H2A.X Reparaturfoci wurden Unterschiede in der Reaktion auf Strahlung zwischen den einzelnen AT-Patienten beobachtet. Zur weiteren Charakterisierung der AT Patienten und zur Analyse von individuellen Merkmalen wurden daher immortalisierte Zelllinien generiert. In Zusammenarbeit mit der AG Gen Vektoren (Prof. Kempkes) vom Helmholtz Zentrum München wurden aus primären B-Lymphozyten von fünf AT Patienten (AT2, AT6, AT7, AT8, AT9) lymphoblastoide Zelllinien erzeugt (Tabelle 4).

**Tabelle 4.** Übersicht der lymphoblastoiden Zelllinien von AT Patienten.

Von fünf Patienten mit Ataxia teleangiectatica wurden, in Kooperation mit der AG Gen Vektoren (Prof. Kempkes) vom Helmholtz Zentrum München, Zelllinien generiert. Aufgeführt ist die Probanden ID, die ID der Zelllinie, die ATM Mutation im Probanden und die daraus folgende Proteinveränderung. Zusätzlich sind zwei kommerziell erworbene Zelllinien eines AT Patienten (GM03189) und dessen gesunden Bruders (GM03323) als Kontrollzelllinien aufgeführt.

ID	ID Zelllinie	Mutation	Proteinveränderung
AT2	CKR207b	klinische Diagnose	
AT6	CKR226b	HOM Exon 54 c.7788G>A	p.Glu2596=
AT7	CKR227b	HOM Exon 54 c.7788G>A	p.Glu2596=
AT8	CKR240b	HET Exon 27 c.4096-4097delTG/ Intron 38 c.5762+1 G>T	p.Cys1366_Asp1367delinsTer/unbekannt
AT9	CKR241b	HET Exon 27 c.4096-4097delTG/ Intron 38 c.5762+1 G>T	p.Cys1366_Asp1367delinsTer/unbekannt
	GM03189	HET Exon 58 c.8266A>T/ HET Exon 11 c.1141ins4BP	p.Lys2756Ter/ p.Ser381fs
	GM03323	-	

Die Immortalisierung erfolgte mit dem Epstein-Barr-Virus Stamm B95-8. In diesen Zellen wurden am Bundesamt für Strahlenschutz endogene Proteinlevel von ATM und assoziierten Signal- und Reparaturproteinen in einzelnen Experimenten nach einer *in vitro* Bestrahlung (1, 4, 6, 24 h) an einer Cäsium-137 Quelle (1, 4, 10 Gy) mit einer *Stain free Western blot* Analyse und spezifischen Antikörpern detektiert. Die Proteinbanden wurden quantifiziert, zum Gesamtproteinlevel normalisiert, mit den Kontrollen relativiert und die Veränderung der Proteinlevel mit steigender Dosis und zunehmender Zeit bestimmt. Als Kontrollen dienten zwei kommerziell erworbene, lymphoblastoide Zelllinien, die von einem sieben Jahre alten, männlichen AT Patienten (GM03189) und dessen gesunden, sechs Jahre alten Bruder (GM03323) stammen. In allen Untersuchungen wurden diese beiden Zelllinien als Kontrollen mitgeführt.

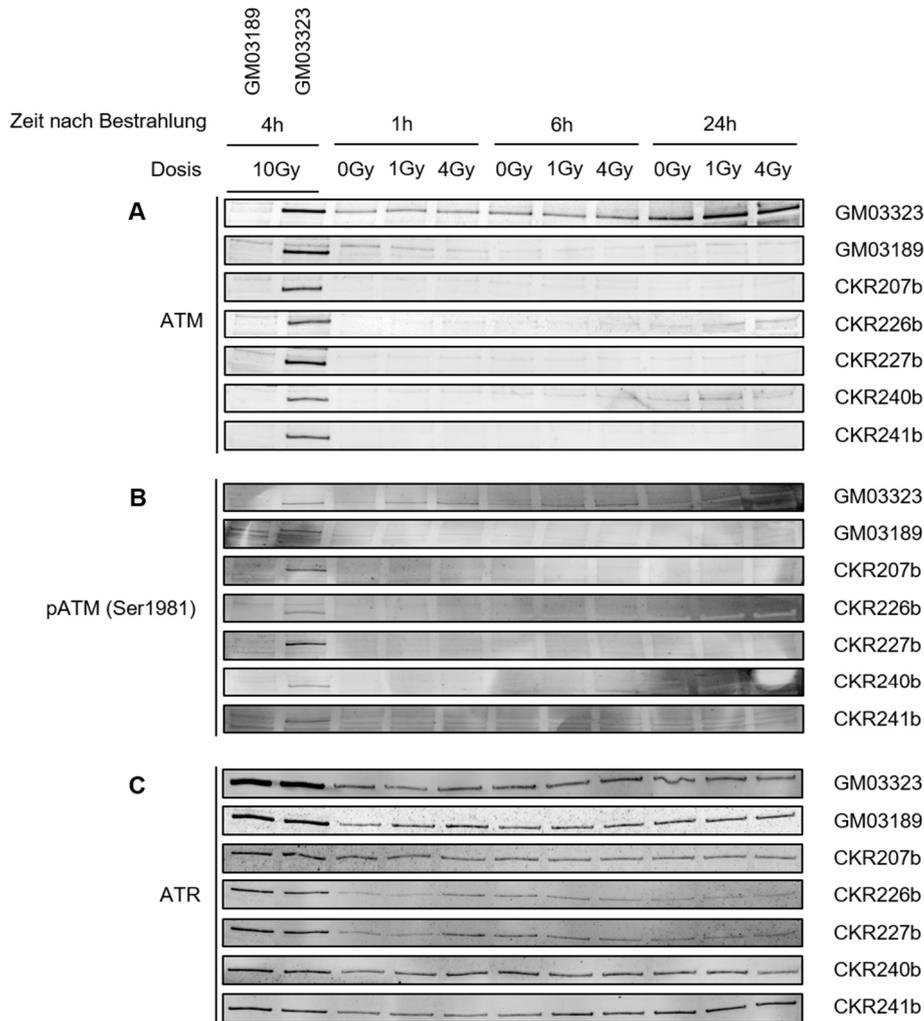
#### **Endogene Proteinlevel von ATM und pATM sind in AT Patienten nicht nachweisbar**

Zunächst wurden die endogenen Proteinlevel von ATM und pATM (Ser1981) analysiert, um mögliche individuelle Unterschiede in der Expression von ATM, basierend auf der zugrundeliegenden Mutation, zu identifizieren.

In der Zelllinie GM03189 und in allen fünf Zelllinien der AT Patienten wurde kein ATM und pATM Signal detektiert. Währenddessen wurde in der Kontrollzelllinie GM03323 in unbestrahlten und bestrahlten Zellen Proteinlevel von ATM nachgewiesen (Abbildung 14A). Für pATM wurde nach einer Bestrahlung mit 1 Gy und 4 Gy eine qualitative Zunahme des endogenen Proteinlevels im Vergleich zu den unbestrahlten Proben beobachtet, wobei bereits 1 h nach Bestrahlung das pATM Signal am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 14B). Als interne Kontrolle konnte auf jedem Blot, ATM oder pATM nach einer Bestrahlung (10 Gy, 4 h) in der Kontrollzelllinie GM03323 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in allen Zelllinien das endogene Proteinlevel der PI3-Kinase ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) untersucht, die die Funktion von ATM übernehmen kann. ATR wurde in allen Zelllinien der AT Patienten, in der Zelllinie GM03189 und in der Kontrollzelllinie GM03323 detektiert. Es wurden keine dosisabhängigen oder zeitabhängigen, qualitativen Veränderungen der Proteinlevel beobachtet (Abbildung 14C).

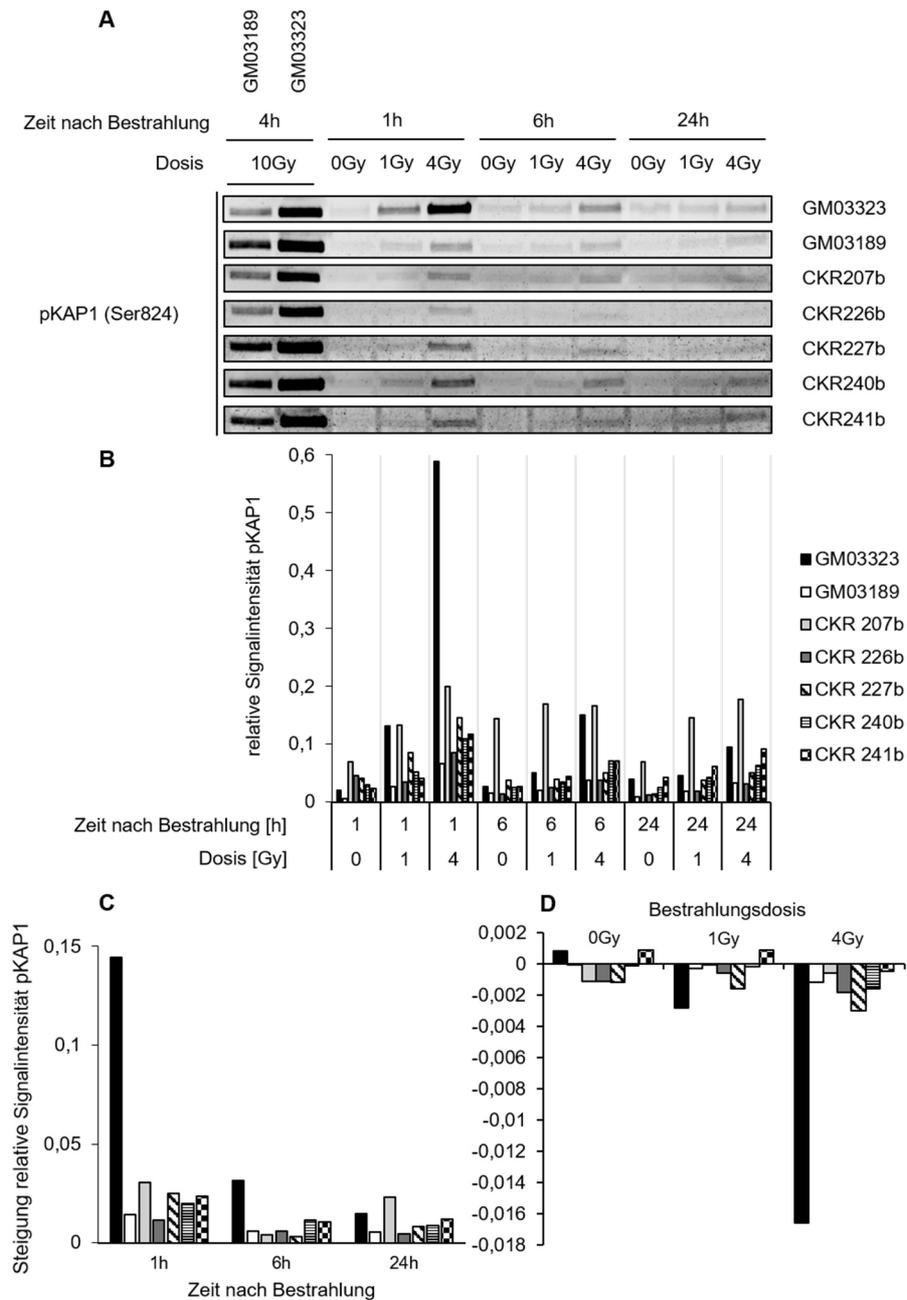
#### **Endogene Proteinlevel von pKAP1 sind in AT Patienten beeinflusst**

Da in allen AT Patienten keine Proteinlevel von ATM detektiert werden konnten, wurde in einem nächsten Schritt die Auswirkung des Proteinmangels auf die ATM-abhängige Phosphorylierung von KAP1 (Ser824) untersucht. In allen Zelllinien wurde beobachtet, dass die Proteinlevel von pKAP1 mit steigender Dosis zunehmen und mit andauernder Reparaturzeit wieder abnehmen. Das Maximum des pKAP1 Signals wurde 1 h nach der Bestrahlung erreicht. Allerdings wurde in den Zelllinien der AT Patienten ein schwächeres pKAP1 Signal im Vergleich zu der Kontrollzelllinie verzeichnet (Abbildung 15A).



**Abbildung 14.** Detektion von ATM, pATM und ATR in lymphoblastoiden Zelllinien von AT Patienten. Darstellung eines exemplarischen Experimentes zum Nachweis des endogenen Proteinlevels mittels *Western blot* Analyse. **A)** In den Zelllinien der erkrankten AT Patienten wurden keine Signale für ATM nachgewiesen, während in der nicht-betroffenen Kontrollzelllinie GM03323 ATM detektiert wurde. **B)** endogenen Proteinlevel von pATM wurden nicht in Zelllinien von AT Patienten nachgewiesen. Nach Bestrahlung wurde ein Anstieg des pATM Levels in der Kontrollzelllinie GM03323 beobachtet, wobei bereits 1 h nach Bestrahlung das pATM Signal am deutlichsten ausgeprägt war. **C)** In allen untersuchten Zelllinien wurden Signale für ATR nachgewiesen. Nach Bestrahlung und mit zunehmender Reparaturzeit wurde keine Veränderung des ATR Levels beobachtet.

Daher wurden die Signalintensitäten für pKAP1 quantifiziert, auf die Gesamtintensität normalisiert und auf die mitgeführte Kontrolle der kommerziellen Zelllinie eines AT Patienten (GM03189) in jedem *Blot* relativiert (Abbildung 15B). Anschließend wurde die relative Veränderung der Signalintensität mit steigender Bestrahlungsdosis und zunehmender Reparaturzeit ermittelt. Im Vergleich zu der Kontrollzelllinie GM03323 zeigten die Zelllinien der AT Patienten und die Zelllinie GM03189 direkt nach Bestrahlung (1 h) im Mittel eine geringere Signalintensität von pKAP1 für 1 Gy (relative Intensität: 0,06 vs. 0,13) und 4 Gy (relative Intensität 0,12 vs. 0,59).



**Abbildung 15.** Detektion von pKAP1 in lymphblastoiden Zelllinien von AT Patienten.

**A)** In allen Zelllinien konnte eine dosisabhängige Zunahme und zeitabhängige Abnahme des pKAP1 Signals beobachtet werden. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment zum Nachweis des endogenen Proteinlevels mittels *Western Blot* Analyse. **B)** Nach Bestrahlung (1 h) wurde in den AT Zelllinien eine geringere Signalintensität von pKAP1 im Vergleich zu der Kontrolle GM03323 quantifiziert. Die Signalintensität von pKAP1 wurde zur Gesamtproteinmenge normalisiert und zur Kontrolle GM03189 relativiert. **C)** Mit steigender Dosis wurde in allen Zelllinien eine Zunahme der Proteinkonzentration von pKAP1 beobachtet, wobei der stärkste Anstieg 1 h nach Bestrahlung beobachtet wurde. Für die AT Patienten wurde insgesamt eine deutlich geringere Zunahme des relativen Proteinlevels von pKAP1 festgestellt. **D)** Mit zunehmender Zeit wurde eine Abnahme des Proteinlevel von pKAP1 beobachtet. In AT Patienten war diese Abnahme deutlich geringer im Vergleich zur Kontrolle. **C, D)** Die Veränderung der Proteinlevel mit steigender Dosis und zunehmender Zeit wurde als Steigung bestimmt.

Nach einer Reparaturzeit von 6 h konnten diese Unterschiede zwischen AT Patienten und Kontrollen nur nach einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy (relative Intensität 0,07 vs. 0,15) beobachtet werden. In der Untersuchung des Dosis-Wirkungs-Effektes für die Proteinlevel von pKAP1 wurde für AT Patienten eine deutlich geringere relative Zunahme des Proteinlevels mit steigender Dosis im Vergleich zur Kontrollzelllinie GM03323 nachgewiesen (Abbildung 15C). Ebenfalls wurde für die AT Patienten eine geringere relative Abnahme des pKAP1 Signals mit andauernder Reparaturzeit nach einer Bestrahlung detektiert (Abbildung 15D).

Somit wurde in den durchgeführten proteinchemischen Untersuchungen in allen AT Patienten kein endogenes Proteinlevel von ATM und pATM nachgewiesen, während in der Kontrolle ATM detektiert wurde und die Proteinlevel von pATM mit steigender Dosis zunehmen und anschließend über die Zeit wieder abfallen. Die Proteinlevel von pKAP1 zeigten ebenfalls eine dosis- und zeitabhängige Veränderung, wobei die Proteinlevel in allen AT Patienten im Vergleich zur Kontrolle deutlich geringer waren. Die PI3-Kinase ATR wurde in allen Zelllinien nachgewiesen.

## **4.2 Untersuchung der DNA Schadensantwort mit Hilfe von RIF in kryokonservierten Lymphozyten**

Aufgrund der beobachteten Heterogenität in der Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Signalen bei AT Patienten mit genetisch-bedingter Strahlenempfindlichkeit sollten weitere Proteine der DNA Schadensantwort untersucht werden, die in die Signal- und Reparaturkaskade von DSB eingebunden sind. Ziel war die Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens für 53BP1, MDC1, pATM, pDNA-PK, pKAP1 und Rap80 mittels semi-automatischer Quantifizierung. In molekular-epidemiologischen Untersuchungen von Kollektiven strahlenexponierter Individuen erreichen Untersuchungslabore bei einer großen Anzahl von Proben trotz Automatisierung schnell ihre Kapazitätsgrenze und die Verwendung von frischem Probenmaterial ist nicht immer möglich. Es wurde daher untersucht, welchen Einfluss die Kryokonservierung auf die semi-automatische Reparaturfoci-Analyse hat und inwieweit ungeübtes Personal in die Analyse involviert werden kann.

### **4.2.1 Etablierung der semi-automatischen Reparaturfoci-Analyse von DNA Reparaturproteinen**

Die Etablierung der semi-automatischen Reparaturfoci-Analyse von DNA Reparaturproteinen erfolgte in kryokonservierten Lymphozyten (Kapitel 3.2.2). Dazu wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung der qualitative Nachweis von  $\gamma$ H2A.X, 53BP1, MDC1 und pKAP1 an DSB durchgeführt (Kapitel 3.2.7). Anschließend wurden Auswertestrategien (Klassifikatoren) zur quantitativen, semi-automatischen Analyse einer Dosis-Effekt-Kurve ( $\gamma$ -Strahlung: 0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2 und 8 Gy) und einer Zeitkinetik (1, 4, 8 und 24 h) optimiert (Kapitel 3.2.2, 3.2.3 und 3.2.7). Für pATM, pDNA-PK und Rap80 konnte diese Etablierung nicht erfolgreich abgeschlossen werden.

#### **Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung und semi-automatischen Analysestrategie**

In einem ersten Schritt wurden für die Signal- und Reparaturproteine  $\gamma$ H2AX, 53BP1, MDC1 und pKAP1 Antikörperfärbungen etabliert, bei denen eine dosisabhängige Zunahme sowie eine zeitabhängige Abnahme der Signalanzahl und -intensität als Indikator für den strahleninduzierten Initialschaden und die DNA Reparatur beobachtet werden konnte. Hierbei wurde die Sensitivität und Spezifität vor allem durch eine unspezifische Färbung des Hintergrundes beeinflusst. Der Schwerpunkt der Etablierung lag daher auf drei Parametern: geringer Hintergrund, Visualisierung des dosisabhängigen Initialschadens und Nachweis der zeitabhängigen Reparatur (Tabelle 5 und Kapitel 3.2.3).

Die Anzahl der RIF für  $\gamma$ H2AX, 53BP1 und MDC1 wurde zunächst in einer Dosis-Effekt-Kurve und Reparatur-Kinetik manuell an 100 Zellen ausgezählt. Anschließend wurde die semi-automatische Auswertung an die manuelle Zählung angepasst. Dabei wurde in einer algorithmus-basierten Quantifizierung von Foci-Signalen (Klassifikator), die automatische Zellerkennung optimiert und Parameter für die Foci-Erkennung angepasst.

#### *Optimierung der Zellerkennung*

Die Zellerkennung erfolgte in DAPI/Hoechst-gefärbten Zellkernen (DAPI-Filter) anhand der Parameter „Fläche“ und „Form“. Für Lymphozyten (Durchmesser  $\sim 5 - 15 \mu\text{m}$ ) wurde die Fläche von 20 bis  $200 \mu\text{m}^2$  eingegrenzt und eine runde bis ovale Form ausgewählt. Zellkerne mit einer abweichenden Fläche oder segmentierten Zellkernmorphologie wurden nicht berücksichtigt, sodass Zellfragmente und Granulozyten von der Auswertung ausgeschlossen wurden (Abbildung Anhang 3).

#### *Optimierung der Foci Erkennung*

Die fluoreszenzmarkierten Signale der RIF wurden im FITC- (für AlexaFluor® (AF) 488) oder *Spectrum-Orange* Filter (für AF 555) detektiert. Die Integrationszeit im jeweiligen Filter wurde fixiert, sodass vergleichbare Intensitätsmessungen zwischen Objektträgern und unabhängigen Versuchen gewährleistet sind. Im Klassifikator wurden Signale als Foci gezählt, die mit ihrer relativen Signalintensität (%) über der Hintergrundintensität lagen.

Durch Erhöhung des Schwellenwertes der relativen Signalintensität wurde eine Abnahme in der Anzahl der detektierten Signale beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde bei einem niedrigen Schwellenwert für die relative Signalintensität eine hohe Anzahl an Signalen in unbestrahlten und niedrig bestrahlten Proben beobachtet, da bereits schwache Signale als Foci gewertet wurden. Neben der relativen Signalintensität wurde zusätzlich der Intensitätsbereich angepasst. Damit wurden nur noch Signale gewertet, die ausgehend von der maximalen Intensität aller Signale, in einem definierten, relativen Intensitätsbereich lagen. Die Ergebnisse der Klassifikatoren sind in Tabelle 6 dargestellt (Abbildung Anhang 4 - 8). Abweichend von der geschilderten Vorgehensweise wurden für pKAP1 aufgrund des pan-nukleären Signals keine RIF Zählung per Auge vorgenommen, sondern der Klassifikator anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve angepasst.

**Tabelle 5.** Übersicht der etablierten Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung von RIF.

Aufgeführt ist der Antikörper mit Hersteller und der verwendeten Verdünnung. Informationen zum Klon und der Artikelnummer sind im Kapitel 2.1.3 aufgeführt.

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
anti-phospho Histone H2A.X Ser139	1:200	Kaninchen	Cell Signaling Technology Europe B.V., Deutschland
anti-phospho Histone H2A.X Ser139	1:100	Maus	Merck KGaA, Deutschland
anti-53BP1	1:500	Kaninchen	Novus Biologicals/Bio-Techne GmbH, Deutschland
anti-MDC1	1:500	Maus	Abcam plc, Großbritannien
anti-phospho KAP-1 Ser824	1:200	Kaninchen	Bethyl Laboratories Inc, USA,
anti-Kaninchen IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment, Alexa Fluor® 555 konjugiert	1:1000	Ziege	Cell Signaling Technology Europe B.V., Deutschland
anti-Maus IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment, Alexa Fluor® 488 konjugiert	1:1000	Ziege	Cell Signaling Technology Europe B.V., Deutschland

**Tabelle 6.** Übersicht der Klassifikatoren-Parameter für die semi-automatische Analyse von RIF.

Für jeden untersuchten Antikörper wurde die semi-automatische Auswertung mittels Klassifikator an die manuelle Auszählung angepasst. Nach der Zellauswahl im DAPI-Filter wurden die Parameter Integrationszeit, relative Signalintensität und Intensitätsbereich optimiert.

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Zellauswahl Fläche [ $\mu\text{M}^2$ ]	Integrationszeit [s]	relative Signalintensität [%]	Signalbereich
anti- $\gamma$ H2A.X (K)	anti-K AF555	20-200	0,12	30	0,25-1
anti- $\gamma$ H2AX (M)	anti-M AF488	20-200	0,12	30	0,25-1
anti-53BP1 (K)	anti-K AF555	20-200	0,16	40	0,25-1
anti-MDC1 (M)	anti-M AF488	20-200	0,16	50	0,5-1
anti-pKAP1 (K)	anti-K AF555	20-200	0,12	30	0,25-1

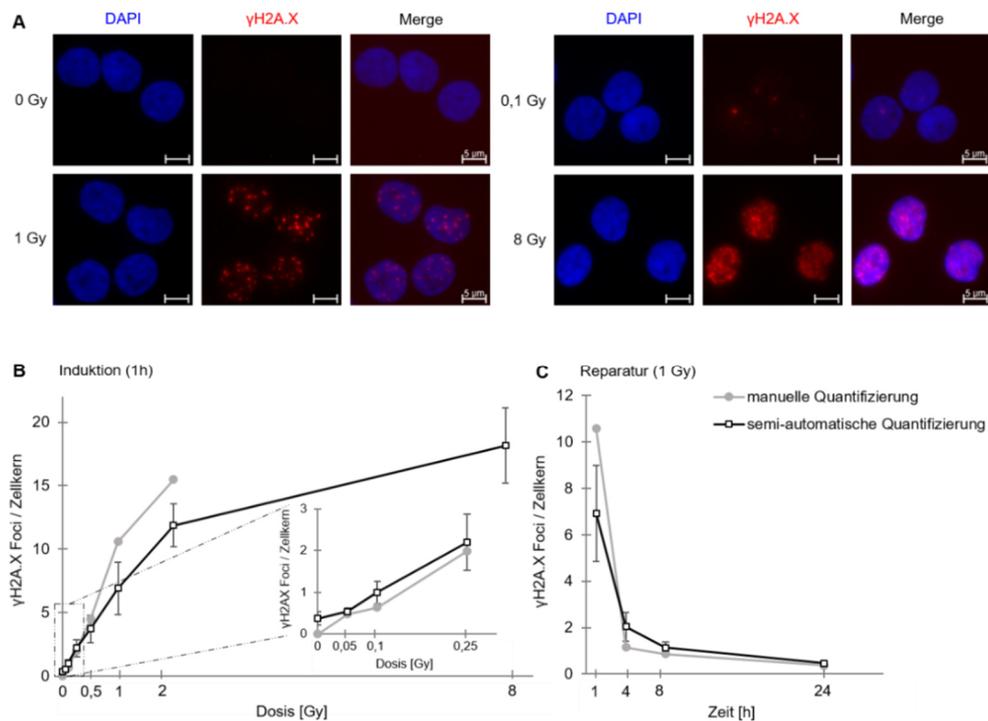
Abkürzungen: AF, AlexaFluor®; K, Kaninchen; M, Maus

### **Semi-automatische Analyse ermöglicht die Erfassung der dosisabhängigen Induktion und zeitabhängigen Reparatur von RIF**

Die durchgeführte Antikörperfärbung und Klassifikator-Etablierung bildete die Grundlage zur semi-automatischen Quantifizierung der Signale in kryokonservierten Lymphozyten. Nachfolgend wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung und Zeitkinetik nach *in vitro* Bestrahlung in mindestens vier unabhängigen Versuchen erstellt und in der semi-automatischen Analyse ausgewertet. Für die manuelle Quantifizierung wurden mindestens 100 Zellen eines Versuches ausgewertet.

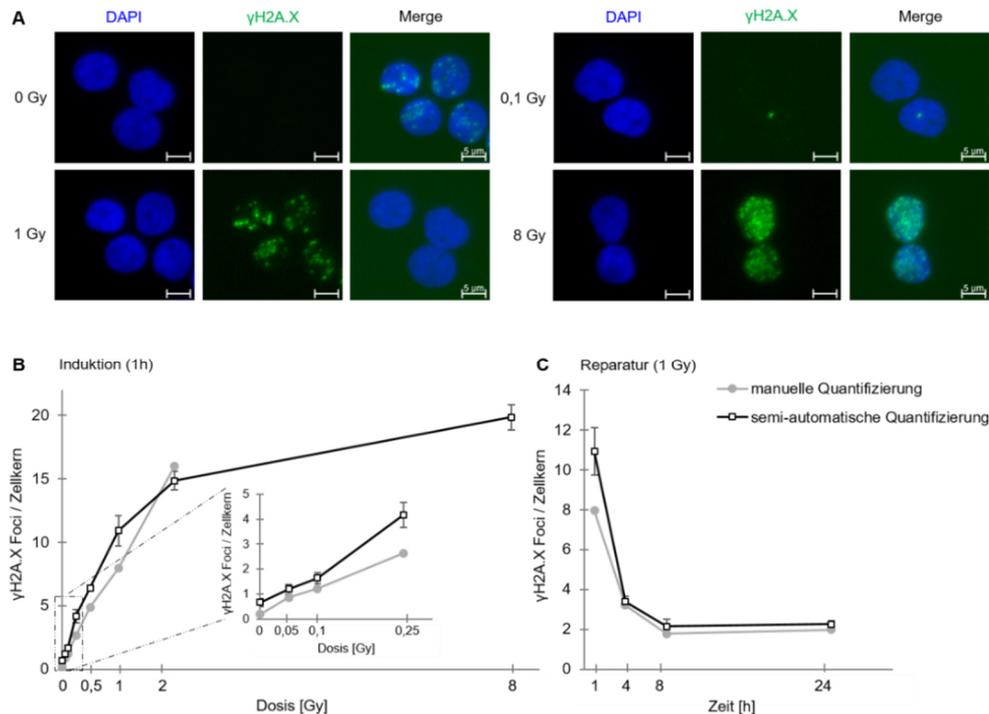
In der semi-automatischen Analyse wurden für  $\gamma$ H2A.X mit AF555 in sechs unabhängigen Versuchen insgesamt 261.671 Zellen (mittleren Zellzahl: 1.406 Zellen/Objektträger) und für  $\gamma$ H2A.X mit AF488 in vier unabhängigen Versuchen insgesamt 178.431 Zellen (mittleren Zellzahl: 1.462 Zellen/Objektträger) untersucht.

Für beide  $\gamma$ H2A.X Antikörper wurden nach einer *in vitro* Bestrahlung deutliche punktförmige Signale (RIF) in den Zellkernen beobachtet (Abbildung 16A, 17A), die mit steigender Dosis von 0,05 Gy ( $\gamma$ H2A.X mit AF555 0,54 Foci/Zellkern,  $\gamma$ H2A.X mit AF488 1,19 Foci/Zellkern) bis 8 Gy ( $\gamma$ H2A.X mit AF555 18,16 Foci/Zellkern,  $\gamma$ H2A.X mit AF488 19,86 Foci/Zellkern) in ihrer Anzahl zunehmen (Abbildung 16B, 17B). Bereits in unbestrahlten Lymphozyten wurden vereinzelt Foci detektiert ( $\gamma$ H2AX mit AF555 0,37 Foci/Zellkern,  $\gamma$ H2AX mit AF488 0,66 Foci/Zellkern). Zwischen 2 Gy und 8 Gy zeigte sich eine Sättigung in der Foci Zunahme. Die maximale Anzahl an  $\gamma$ H2AX Foci wurde 30 min - 1 h nach der Bestrahlung festgestellt. Mit zunehmender Zeit nach der Bestrahlung zeigte sich zunächst eine schnelle Reparaturphase (1 bis 4 h nach Bestrahlung) mit einer raschen Abnahme der Foci Anzahl (für 1 Gy; Abbildung 16C;  $\gamma$ H2A.X mit AF555 70,5 % reparierte Foci, Abbildung 17C;  $\gamma$ H2A.X mit AF488 69,0 % reparierte Foci). Im weiteren Zeitverlauf (4 bis 24 h nach Bestrahlung) folgte eine langsamere Reparaturphase (für 1 Gy; 8 h:  $\gamma$ H2A.X mit AF555 83,7 % reparierte Foci,  $\gamma$ H2A.X mit AF488 80,4 % reparierte Foci; 24 h:  $\gamma$ H2A.X mit AF555 93,2 % reparierte Foci,  $\gamma$ H2A.X mit AF488 79,3 % reparierte Foci).



**Abbildung 16.** Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von  $\gamma$ H2A.X Foci (AlexaFluor® 555).

**A**) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von  $\gamma$ H2A.X Foci (rot) in Zellkernen (blau) in bestrahlten Lymphozyten (0, 0,1, 1 und 8 Gy). Es wurde die Bildung von  $\gamma$ H2A.X Foci mit einer **B**) dosisabhängigen Zunahme 1 h nach Bestrahlung und **C**) zeitabhängigen Abnahme in der Foci Anzahl beobachtet. Dargestellt sind die semi-automatische Analyse mit der mittleren Anzahl der Foci aus sechs unabhängigen Replikaten mit dem Standardfehler des Mittelwertes und die manuelle Quantifizierung mit der mittleren Anzahl der Foci aus der Auszählung von 100 Zellen. Fluoreszenzaufnahmen und Reparaturfoci-Analyse wurde mit einem Metafer Scanning System durchgeführt. Die Maßstabsskala entspricht 5  $\mu$ m bei 40x Vergrößerung.



**Abbildung 17.** Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von  $\gamma$ H2A.X Foci (AlexaFluor® 488).

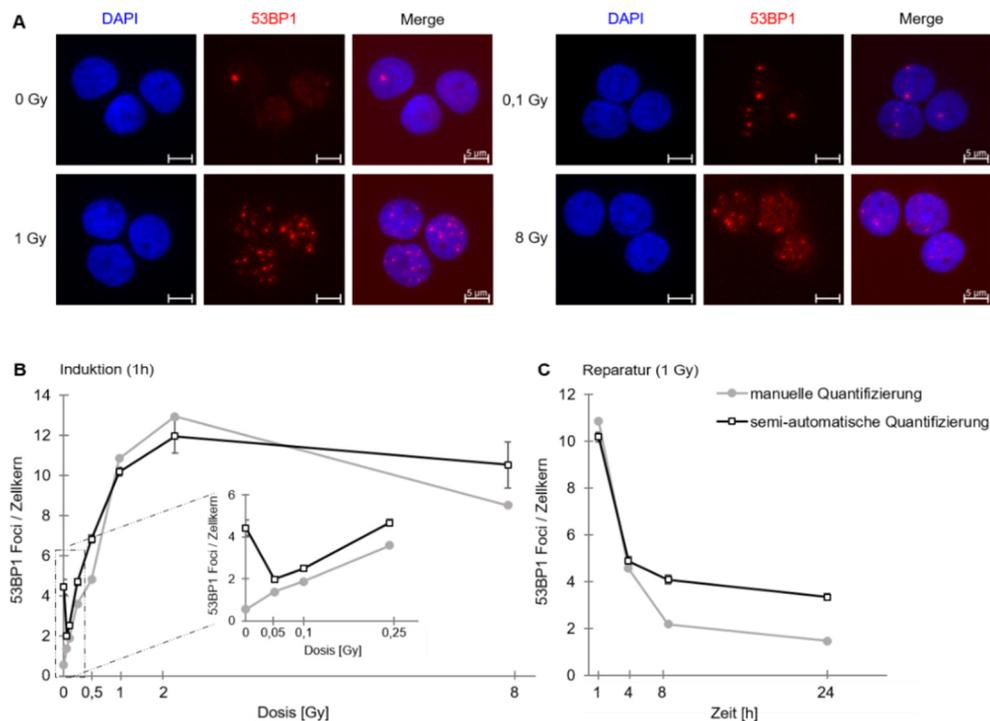
**A**) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von  $\gamma$ H2A.X Foci (grün) in Zellkernen (blau) in bestrahlten Lymphozyten (0, 0,1, 1 und 8 Gy). Es wurde die Bildung von  $\gamma$ H2A.X Foci mit einer **B**) dosisabhängigen Zunahme 1 h nach Bestrahlung und **C**) zeitabhängigen Abnahme in der Foci Anzahl beobachtet. Dargestellt sind die semi-automatische Analyse mit der mittleren Anzahl der Foci aus vier unabhängigen Replikaten mit dem Standardfehler des Mittelwertes und die manuelle Quantifizierung mit der mittleren Anzahl der Foci aus der Auszählung von 100 Zellen. Fluoreszenzaufnahmen und Reparaturfoci-Analyse wurde mit einem Metafer Scanning System durchgeführt. Die Maßstabsskala entspricht 5  $\mu$ m bei 40x Vergrößerung.

In der manuellen Auswertung von 3.158 Zellen  $\gamma$ H2A.X mit AF555 (mittlere Zellzahl: 101 Zellen/Objektträger) und 2.932 Zellen für  $\gamma$ H2A.X mit AF488 (mittlere Zellzahl: 101 Zellen/Objektträger) wurden die Ergebnisse der semi-automatischen Auswertung qualitativ bestätigt (Abbildung 16B, 17B, 16C, 17C). Jedoch konnte das Basallevel der Foci reduziert werden ( $\gamma$ H2A.X mit AF555 0,0 Foci/Zellkern,  $\gamma$ H2A.X mit AF488 0,18 Foci/Zellkern). Bei einer Bestrahlungsdosis von 8 Gy konnte der induzierte Schaden 1 h und 4 h nach der Bestrahlung manuell nicht ausgewertet werden, da aufgrund der Vielzahl und Dichte eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Foci nicht möglich war (Abbildung 16A, 17A). Die kompletten Daten der Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik sind im Anhang dargestellt (Abbildung Anhang 9 und 10, Tabelle Anhang 1 und 2).

Die Bildung und Abnahme von 53BP1 Foci wurde in fünf unabhängigen Versuchen mit insgesamt 224.205 Zellen (mittleren Zellzahl: 1.437 Zellen/Objektträger) untersucht. Für 53BP1 wurde in unbestrahlten Lymphozyten ein ubiquitäres und diffuses Signal mit vereinzelt Foci beobachtet (Abbildung 18A).

Mit der semi-automatischen Analyse wurde für 0 Gy eine höhere Foci Anzahl im Vergleich zur manuellen Auswertung detektiert (4,43 vs. 0,55 Foci/Zellkern). Bereits nach Bestrahlung mit einer geringen Dosis von 0,05 Gy wurde dieses diffuse Signal in den Zellkernen nicht mehr detektiert und die 53BP1 Signale waren als leuchtende Foci erkennbar (Abbildung 18A). Allerdings war die Foci Anzahl in der semi-automatischen Auswertung nach Bestrahlung zunächst geringer im Vergleich zu unbestrahlten Zellen und stieg dann mit zunehmender Dosis an (Abbildung 18B; 0,05 Gy 1,99 Foci/Zellkern, 8 Gy 10,52 Foci/Zellkern). Das Maximum der 53BP1 Foci wurde 1 h nach der Bestrahlung erreicht und mit zunehmender Kulturdauer wurde eine Abnahme der Foci Signale beobachtet (für 1 Gy; Abbildung 18C; 4 h 52 %, 8 h 59,8 %, 24 h 67,2 % reparierte Foci).

Bei der manuellen Quantifizierung von 3.254 Zellen (mittlere Zellzahl: 101 Zellen/Objektträger) wurde diese Beobachtung qualitativ bestätigt (Abbildung 18C). Nach einer Bestrahlung mit 8 Gy wurde in der semi-automatischen und manuellen Auswertung beobachtet, dass die maximale Foci Anzahl erst 4 h nach Bestrahlung erreicht wurde (Abbildung Anhang 11, Tabelle Anhang 3).

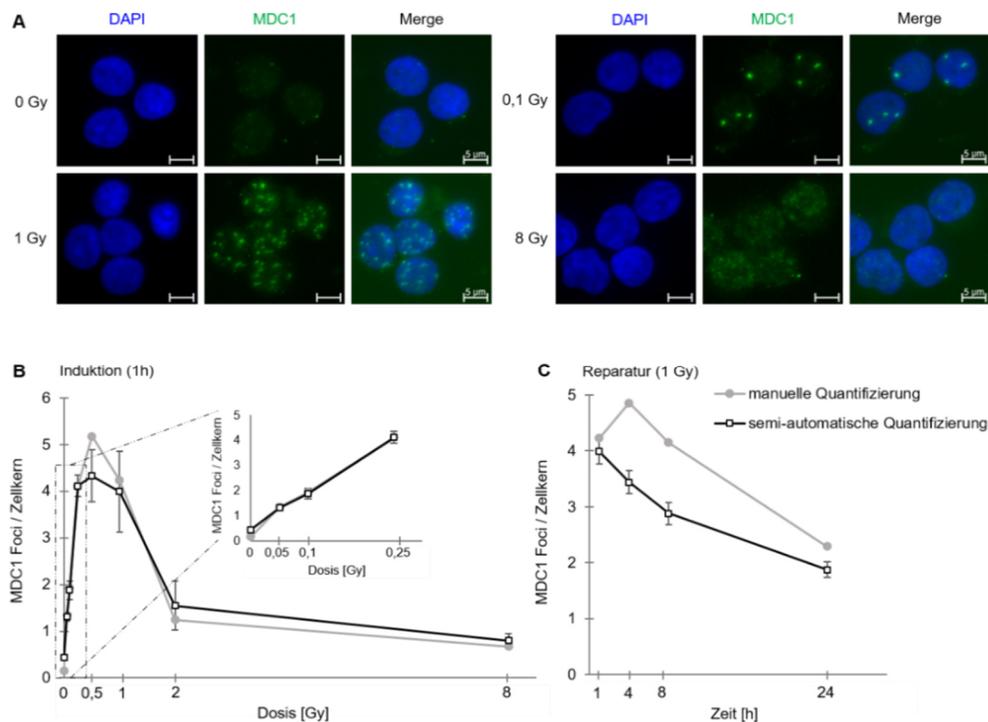


**Abbildung 18.** Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von 53BP1 Foci.

**A)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von 53BP1 Foci (rot) in Zellkernen (blau) in bestrahlten Lymphozyten (0, 0,1, 1 und 8 Gy). Es wurde die Bildung von 53BP1 Foci mit einer **B)** dosisabhängigen Zunahme 1 h nach Bestrahlung und **C)** zeitabhängigen Abnahme in der Foci Anzahl beobachtet. Dargestellt sind die semi-automatische Analyse mit der mittleren Anzahl der Foci aus fünf unabhängigen Replikaten mit dem Standardfehler des Mittelwertes und die manuelle Quantifizierung mit der mittleren Anzahl der Foci aus der Auszählung von 100 Zellen. Fluoreszenzaufnahmen und Reparaturfoci-Analyse wurde mit einem Metafer Scanning System durchgeführt. Die Maßstabsskala entspricht 5 µm bei 40x Vergrößerung.

Für MDC1 wurden in der semi-automatischen Analyse in sechs unabhängigen Versuchen insgesamt 267.912 Zellen (mittleren Zellzahl: 1.440 Zellen/Objektträger) ausgewertet. Während in unbestrahlten Präparaten vereinzelt Foci detektiert wurden, konnte nach Bestrahlung eine dosisabhängige Zunahme zwischen 0,05 Gy (1,31 Foci/Zellkern) und 0,25 Gy (4,11 Foci/Zellkern) beobachtet werden (Abbildung 19A, 19B). Bereits ab einer Dosis von 0,25 Gy wurde eine Sättigung in der Dosis-Effekt-Kurve erreicht und mit steigender Dosis von 0,5 Gy zu 1 Gy, 2 Gy und 8 Gy eine Abnahme der Signalanzahl festgestellt (4,33 vs. 3,99 vs. 1,55 vs. 0,79 Foci/Zellkern). Zusätzlich wurde das Maximum der Foci Anzahl bei Bestrahlungsdosen  $\leq 1$  Gy nach 1 h, bei 2 Gy nach 8 h und bei 8 Gy nach 24 h erreicht (Abbildung Anhang 12, Tabelle Anhang 4). Für Bestrahlungsdosen  $\leq 2$  Gy wurde mit anhaltender Kulturdauer eine Abnahme der Foci Anzahl beobachtet (Abbildung 19C). Dabei war der Anteil der reparierten Foci (für 1 Gy; Abbildung XXC; 4 h 13,8 %, 8 h 27,8 % und 24 h 53 %) geringer im Vergleich zu 53BP1 und  $\gamma$ H2A.X.

Mit der manuellen Auswertung von 3.240 Zellen (mittlere Zellzahl: 101 Zellen/Objektträger) wurden die Beobachtungen aus der semi-automatischen Analyse qualitativ bestätigt. Jedoch wurde bereits bei 1 Gy eine Verschiebung der maximalen Foci Anzahl von 1 h zu 4 h beobachtet.

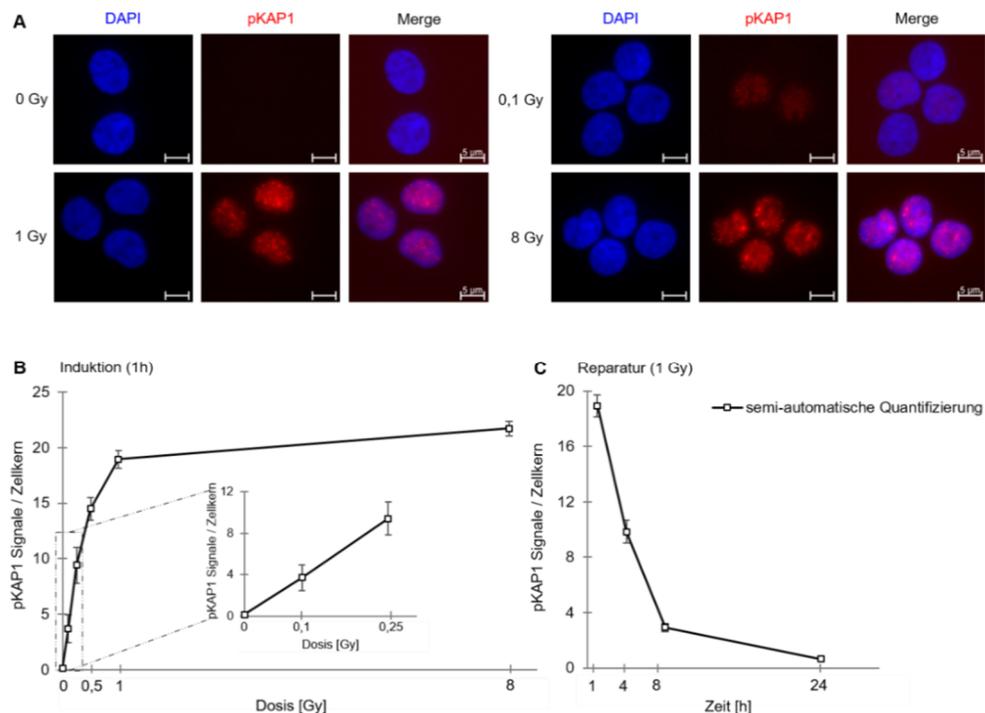


**Abbildung 19.** Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von MDC1 Foci.

**A)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von MDC1 Foci (grün) in Zellkernen (blau) in bestrahlten Lymphozyten (0, 0,1, 1 und 8 Gy). Es wurde die Bildung von MDC1 Foci mit einer **B)** dosisabhängigen Zunahme 1 h nach Bestrahlung und **C)** zeitabhängigen Abnahme in der Foci Anzahl beobachtet. Dargestellt sind die semi-automatische Analyse mit der mittleren Anzahl der Foci aus sechs unabhängigen Replikaten mit dem Standardfehler des Mittelwertes und die manuelle Quantifizierung mit der mittleren Anzahl der Foci aus der Auszählung von 100 Zellen. Fluoreszenzaufnahmen und Reparaturfoci-Analyse wurde mit einem Metafer Scanning System durchgeführt. Die Maßstabsskala entspricht 5  $\mu$ m bei 40x Vergrößerung.

Die semi-automatische Auswertung von pKAP1 erfolgte in vier unabhängigen Versuchen mit insgesamt 197.840 Zellen (mittleren Zellzahl: 2.060 Zellen/Objektträger). In unbestrahlten Lymphozyten wurden keine Signale für pKAP1 detektiert und nach Bestrahlung wurde ein diffuses, flächiges, über den Zellkern verteiltes Signal mit vereinzelt intensitätsstarken, punktförmigen Signalen beobachtet (Abbildung 20A). Trotz des flächigen Signals konnte aufgrund von Intensitätsunterschieden im Zellkern eine semi-automatische Analyse durchgeführt werden. Dabei wurden punktförmige Signalbereiche mit Intensitätswerten über der mittleren Hintergrundintensität (Intensitätsmaxima) quantifiziert. Mit zunehmender Bestrahlungsdosis wurde eine Zunahme in der gesamten Signalintensität und der Anzahl der Fluoreszenzsignale mit Intensitätsmaxima festgestellt (Abbildung 20B; 0 Gy 0,13 Signale/Zellkern vs. 8 Gy 21,71 Signale/Zellkern). Das Signalmaximum wurde 1 h nach einer Bestrahlung mit  $\leq 1$  Gy erreicht und die Signalintensität und Anzahl nahm mit anhaltender Kulturdauer ab (für 1 Gy; Abbildung 20C; 4 h 48 %, 8 h 84,5 % und 24 h 96,5 %). Nach einer Bestrahlung mit 8 Gy wurde das Intensitätsmaximum von pKAP1 erst 4 h nach der Bestrahlung erreicht (Abbildung Anhang 13, Tabelle Anhang 5).

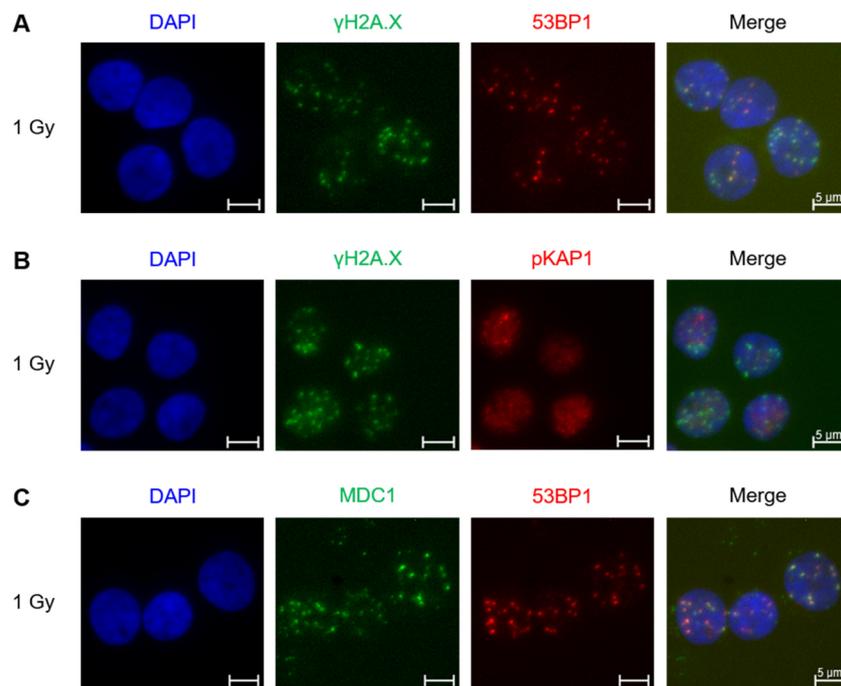
Eine manuelle Quantifizierung wurde aufgrund des diffusen Signals nicht durchgeführt.



**Abbildung 20.** Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von pKAP1 Signalen.

**A)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von pKAP1 Signalen (rot) in Zellkernen (blau) in bestrahlten Lymphozyten (0, 0,1, 1 und 8 Gy). Es wurde die Bildung von pKAP1 Signalen mit einer **B)** dosisabhängigen Zunahme 1 h nach Bestrahlung und **C)** zeitabhängigen Abnahme in der Signalanzahl beobachtet. Dargestellt ist die semi-automatische Analyse mit der mittleren Anzahl der Signale mit Intensitätsmaxima aus vier unabhängigen Replikaten mit dem Standardfehler des Mittelwertes. Fluoreszenzaufnahmen und Reparaturfoci-Analyse wurde mit einem Metafer Scanning System durchgeführt. Die Maßstabsskala entspricht 5  $\mu$ m bei 40x Vergrößerung.

Neben den Einzelfärbungen wurde eine Doppelfärbung für  $\gamma$ H2AX mit 53BP1 (Abbildung 21A) oder pKAP1 (Abbildung 21B) und 53BP1 mit MDC1 (Abbildung 21C) etabliert, um den Einsatz des Probenmaterials zu reduzieren. Zur semi-automatischen Auswertung wurden dafür die zuvor etablierten Klassifikatoren der Einzelfärbungen miteinander kombiniert. In den Untersuchungen wurde für  $\gamma$ H2AX und 53BP1 und für 53BP1 und MDC1 eine Kolokalisation der beiden Antikörper in der gesamten Dosis-Effekt-Kurve beobachtet.



**Abbildung 21.** Doppelfärbungen von  $\gamma$ H2A.X mit 53BP1,  $\gamma$ H2A.X mit pKAP1 und 53BP1 mit MDC1.

**A)** Für  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 konnte eine Kolokalisierung nach Bestrahlung beobachtet werden. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von  $\gamma$ H2A.X (grün) und 53BP1 (rot) in Zellkernen (blau) von bestrahlten Lymphozyten (1 Gy). **B)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von  $\gamma$ H2A.X (grün) und pKAP1 (rot) in Zellkernen (blau) von bestrahlten Lymphozyten (1 Gy). **C)** Für 53BP1 und MDC1 konnte eine Kolokalisation nach Bestrahlung beobachtet werden. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von 53BP1 (rot) und MDC1 (grün) in Zellkernen (blau) von bestrahlten Lymphozyten (1 Gy). Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Metafer Scanning System durchgeführt. Die Maßstabsskala entspricht 5  $\mu$ m bei 40x Vergrößerung.

### Qualitative Evaluation für Präparate der semi-automatischen Analyse notwendig

In der zuvor durchgeführten semi-automatischen Analyse bildeten unbewertete Rohdaten die Grundlage der Untersuchung. Im Rahmen einer Evaluation der präparierten Objektträger wurde festgestellt, dass die Qualität der Objektträger einen Einfluss auf die Quantifizierung der Foci Anzahl hat und somit Präparate einer Qualitätskontrolle unterzogen werden müssen. Objektträger mit falsch fokussierten und unscharfen Bereichen, ohne sichtbare Immunfluoreszenzfärbung, mit Abweichungen im experimentellen Färbeverfahren, einer geringen Zellzahl von  $\leq 500$  analysierten Zellen oder einer Vielzahl deformierter und morphologisch auffälliger Zellkerne wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Zusätzlich durften Präparate nur einmal in der semi-automatischen Analyse aufgenommen werden, da festgestellt wurde, dass bei wiederholten Fluoreszenzaufnahme die Intensität der Foci schwächer war und damit die etablierte Dosis-Effekt-Kurve nicht angewendet werden konnte.

Pro Objektträger wurden je nach Zelldichte und Objektivvergrößerung 150 bis 800 einzelne Bilddateien in der semi-automatischen Analyse erstellt. Von diesen Bilddateien wurden nach der Vorgabe des Klassifikators zur Zellerkennung einzelne Zellkerne in die Foci Analyse eingeschlossen. In einem weiteren Bewertungsschritt wurden daher einzelne Bilddateien evaluiert und von der Analyse ausgeschlossen, wenn Fremdkörper, überfärbte und stark fluoreszierende Zellkerne oder Strukturen, oder unscharfe und falsch fokussierte Bildausschnitte vorlagen. Für  $\gamma$ H2A.X wurde in der Begutachtung der einzelnen Bilddateien Zellen beobachtet, die ein pan-nukleäres Signal aufwiesen und dadurch die Foci Signale von umliegenden Zellen überstrahlten (Abbildung Anhang 14). Durch den Ausschluss dieser Bilddateien wurde eine Zunahme der gemittelten Foci Anzahl pro Zellkern erreicht (Abbildung Anhang 9, 10). Jedoch wurde dadurch die Zellzahl der Präparate erheblich reduziert und damit wurden für  $\gamma$ H2A.X mit AF555 von 261.671 Zellen nur noch 59.592 Zellen und für  $\gamma$ H2A.X mit AF488 von 178.431 Zellen nur noch 57.133 Zellen in die Analyse einbezogen.

Hingegen wurden für 53BP1, MDC1 und pKAP1 nur vereinzelt stark fluoreszierende Strukturen beobachtet und kein Einfluss auf die mittlere Anzahl der Foci durch Bewertung festgestellt (Abbildung Anhang 11 - 13). In den folgenden Untersuchungen wurde für jeden Objektträger eine Qualitätskontrolle eingeführt, jedoch auf die Bewertung einzelner Bilddateien durch den erheblichen Zeitaufwand verzichtet.

Insgesamt konnte für die Proteine  $\gamma$ H2A.X, 53BP1, MDC1 und pKAP1 die Immunfluoreszenzfärbung in kryokonservierten Lymphozyten und die anschließende semi-automatische Quantifizierung etabliert werden. Für alle Proteine konnte über einen Dosisbereich von 0 bis 8 Gy eine Dosis-Wirkungsbeziehung und eine Reparaturkinetik nachgewiesen werden. Dabei wurde neben einer Einzelfärbung zusätzlich eine Doppelfärbung etabliert. Zusätzlich wurden zwei Strategien zur Qualitätskontrolle und Evaluation der semi-automatischen Quantifizierung erarbeitet.

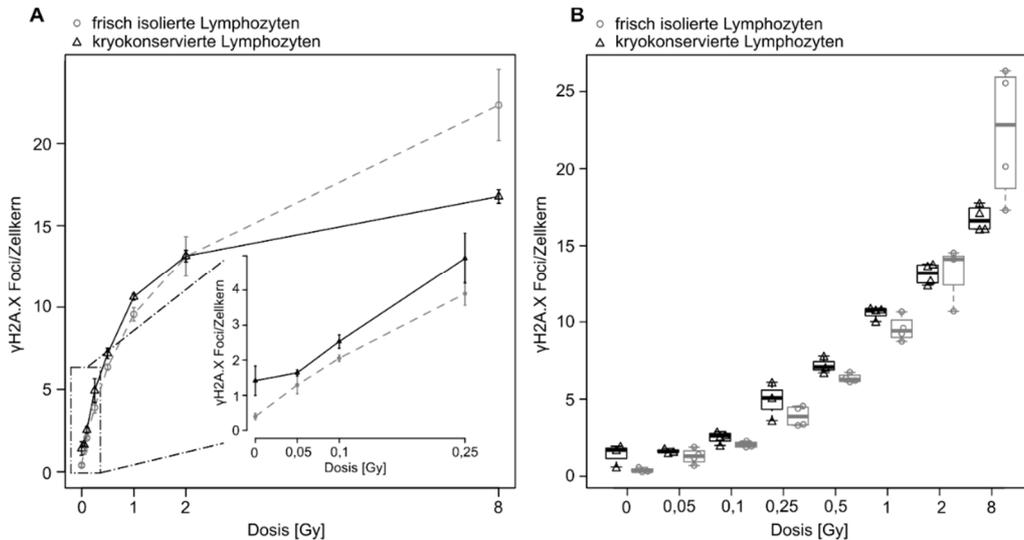
#### **4.2.2 Einfluss der Kryokonservierung auf die semi-automatischen Analyse von RIF**

Die direkte und zeitnahe Untersuchung von biologischen Proben ist insbesondere in molekular-epidemiologischen Studien nicht immer möglich. Hierfür ist die Zwischenlagerung von Proben notwendig und bietet einen Mehrwert für den experimentellen Ablauf und die Vergleichbarkeit von Ergebnissen. In den vorangegangenen Untersuchungen wurde daher für kryokonservierte Lymphozyten ein semi-automatisches Analyseverfahren zur quantitativen Auswertung von  $\gamma$ H2AX, 53BP1, MDC1 und pKAP1 etabliert. Im Folgenden wurde der Einfluss der Kryokonservierung auf die Bildung von RIF dieser Proteine untersucht. Dazu wurde die mittlere induzierte Foci Anzahl 1 h nach Bestrahlung (Röntgenstrahlung: 0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2 und 8 Gy) in kryokonservierten Lymphozyten mit frisch isolierten Lymphozyten verglichen (Kapitel 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3). In vier technischen Replikaten wurden mindestens 500 Zellen pro Objektträger mit der semi-automatischen Analyse ausgewertet (Kapitel 3.2.7).

##### **Semi-automatische Reparaturfoci-Analyse in kryokonservierten Lymphozyten möglich**

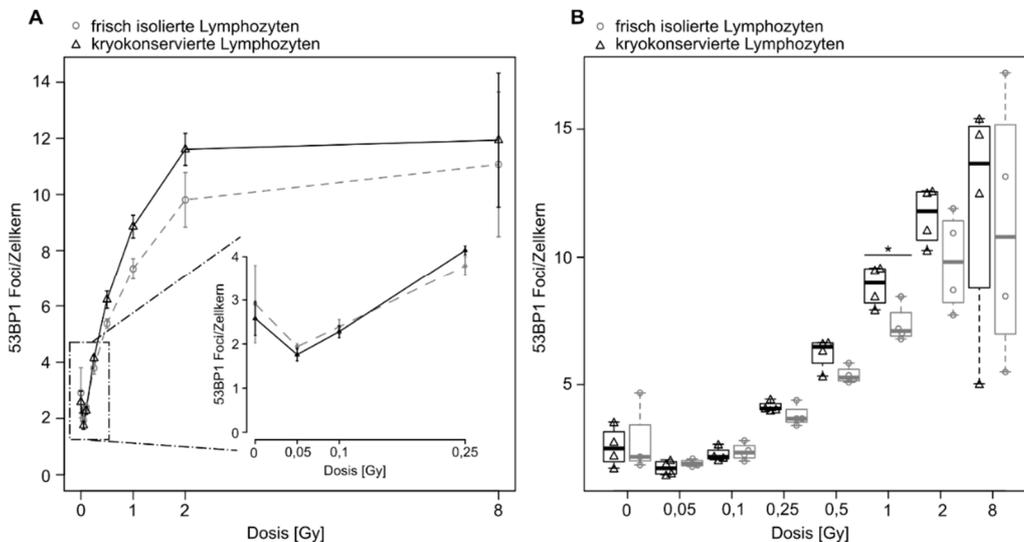
Für  $\gamma$ H2A.X wurde ausschließlich die Einzelfärbung von  $\gamma$ H2A.X mit AlexaFluor® 488 verglichen. Insgesamt wurden 28 Objektträger mit 40.909 kryokonservierten Lymphozyten (mittlere Zellzahl pro Objektträger 1.461) und 30 Objektträger mit 45.183 frisch isolierten Lymphozyten (mittlere Zellzahl pro Objektträger 1.506) untersucht. Bei Vollblut wurde der zuvor bei kryokonservierten Lymphozyten beschriebene dosisabhängige Anstieg in der Foci Anzahl beobachtet (Abbildung 22A). Ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) in der Foci Anzahl zu 0 Gy wurde für kryokonservierte Lymphozyten  $\geq 0,25$  Gy und für frisch isolierte Lymphozyten  $\geq 0,05$  Gy beobachtet. Frisch isolierte Lymphozyten zeigten zudem ein nicht signifikantes, niedrigeres Basallevel (1,42 vs. 0,40 Foci/Zellkern,  $p = 0,13$ ) und eine nicht signifikante, geringere Foci Anzahl  $\leq 2$  Gy im Vergleich zu kryokonservierten Lymphozyten (Abbildung 22B und Tabelle Anhang 6).

Im Vergleich der 53BP1 Foci Anzahl pro Zellkern von kryokonservierten Lymphozyten und Vollblut wurde in beiden Fällen eine ähnliche Dosis-Effekt-Kurve mit einem erhöhten Basallevel (2,58 vs. 2,91 Foci/Zellkern) und der Bildung von diskreten RIF nach Bestrahlung beobachtet (Abbildung 23A). Insgesamt wurden 32 Objektträger mit 46.162 kryokonservierten Lymphozyten (mittlere Zellzahl pro Objektträger 1.442) und 31 Objektträger mit 47.199 frisch isolierten Lymphozyten (mittlere Zellzahl pro Objektträger 1.522) untersucht. Während die mittlere Foci Anzahl in kryokonservierten Lymphozyten  $\geq 0,25$  Gy signifikant unterschiedlich zu 0 Gy war, wurde in frisch isolierten Lymphozyten  $\geq 1$  Gy ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu 0 Gy (je  $p < 0,05$ ) festgestellt. Ausschließlich für eine Bestrahlungsdosis von 1 Gy zeigten frisch isolierte Lymphozyten eine signifikant ( $p = 0,034$ ) geringere 53BP1 Foci Anzahl pro Zelle im Vergleich zu kryokonservierten Lymphozyten (Abbildung 23B, Tabelle Anhang 7).



**Abbildung 22.** Dosis-Effekt-Kurve von  $\gamma$ H2A.X Foci in kryokonservierten und frischen Lymphozyten.

**A)** In kryokonservierten und frisch isolierten Lymphozyten wurde die dosisabhängige  $\gamma$ H2A.X Foci Zunahme 1 h nach Bestrahlung beobachtet. In kryokonservierten Lymphozyten ist die Sättigung der Foci pro Zellkern stärker im Vergleich zu frisch isolierten Lymphozyten. Dargestellt ist die semi-automatische Analyse mit der mittleren Anzahl der Foci aus vier unabhängigen Replikaten mit dem Standardfehler des Mittelwertes **B)** Es wurde kein signifikanter Unterschied in der mittleren Foci Anzahl aus vier Replikaten festgestellt. Allerdings wurde in kryokonservierten Lymphozyten ein höheres Basalniveau beobachtet. Dargestellt ist die mittlere Anzahl an Signalen jedes einzelnen Replikates und der Median mit oberem und unterem Quartil und Whisker.

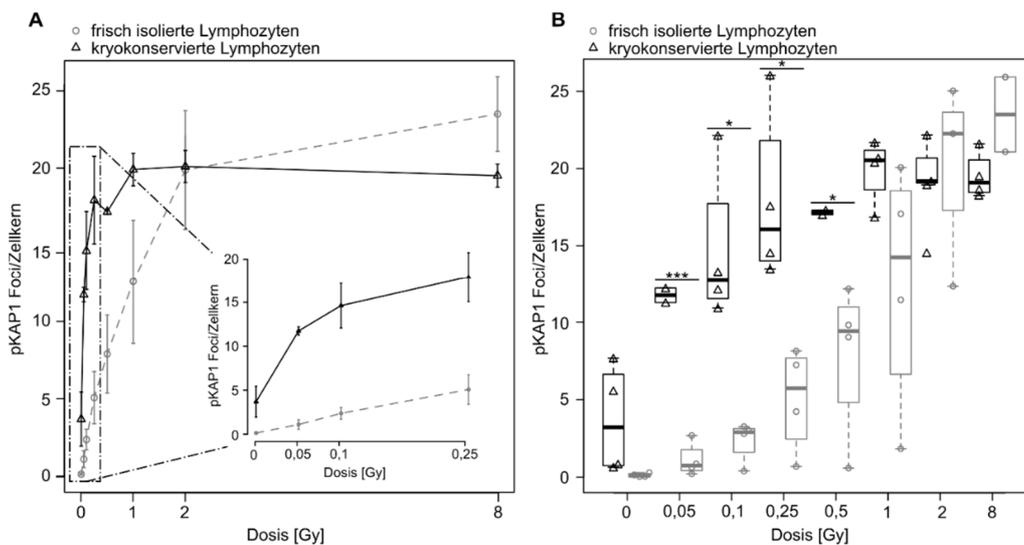


**Abbildung 23.** Dosis-Effekt-Kurve von 53BP1 Foci in kryokonservierten und frischen Lymphozyten.

**A)** In kryokonservierten und frisch isolierten Lymphozyten wurde die dosisabhängige 53BP1 Foci Zunahme 1 h nach Bestrahlung beobachtet. Dargestellt ist die semi-automatische Analyse mit der mittleren Anzahl der Foci aus vier unabhängigen Replikaten mit dem Standardfehler des Mittelwertes **B)** Es wurde für eine Dosis von 1 Gy ein signifikanter Unterschied in der mittleren Foci Anzahl aus vier Replikaten festgestellt. Dargestellt ist die mittlere Anzahl an Signalen jedes einzelnen Replikates und der Median mit oberem und unterem Quartil und Whisker.

Nach einem Wechsel in der Charge für den primären Antikörper gegen MDC1 konnten nach der Etablierung der semi-automatischen Analyse keine weiteren Versuche mit MDC1 durchgeführt werden. Der primäre Antikörper zeigte unspezifische, punktförmige und stark fluoreszierende Signale. Die dosisabhängige Bildung von Foci in den Zellen wurde nicht beobachtet.

Ein deutlicher Unterschied zwischen kryokonservierten Lymphozyten und frisch isolierten Lymphozyten wurde für die Anzahl von pKAP1 Signalen mit Intensitätsmaxima beobachtet. Insgesamt wurden 27 Objektträger mit 39.577 kryokonservierten Lymphozyten (mittlere Zellzahl pro Objektträger 1.465) und 29 Objektträger mit 43.703 frisch isolierten Lymphozyten (mittlere Zellzahl pro Objektträger 1.507) untersucht. Für beide Bedingungen wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Signalanzahl detektiert (Abbildung 24A). Allerdings wurde bei kryokonservierten Lymphozyten ein Plateau in der Signalanzahl  $\geq 1$  Gy erreicht, während bei frisch isolierten Lymphozyten  $\geq 2$  Gy eine Sättigung beobachtet wurde. In kryokonservierten Lymphozyten wurde ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) in der Signalanzahl zwischen 0 Gy und allen Bestrahlungsdosen  $\geq 0,05$  Gy festgestellt. Für frisch isolierte Lymphozyten wurde nur für die Dosispunkte 0,1 Gy und 2 Gy ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu 0 Gy ermittelt. Allerdings war die mittlere Signalanzahl für alle Dosispunkte  $\geq 0,05$  Gy mindestens fünfmal höher im Vergleich zu 0 Gy (Tabelle Anhang 8). Im Dosisbereich von 0,05 Gy bis einschließlich 0,5 Gy wurde eine signifikant größere Signalanzahl ( $p < 0,05$ ) in kryokonservierten Lymphozyten im Vergleich zu frisch isolierten Lymphozyten ermittelt (Abbildung 24B, Tabelle Anhang 8).



**Abbildung 24.** Dosis-Effekt-Kurve von pKAP1 Signalen in kryokonservierten und frischen Lymphozyten.

**A)** In kryokonservierten und frisch isolierten Lymphozyten wurde die dosisabhängige Zunahme von pKAP1 Signalen mit Intensitätsmaxima 1 h nach Bestrahlung beobachtet. Dargestellt ist die semi-automatische Analyse mit der mittleren Anzahl der Foci aus vier unabhängigen Replikaten mit dem Standardfehler des Mittelwertes **B)** Es wurde für eine Dosis von 0,05 Gy bis  $< 1$  Gy ein signifikanter Unterschied in der mittleren Foci Anzahl aus vier Replikaten festgestellt. Dargestellt ist die mittlere Anzahl an Signalen jedes einzelnen Replikates und der Median mit oberem und unterem Quartil und Whisker.

Mit den durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass kryokonservierte und frisch isolierte Lymphozyten einen qualitativ ähnlichen Dosis-Effekt für  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 aufweisen. Für pKAP1 wurden signifikante Unterschiede im niedrigen bis mittleren Dosisbereich beobachtet.

Dennoch konnte sowohl in kryokonservierten als auch in frisch isolierten Lymphozyten ein Dosis-Effekt ermittelt werden. Damit kann der Effekt von ionisierender Strahlung und die Bildung und Reparatur von DSB anhand von verschiedenen Reparaturfoci Proteinen in kryokonservierten Lymphozyten untersucht werden. Jedoch kann ein direkter Vergleich von frisch isolierten und kryokonservierten Lymphozyten innerhalb eines Versuches oder einer Studie nicht durchgeführt werden.

#### **4.2.3 Einbindung von ungeübten Kräften in die Reparaturfoci-Analyse**

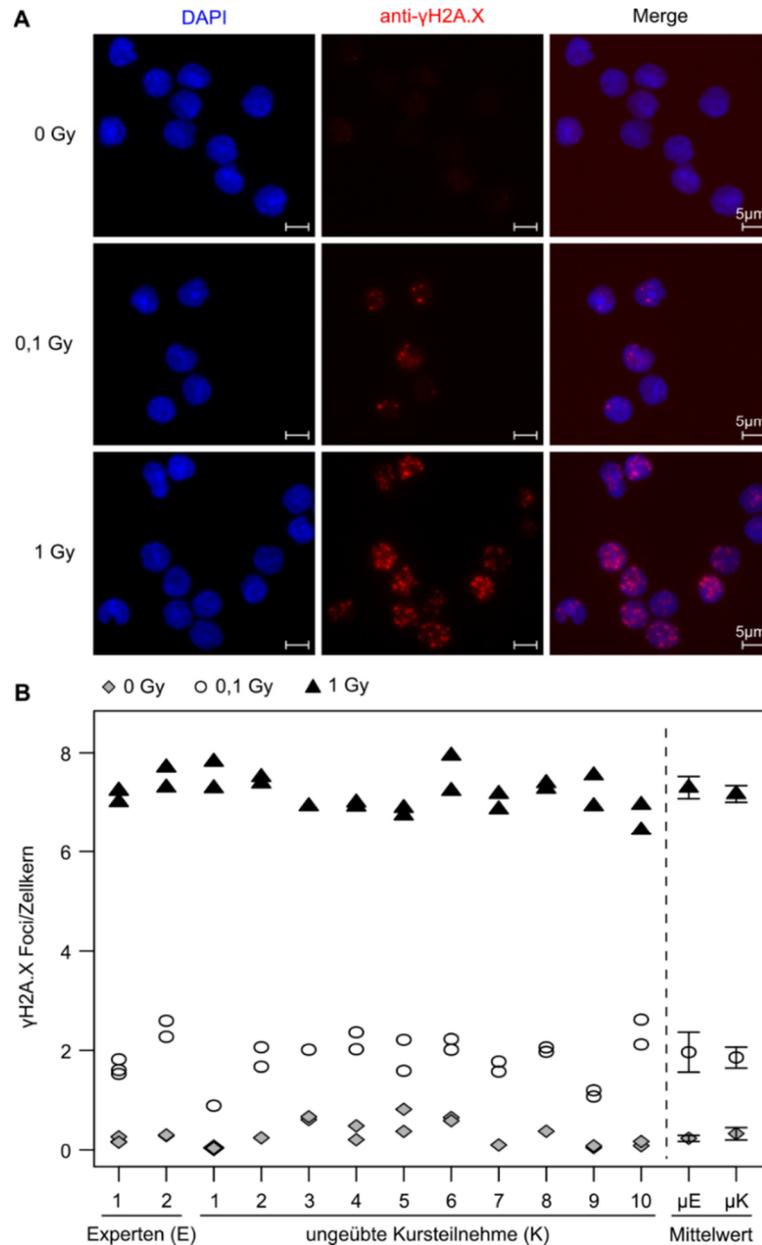
Für eine Hochdurchsatzanalyse von Proben in molekular-epidemiologische Studien kann neben der semi-automatischen Auswertung von Präparaten oder der Einlagerung von biologischen Proben die Laborkapazität erhöht werden, indem unerfahrene Mitarbeiter die Präparation von Objektträgern für die semi-automatische Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Foci oder in die manuelle Auswertung von  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci eingebunden werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden im *International Journal of Radiation Biology* (Bucher, Duchrow, et al. 2020) veröffentlicht.

#### **Ungeübte Mitarbeiter können die Präparation von Objektträgern und die Immunfluoreszenzfärbung von $\gamma$ H2A.X unterstützen**

Zehn Teilnehmern eines Trainingskurses, die keine praktische Erfahrung mit der Reparaturfoci-Analyse hatten, wurden gebeten unter Anleitung von zwei erfahrenen Mitarbeitern bestrahlte und frisch isolierte Lymphozyten ( $\gamma$ -Strahlung: 0, 0,1 und 1 Gy) auf Objektträger zu zentrifugieren und eine Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2A.X durchzuführen (Kapitel 3.2.1, 3.2.3 und 3.2.7). Im Mittel wurden in der semi-automatischen Analyse 69 Objektträger mit 1952 Zellen pro Objektträger analysiert (Abbildung 25A).

Während bei den Objektträgern der beiden Experten eine leicht höhere Foci Anzahl für 0,1 Gy (1,96 vs. 1,86 Foci/Zellkern) und 1 Gy (7,3 vs. 7,17) im Vergleich zu den Kursteilnehmern quantifiziert wurde, zeigten die unbestrahlten Proben der Kursteilnehmer ein höheres Basalniveau (0,33 vs. 0,23 Foci/Zellkern). In allen Fällen lag die mittlere Foci Anzahl der Objektträger der Experten im 95 %igen Konfidenzintervall der Kursteilnehmer, und umgekehrt, und zeigte, dass die Differenz zwischen Experten und Kursteilnehmern nicht signifikant (im Signifikanzniveau von 5 %) ist (Abbildung 25B). Im Gegensatz dazu wurde zwischen jedem Dosispunkt ein dreifacher Unterschied in der Foci Anzahl von Objektträgern von Experten und Kursteilnehmern ermittelt. Es wurde keine Überlappung der 95 %igen Konfidenzintervalle festgestellt, sodass die Bestrahlungsdosen bei Experten und Kursteilnehmer signifikant (im Signifikanzniveau von 5 %) unterschieden werden konnten (Abbildung 25B, Tabelle Anhang 9). Die Quantifizierung von zwei technischen Replikaten jeder Probe zeigte bei Experten und Kursteilnehmern eine hohe Reproduzierbarkeit.

Nichtsdestotrotz wurden Unterschiede in der Qualität der Objektträger beobachtet. Objektträger von unerfahrenen Kursteilnehmern wiesen eine geringere Zellzahl, Verklumpungen von Zellen, Kratzer oder Löcher im Zellrasen und Luftblasen zwischen Objektträger und Deckglas auf.

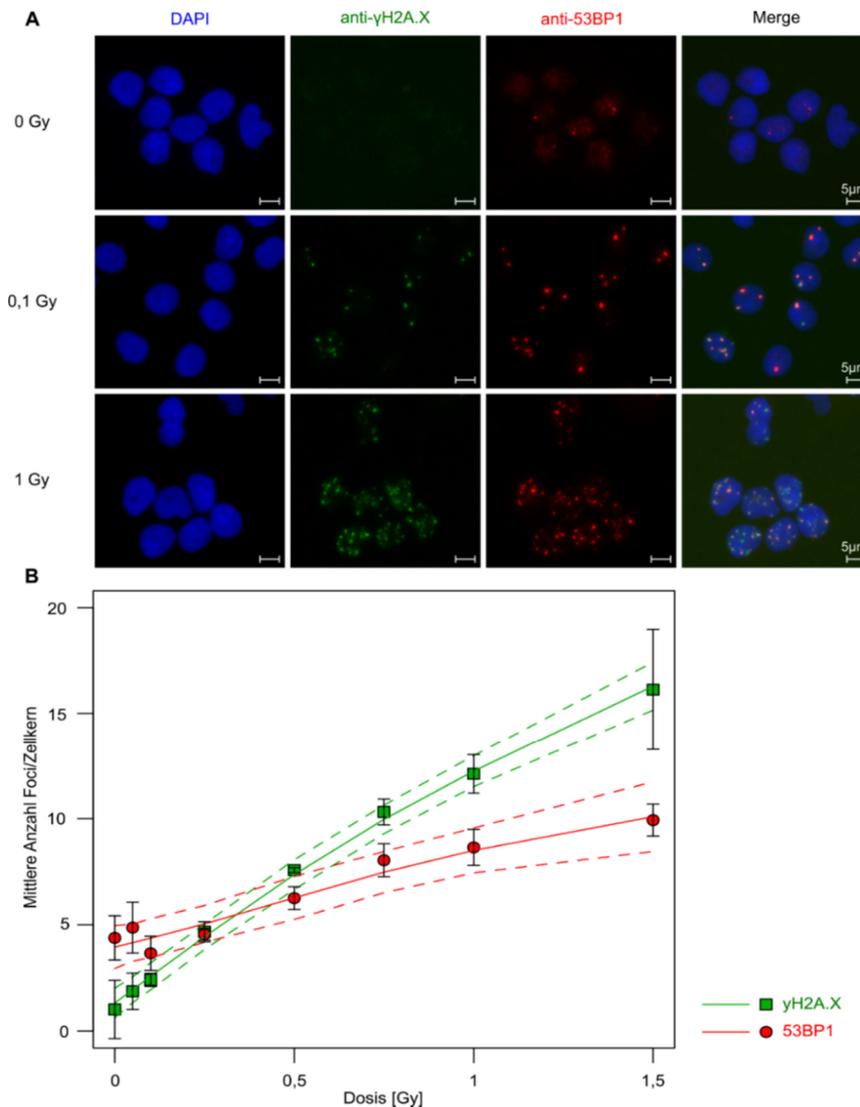


**Abbildung 25.** Semi-automatisch Analyse von  $\gamma$ H2A.X Foci auf Objektträgern von ungeübten Kursteilnehmern und Experten.

Unbestrahlte und mit 0,1 und 1 Gy bestrahlte Zellen wurden 1 h nach Bestrahlung fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung für  $\gamma$ H2A.X von zwei erfahrenen Mitarbeitern und 10 ungeübten Kursteilnehmern durchgeführt. **A**) Mikroskopaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2A.X (Foci in rot) in Zellkernen von Lymphozyten (blau) nach verschiedenen Bestrahlungsdosen. Maßstabsbalken entspricht 5  $\mu$ m bei 40x Vergrößerung. **B**) Die Mittlere Anzahl von  $\gamma$ H2A.X Foci wurde für die einzelnen Objektträger und Kursteilnehmer mittels semi-automatischer Analyse für 0 (graue Raute), 0,1 (weißer Kreis) und 1 Gy (schwarzes Dreieck) ermittelt. Kursteilnehmer präparierten auswertbare und mit den Experten vergleichbare Objektträger für die Foci Analyse. Der Mittelwert der Objektträger von erfahrenen Mitarbeitern ( $\mu$ E) und ungeübten Kursteilnehmern ( $\mu$ K) wurde mit dem 95%igen Konfidenzintervall berechnet. Der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes innerhalb eines Objektträgers ist in Tabelle Anhang 9 aufgeführt.

### Ungeübte Mitarbeiter können die manuelle Foci Quantifizierung von $\gamma$ H2A.X und 53BP1 unterstützen

Nach einer kurzen Einweisung wurde die Anzahl der induzierten  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und kolokalisierten  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci einer Dosis-Effekt-Kurve (Röntgenstrahlung: 0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 und 1,5 Gy) von 16 Kursteilnehmern bestimmt. Die verblindete, manuelle Quantifizierung erfolgte an Bilddateien von präparierten und aufgenommenen Objektträgern. Die Foci Anzahl jedes Dosispunktes wurde insgesamt 4-mal von Kursteilnehmern und 1-mal von einem erfahrenen Mitarbeiter quantifiziert.



**Abbildung 26.** Semi-automatische Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 Foci für manuelle Auswertung.

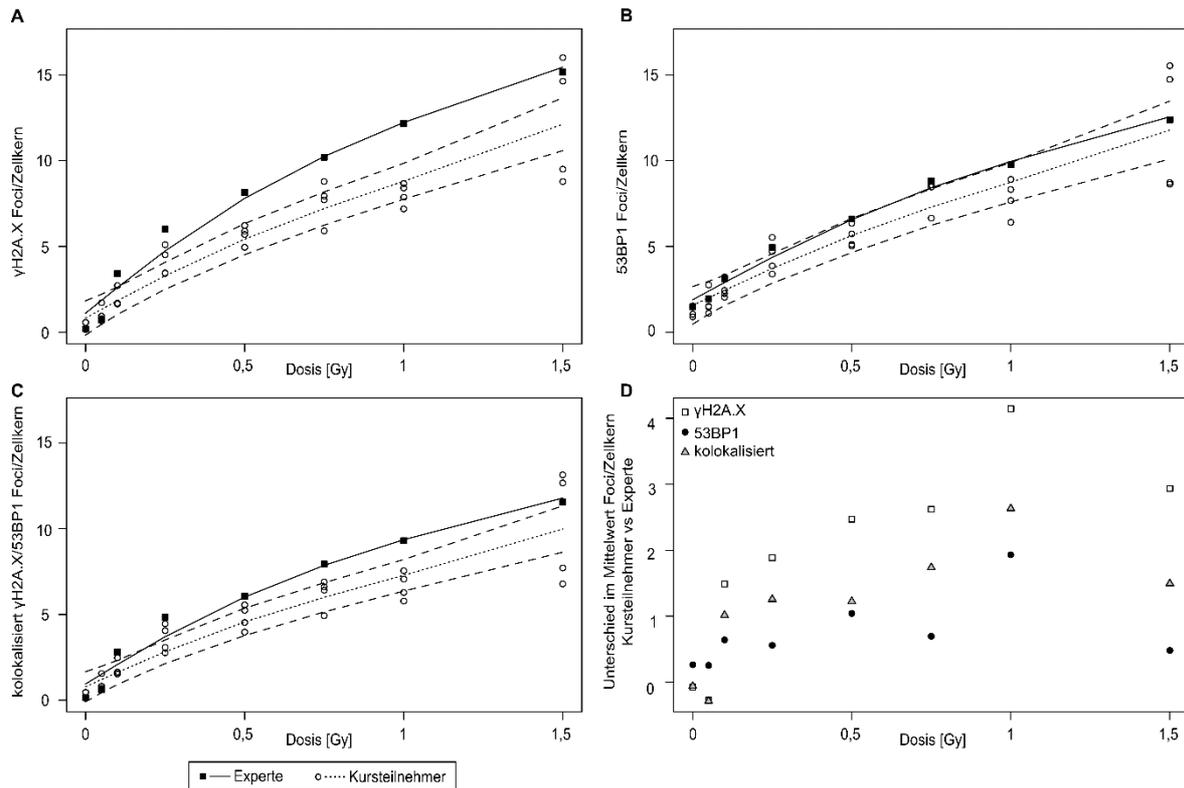
Unbestrahlte und bestrahlte Zellen wurden 1 h nach Bestrahlung fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung für  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 von erfahrenen Mitarbeitern durchgeführt. **A)** Mikroskopaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2A.X (Foci in grün) und 53BP1 (Foci in rot) in Zellkernen von Lymphozyten (blau) nach verschiedenen Bestrahlungsdosen. Maßstabsbalken entspricht 5  $\mu$ m bei 40x Vergrößerung. **B)** Mittlere Anzahl der  $\gamma$ H2A.X Foci (grün) und 53BP1 Foci (rot) von drei technischen Replikaten. In der Analyse wurde ein Dosis-Effekt für beide Proteine beobachtet. Der Mittelwert wurde zusammen mit dem 95%igen Konfidenzintervall von allen Replikaten ermittelt und zusammen mit der *Spline* Regression (durchgezogene Linie) und dem 95% Konfidenzband (gestrichelte Linie) dargestellt.

Um die Qualität der auszuwertenden Präparate zu kontrollieren, wurden die Objektträger zunächst semi-automatisch analysiert. Dabei wurden in mindestens drei technischen Replikaten im Mittel 1506 Zellen pro Objektträger ausgewertet (Abbildung 26A). Für  $\gamma$ H2A.X wurde eine Dosis-Effekt-Kurve mit einem signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen 0 Gy und  $\geq 0,1$  Gy beobachtet (Abbildung 26B). Für 53BP1 wurde in unbestrahlten Lymphozyten ein diffuses Signal und vereinzelt Foci festgestellt (Abbildung 26A, 26B). Nach Bestrahlung wurde zunächst eine Abnahme der mittleren Foci Anzahl pro Zellkern beobachtet und anschließend ab 0,1 Gy ein dosisabhängiger Anstieg. Die Foci Anzahl  $\geq 0,5$  Gy konnte signifikant von 0 Gy unterschieden werden ( $p < 0,01$ ).

In der manuellen Foci Zählung von  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und kolokalisierten Foci ermittelten die Teilnehmer und der Experte eine dosisabhängige Zunahme der Foci Anzahl (Abbildung 27A-C, Tabelle Anhang 10). Dabei war die Anzahl kolokalasierter  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci geringer im Vergleich zu einer Einzelzählung von  $\gamma$ H2A.X oder 53BP1. Im Vergleich zur semi-automatischen Quantifizierung wurde in der manuellen Foci Zählung das Basallevel von  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 Foci reduziert (Zählung des Experten//Zählung der Teilnehmer,  $\gamma$ H2A.X: 1,02 vs. 0,19/0,26 Foci/Zellkern und 53BP1: 4,39 vs. 1,48/1,22 Foci/Zellkern). Während ungeübte Mitarbeiter einen dreifachen Unterschied in der Foci Anzahl für alle Dosispunkte  $\geq 0,1$  Gy bei  $\gamma$ H2A.X,  $\geq 0,5$  Gy bei 53BP1 und  $\geq 0,1$  Gy bei kolokalisierten Foci im Vergleich zu 0 Gy zählten, ermittelte der Experte diesen Unterschied für alle Dosispunkte  $\geq 0,05$  Gy bei  $\gamma$ H2A.X,  $\geq 0,25$  Gy bei 53BP1 und  $\geq 0,05$  Gy bei kolokalisierten Foci. Eine signifikant unterschiedliche Foci Anzahl wurde bei ungeübten Kursteilnehmer bei 0 und 0,05 Gy für  $\gamma$ H2A.X in 2 von 8 Fällen ( $p < 0,01$ ), für 53BP1 in 5 von 8 Fällen ( $p < 0,05$ ) und für kolokalisierte Foci in 2 von 8 Fällen ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Zählung des Experten ermittelt.

Bei allen Dosispunkten  $\geq 0,1$  Gy wurde für  $\gamma$ H2A.X in 22 von 24 Fällen ( $p < 0,001$ ), für 53BP1 in 18 von 24 Fällen ( $p < 0,05$ ) und für kolokalisierte Foci in 24 von 24 Fällen ( $p < 0,05$ ) ein signifikanter Unterschied in der Quantifizierung zwischen ungeübten Mitarbeitern und dem Experten festgestellt.

Zusätzlich beinhaltet das Konfidenzband der Regressionslinie der Foci Zählung von ungeübten Kursteilnehmern nicht die Regressionslinie der Zählung des Experten für alle Dosispunkte  $\geq 0,1$  Gy (sechs Dosispunkte) für  $\gamma$ H2A.X, für die Dosispunkte 0,25 Gy und 0,5 Gy (zwei Dosispunkte) für 53BP1 und für alle Dosispunkte  $\geq 0,25$  Gy (fünf Dosispunkte) für kolokalisierte Foci. Der Unterschied in der mittleren Foci Anzahl zwischen der Zählung des Experten und der Teilnehmer war für 53BP1 im Vergleich zu  $\gamma$ H2A.X am höchsten bei 0 und 0,05 Gy und am niedrigsten  $\geq 0,1$  Gy (Abbildung 27D). Der Unterschied in der Zählung von kolokalisierten  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci lag zwischen dem Unterschied von  $\gamma$ H2A.X und 53BP1.



**Abbildung 27.** Manuelle Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und kolokalisierten  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci durch ungeübte Kursteilnehmer.

**A-C)** Die Anzahl der Foci pro Zellkern wurde in 100 Zellen pro Dosispunkt durch einen Experten (schwarze Vierecke) und Kursteilnehmern (weiße Kreise) bestimmt. Die Mittelwerte wurden zusammen mit der *Spline* Regression und dem 95% Konfidenzband (gestrichelte Linie) für  $\gamma$ H2A.X (**A**), 53BP1 (**B**) und kolokalisierte  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci bestimmt (**C**). Unerfahrene Kursteilnehmer ermittelten in der manuellen Zählung einen dosisabhängigen Anstieg der Foci Anzahl. **D)** Der Unterschied im Mittelwert der Foci Zählung von Experten und Kursteilnehmern wurde für  $\gamma$ H2A.X (weiße Vierecke), 53BP1 (schwarze Kreise) und kolokalisierte Foci (graue Dreiecke) ermittelt. Die Mittelwerte gezählter Foci/Zellkern mit dem Standardfehler des Mittelwertes jedes Objektträgers ist in Tabelle Anhang 10 aufgeführt.

Zusammenfassend wurden durch unerfahrene Kursteilnehmer unter Anleitung von erfahrenen Mitarbeitern auswertbare Objektträger hergestellt, bei denen in der semi-automatischen Quantifizierung ein signifikanter Dosis-Unterschied für  $\gamma$ H2A.X ermittelt wurde. Zusätzlich wurde durch ungeübte Kursteilnehmer in der manuellen Zählung von  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 oder kolokalisierten  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci ein Dosis-Effekt ermittelt, wobei Proben mit niedriger Bestrahlungsdosis von unbestrahlten Proben unterschieden werden konnten.

### **4.3 Nachweis einer chronischen Strahlenexposition**

Während die Analyse von  $\gamma$ H2A.X Foci im Gegensatz zur Analyse von Chromosomenaberrationen keine eindeutigen Ergebnisse zum Nachweis einer genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit lieferte, wurde in den vorangegangenen Untersuchungen die semi-automatische Reparaturfoci-Analyse erweitert und für  $\gamma$ H2A.X, 53BP1, MDC1 und pKAP1 in kryokonservierten Lymphozyten etabliert. Mit der Verwendung von kryokonservierten Lymphozyten und der Einbindung von ungeübten Mitarbeitern in die RIF Analyse konnten zwei Möglichkeiten aufgezeigt werden, wie zukünftig große Untersuchungskollektiv mit einer Vielzahl von Proben untersucht werden könnten. Daher wurde die Anwendung der etablierten RIF Analyse im Rahmen einer molekular-epidemiologischen Untersuchung zum Nachweis einer chronischen Strahlenexposition bei ehemaligen Wismut Bergarbeitern evaluiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob ein Nachweis einer chronischen Strahlenexposition aufgrund einer potenziell erhöhten Rate an Chromosomenaberrationen möglich ist.

#### **4.3.1 Charakterisierung des Untersuchungskollektivs der Wismut Bergarbeiter**

Die Validierung der Biomarker erfolgte in einem Kollektiv von 106 ehemaligen Wismut Uranbergarbeitern aus der Deutschen Uranbergarbeiter Biobank. Bei diesen Bergarbeitern handelt es sich um männliche Probanden in einem Alter zwischen 71 und 87 Jahre (Median 77 Jahre) mit verschiedenen Tätigkeitsprofilen in der ehemaligen SDAG Wismut. Aufgrund dieser verschiedenen Tätigkeiten waren die Arbeiter unterschiedlich stark gegenüber externer Gamma-Strahlung, Radionukliden und Radon exponiert (Tabelle 7). Im Mittel betrug die ungewichtete absorbierte Gesamtorgandosis auf das rote Knochenmark der hier untersuchten Individuen 0,22 Gy (0,00 bis 0,60 Gy) und die kumulative Radonbelastung 922,1 WLM (0,1 bis 2478,5 WLM). Diese Angaben beruhen auf Expositionsabschätzungen aus der Job-Expositionsmatrix. In den durchgeführten Untersuchungen wurde der Einfluss der Expositionshöhe bei den ehemaligen Wismut Bergarbeitern auf Grundlage dieser Angaben untersucht.

Neben einer kontinuierlichen Analyse wurden die Individuen ebenfalls nach der Höhe der absorbierten Gesamtorgandosis gruppiert: 1) niedrige Gesamtorgandosis auf das rote Knochenmark (RBM Dosis)  $<0,03$  Gy (17 Individuen) 2) moderate RBM Dosis zwischen 0,03 und 0,17 Gy (35 Individuen) und 3) hohe RBM Dosis  $>0,17$  Gy (54 Individuen). In Bezug auf die Radonexposition wurden die Bergarbeiter ebenfalls gruppiert: 1) niedrige kumulative Radonexposition mit  $<50$  WLM (18 Individuen) und 2) hohe kumulative Radonexposition mit  $>300$  WLM (88 Individuen).

Die Probengewinnung erfolgte rund 20 Jahre nach Betriebsende der SDAG Wismut zwischen dem 04. März 2009 und dem 24. August 2011. Bereits zum Zeitpunkt der Betriebsschließung waren viele der beprobten Bergarbeiter nicht mehr in der SDAG Wismut aktiv. Zum Zeitpunkt der Probengewinnung gaben die Mehrheit der ehemaligen Bergarbeiter (69,8 %) den Status Ex-Raucher an. Vier Probanden waren aktive Raucher und 28 gaben an noch nie geraucht zu haben. Die ehemaligen Bergarbeiter gaben zudem eine Reihe von (Vor-)Erkrankungen an. Dabei waren die untersuchten Bergarbeiter bereits zu einem früheren Zeitpunkt oder aktuell am häufigsten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (65,1 %), wie Bluthochdruck oder Herzinfarkten, betroffen. Mehr als die Hälfte der Probanden (53,8 %) gaben an früher oder aktuell an Erkrankungen der Atemwege, wie Lungenentzündungen, chronische Bronchitis Silikosen, Emphysemen, Tuberkulose oder Asthma, zu leiden. Bei 16 % der Individuen wurde in der Vergangenheit bereits eine Krebserkrankung diagnostiziert und ein Proband hatte vier Jahre vor der Probengewinnung eine Strahlentherapie erhalten.

**Tabelle 7.** Übersicht des untersuchten Untersuchungskollektives der Wismut Bergarbeiter.

Aus der Deutschen Uranbergarbeiter Biobank wurden biologische Proben von 106 Individuen ausgewählt und mittels semi-automatischer RIF-Analyse und mFISH Analyse untersucht. Angegeben sind das Alter zum Zeitpunkt der Probengewinnung, die abgeschätzte, ungewichtete absorbierte Gesamtorgandosis auf das rote Knochenmark (RBM) und die abgeschätzte kumulative Radonbelastung. Außerdem wurden der Rauchstatus, bekannte Erkrankungen und kürzlich erfolgte medizinische Strahlenanwendungen zum Zeitpunkt der Probengewinnung erfasst.

Wismut Bergarbeiter		
	Mittelwert	Bereich
Alter [Jahre]	77	71-87
absorbierte Gesamtorgandosis [Gy]	0,22	0,00-0,60
kumulative Radonbelastung [WLM]	922,1	0,1-2478,5
-----		
	Anzahl	Anteil am Kollektiv [%]
Rauchstatus		
Nie-Raucher	28	26,4
Ex-Raucher	74	69,8
Raucher	4	3,8
Erkrankungen		
Herz-Kreislauf Erkrankungen	69	65,1
Atemwegs-Erkrankungen	57	53,8
Diabetes Mellitus	31	29,2
Krebserkrankungen	17	16,0
medizinische Strahlenanwendung		
Röntgenuntersuchung in den letzten 12 Monaten	52	49,1
Strahlentherapie	1	0,9

Bei 52 % der untersuchten Bergarbeiter wurde in den letzten 12 Monaten eine Röntgenuntersuchung zu diagnostischen Zwecken durchgeführt (Tabelle 7). Von allen Probanden wurde humanes Vollblut gewonnen und Präparate zur Chromosomenanalyse angefertigt (Kapitel 3.2.4) oder Lymphozyten isoliert und bis zur weiteren Verwendung kryokonserviert (Kapitel 3.2.1).

#### **4.3.2 Untersuchung der DNA-Reparatur in biologischen Proben von Wismut-Bergarbeitern mittels semi-automatischer RIF Analyse**

Aufgrund der lang zurückliegenden, chronischen Strahlenexposition von mindestens 20 Jahren und der kurzen Halbwertszeit von Reparaturfoci Signalen nach Strahlenexposition von Stunden bis Tagen, wurden in den durchgeführten Untersuchungen die indirekten Effekte einer vergangenen Exposition untersucht. Hierzu wurden kryokonservierte Lymphozyten der ehemaligen Bergarbeiter aufgetaut (Kapitel 3.2.2), *in vitro* bestrahlt (Röntgenstrahlung: 0, 1 und 4 Gy; Kapitel 3.2.3) und die Signalisierung und Reparatur von DSB (1, 4 und 8 h) mittels zuvor etablierter semi-automatischer RIF Analyse (Doppelfärbung  $\gamma$ H2A.X mit pKAP1 und 53BP1 mit MDC1) untersucht (Kapitel 3.2.7 und 4.2.1). Es wurde die mittlere Anzahl Foci pro Zelle mit der abgeschätzten Exposition der Bergarbeiter korreliert.

Nach einer Qualitätskontrolle wurden einzelne Objektträger von 47 Probanden mit Abweichungen im Färbe- oder Messprotokoll, schlechter Färbequalität, auffälliger Zellmorphologie, weniger als 500 auswertbaren Zellen oder unscharfen, falsch fokussierten Bereiche von der Analyse ausgeschlossen. In 21 von 33 Versuchen wurden ebenfalls kryokonservierte Lymphozyten eines gesunden Spenders als eine interne Kontrolle (P93) für die Zellkultur, Bestrahlung, Immunfluoreszenzfärbung und Messung mitgeführt. Bei 36 von 47 Probanden war weiteres Probenmaterial vorhanden, sodass die Analyse wiederholt werden konnte. Die Proben von 11 Probanden musste hingegen von der Analyse komplett ausgeschlossen werden. Insgesamt wurden für  $\gamma$ H2A.X 893.102 Zellen auf 681 Objektträgern (1311 Zellen/Objektträger), für 53BP1 774.324 Zellen auf 567 Objektträgern (1365 Zellen/Objektträger) und für pKAP1 883.592 Zellen auf 673 Objektträgern (1312 Zellen/Objektträger) analysiert.

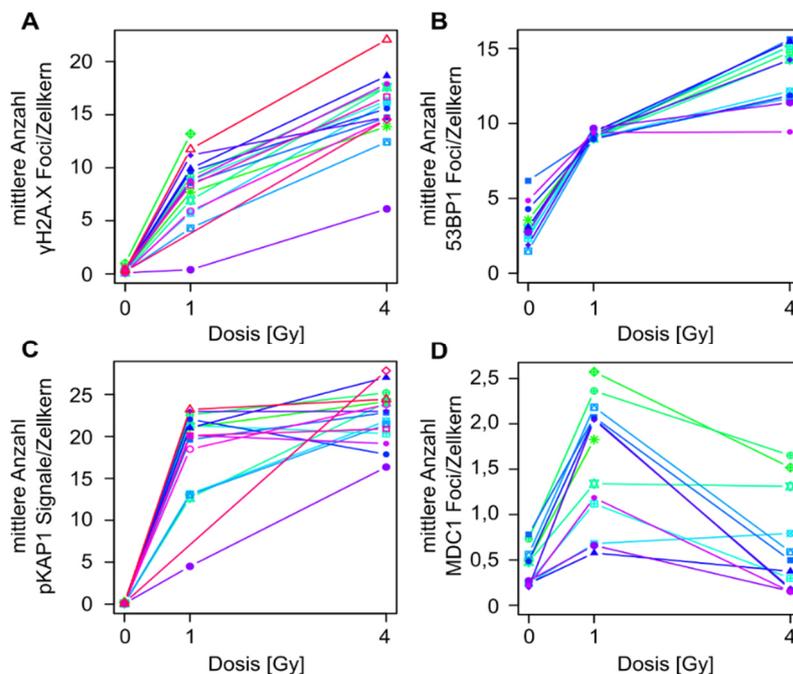
#### **Interne Kontrolle zeigte interexperimentelle Variation in Abhängigkeit der untersuchten RIF**

Trotz der Verwendung einer semi-automatischen RIF Analyse mussten die Untersuchungen aufgrund der großen Probandenanzahl auf 33 einzelne Versuche aufgeteilt werden. Zunächst wurde daher die Varianz zwischen einzelnen Versuchen anhand einer internen Kontrolle untersucht (17 Versuche für  $\gamma$ H2A.X und pKAP1; 12 Versuche für 53BP1 und MDC1). In den ausgewerteten Versuchen wurde für die interne Kontrolle eine dosisabhängige Zunahme in der Foci Anzahl für  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und pKAP1 pro Zellkern festgestellt (Abbildung 28).

In der Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Foci wurden interexperimentelle Unterschiede beobachtet, die mit steigender Dosis abnahmen (0 Gy: 0,32 Foci/Zellkern, Interquartilsabstand normalisiert (IQA): 0,53; 1 Gy: 8,14 Foci/Zellkern, IQA: 0,35; 4 Gy 15,61 Foci/Zellkern, IQA: 0,19), wobei in allen Versuchen ein dosisabhängiger Anstieg in der Foci Anzahl ermittelt werden konnte (Abbildung 28A). Die Anzahl der  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern aus der hier durchgeführten Analyse war im Vergleich zur zuvor etablierten Dosis-Effekt-Kurve für 0 Gy und 1 Gy geringer (0Gy: 0,32 vs. 0,66 Foci/Zellkern; 1Gy: 8,14 vs. 10,92 Foci/Zellkern).

Die interexperimentelle Variation bei 53BP1 war nach 0 Gy (3,25 Foci/Zellkern, IQA: 0,42) und 4 Gy (13,56 Foci/Zellkern, IQA 0,23) höher im Vergleich zu  $\gamma$ H2A.X und für 1 Gy niedriger (Abbildung 28B; 9,21 Foci/Zellkern, IQA 0,04). Die Anzahl der 53BP1 Foci pro Zellkern aus der hier durchgeführten Analyse war für 0 und 1 Gy ebenfalls geringer im Vergleich zur zuvor etablierten Dosis-Effekt-Kurve (0Gy: 3,25 vs. 4,43 Foci/Zellkern; 1Gy: 9,21 vs. 10,18 Foci/Zellkern).

Für pKAP1 wurde bereits nach 1 Gy eine Sättigung in der Dosis-Effekt-Kurve beobachtet und in einigen Versuchen kam es zu einer Abnahme in der Signalanzahl pro Zellkern mit steigender Dosis von 1 auf 4 Gy (Abbildung 28C). Die ermittelten interexperimentellen Unterschiede nahmen mit steigender Dosis ab (0 Gy: 0,13 Signal/Zellkern, IQA: 0,45; 1 Gy: 18,59 Signal/Zellkern, IQA: 0,22; 22,51 Signal/Zellkern, IQA 0,15). Die Anzahl der pKAP1 Signale aus der hier durchgeführten Analyse entsprach den Werten aus der zuvor etablierten Dosis-Effekt-Kurve (0Gy: 0,13 vs. 0,13 Signale/Zellkern; 1Gy: 18,59 vs. 18,93 Signale/Zellkern).



**Abbildung 28.** Interexperimentelle Variation in der semi-automatischen RIF Quantifizierung.

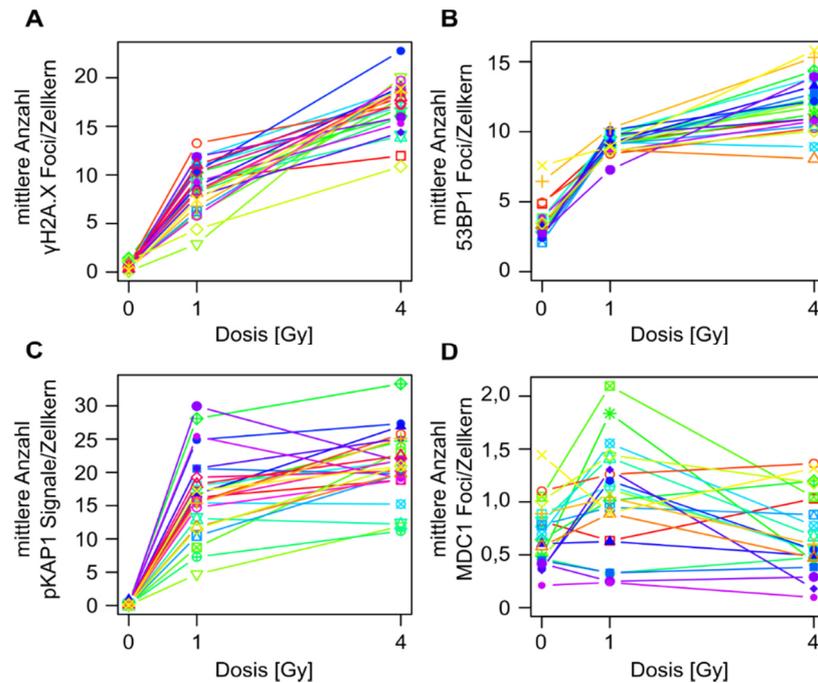
**A-C)** Die Auswertung der internen Kontrolle ergab für  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und pKAP1 eine dosisabhängige Foci Induktion. Dabei wurden interexperimentelle Schwankungen in der mittleren Foci Anzahl pro Zellkern beobachtet, die für  $\gamma$ H2A.X und pKAP1 bei 0 Gy geringer und bei 1 Gy höher waren im Vergleich zu 53BP1. **D)** Für MDC1 wurde kein einheitlicher Dosis-Effekt beobachtet. Dargestellt sind die mittlere Foci Anzahl pro Zellkern der einzelnen Versuche für die interne Kontrolle.

In der Quantifizierung von MDC1 Foci wurden erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen festgestellt (Abbildung 28D; 0 Gy: 0,41 Foci/Zellkern, IQA: 0,72; 1 Gy: 1,59 Foci/Zellkern, IQA: 0,52; 4 Gy 0,71 Foci/Zellkern, IQA: 2,27). Zusätzlich lag die Anzahl der MDC1 Foci pro Zellkern nach Bestrahlung unter den Werten aus der etablierten Dosis-Effekt-Kurve (1Gy: 1,59 vs. 3,99 Foci/Zellkern).

### **Signalisierung und Reparatur von DSB ist mittels semi-automatischer RIF Analyse in kryokonservierten Lymphozyten der Wismut Bergarbeiter nachweisbar**

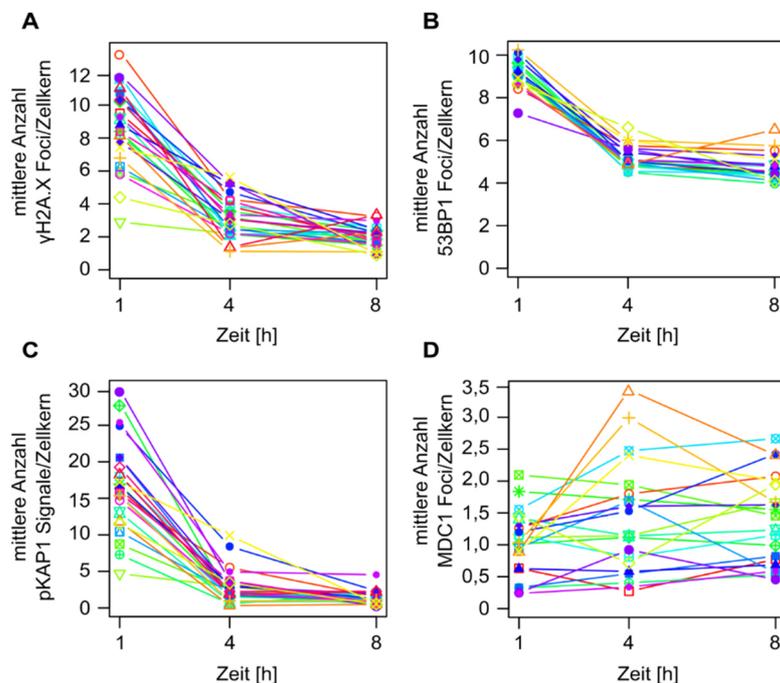
Aufgrund der großen Anzahl an Versuchen und der bereits zuvor erwarteten interexperimentellen Unterschiede wurde im ursprünglichen Versuchsdesign die Expositionshöhe auf Grundlage der absorbierten Gesamtdosis berücksichtigt. Die Probanden wurden anhand ihrer RBM Dosis randomisiert in vier Gruppen eingeteilt und für jeden Versuch wurde ein Proband aus einer dieser vier Gruppen zufällig bestimmt. Damit wurden in den durchgeführten Versuchen jeweils vier ehemalige Wismut Bergarbeiter untersucht (Abbildung Anhang 14).

In jedem ausgewerteten Versuch wurde im Mittel ein dosisabhängiger Anstieg (Abbildung 29) und eine zeitabhängige Abnahme (Abbildung 30) in der Foci Anzahl für  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und pKAP1 ermittelt. Dabei wurden ebenfalls, wie bei der Auswertung der internen Kontrolle, interexperimentelle Unterschiede beobachtet, die für  $\gamma$ H2A.X und pKAP1 bei 0 Gy geringer und bei 1 Gy höher waren im Vergleich zu 53BP1 (Abbildung 29A-C; 30A-C). Für pKAP1 wurde ebenfalls eine Sättigung der Dosis-Effekt-Kurve  $\geq 1$  Gy festgestellt (Abbildung 29C). Für MDC1 wurde eine sehr geringe Foci Anzahl pro Zellkern nach Bestrahlung quantifiziert (Abbildung 29D), kein Reparatoreffekt beobachtet (Abbildung 30D) und ebenfalls interexperimentelle Schwankungen erfasst. Auf Grundlage der Qualitätskontrolle und der erhaltenen Ergebnisse der semi-automatischen Analyse wurden die Messdaten für MDC1 aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Nach einem Wechsel der LOT Nummer des Antikörpers konnten die aus der Etablierung erhaltenen Beobachtungen und Ergebnisse nicht mehr reproduziert werden.



**Abbildung 29.** Dosis-Effekt in der Induktion von RIF bei ehemaligen Wismut Bergarbeitern.

**A-C)** Für  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und pKAP1 wurde ein dosisabhängiger Anstieg in der Foci Anzahl in allen ausgewerteten Versuchen (jede Farbe entspricht einem Versuch) beobachtet. **D)** Dieser Dosis-Effekt wurde nicht für MDC1 beobachtet. Für alle untersuchten RIF wurden interexperimentelle Unterschiede erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren Foci Anzahl pro Zellkern der einzelnen Versuche. In jedem Versuch wurden kryokonservierte Lymphozyten von maximal vier zufällig ausgewählten Wismut Bergarbeiter untersucht.



**Abbildung 30.** Reparaturreffekt in der Zeitkinetik von RIF bei ehemaligen Wismut Bergarbeitern.

**A-C)** In allen ausgewerteten Versuchen (jede Farbe entspricht einem Versuch) wurde eine zeitabhängige Abnahme in der Foci Anzahl von  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und pKAP1 ermittelt. **D)** Dieser Reparaturreffekt wurde in der Auswertung von MDC1 nicht beobachtet. Für alle untersuchten RIF wurden interexperimentelle Unterschiede erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren Foci Anzahl pro Zellkern der einzelnen Versuche. In jedem Versuch wurden kryokonservierte Lymphozyten von maximal vier zufällig ausgewählten Wismut Bergarbeitern untersucht.

### Expositionshöhe der chronischen Strahlenbelastung hat scheinbar keinen Einfluss auf die Signalisierung und Reparatur von DSB

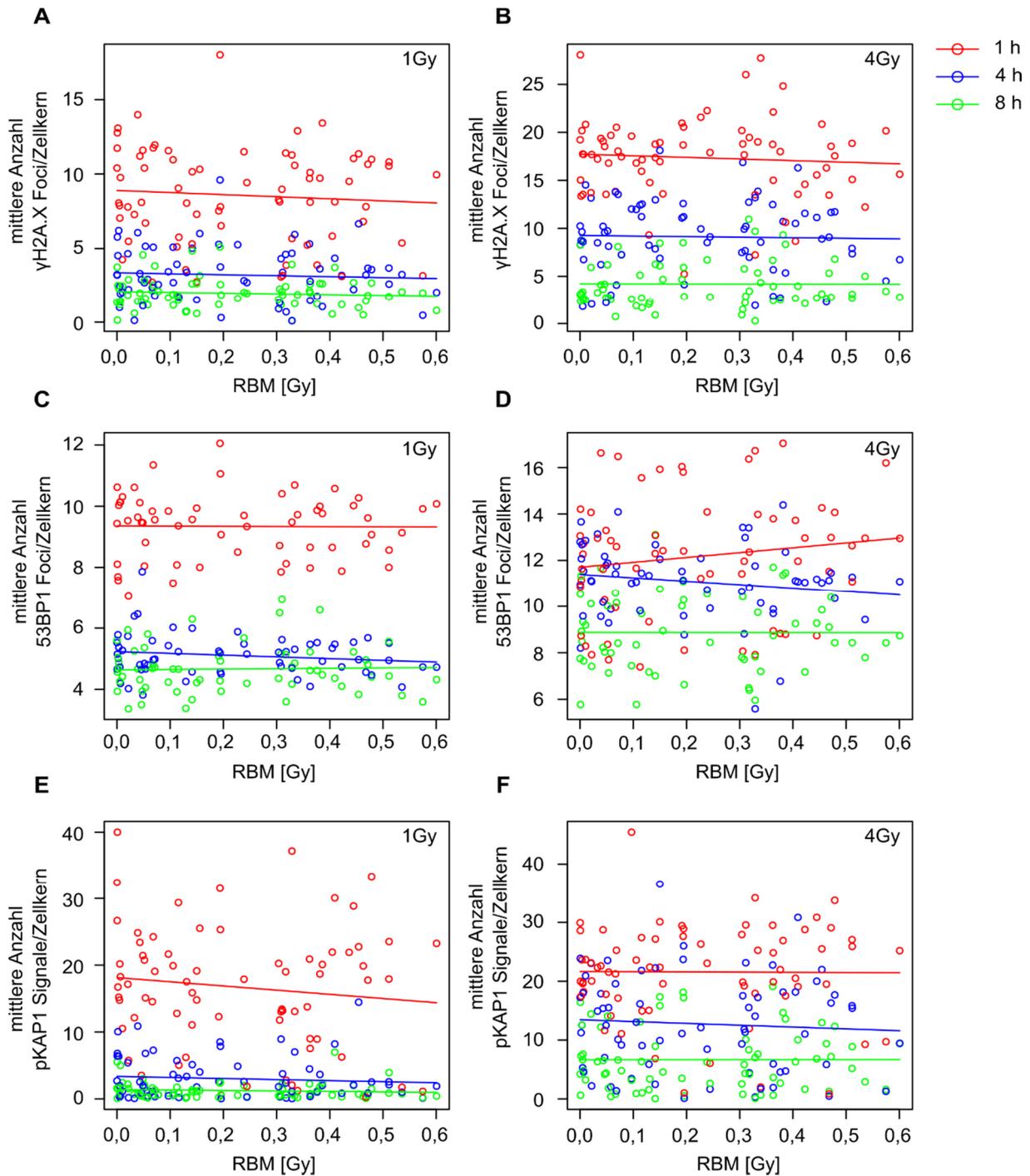
In den vorhergehenden Analysen konnte eine strahlen-induzierte und dosisabhängige Signalisierung und zeitabhängige Reparatur von DSB in Proben der ehemaligen Wismut Bergarbeiter mittels semi-automatischer RIF Analyse nachgewiesen werden. Anschließend sollte der Einfluss der Expositionshöhe bei chronischer Strahlenbelastung genauer untersucht werden.

In der Anzahl der  $\gamma$ H2A.X Foci, 53BP1 Foci oder pKAP1 Signale wurde für 1 Gy und 4 Gy für alle Zeitpunkte nach der Bestrahlung (1, 4, 8 h) kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit der absorbierten Gesamtorgandosis auf das rote Knochenmark beobachtet (Abbildung 31A-F, Tabelle 8).

**Tabelle 8.** Korrelation der semi-automatischen Quantifizierung von RIF mit Höhe der absorbierten Gesamtorgandosis von Wismut Bergarbeitern.

Die Anzahl der Foci pro Zellkern wurde nach *in vitro* Bestrahlung in mindestens 500 Zellen jedes Bergarbeiters bestimmt. Die Korrelation zwischen Foci Anzahl und absorbierten Gesamtorgandosis auf das rote Knochenmark wurde mittels Spearman's Rangkorrelation analysiert.

Reparaturfoci	Dosis [Gy]	Inkubationszeit nach Bestrahlung [h]	Korrelationskoeffizient r	P-Wert
$\gamma$ H2A.X	0	1	0,02	0,867
		1	-0,077	0,517
		4	-0,039	0,752
	4	8	-0,021	0,863
		1	-0,081	0,508
		4	-0,01	0,937
		8	0,029	0,811
53BP1	0	1	-0,013	0,918
		1	-0,03	0,819
		4	-0,11	0,397
	4	8	-0,002	0,99
		1	0,16	0,211
		4	-0,183	0,157
		8	0,027	0,84
pKAP1	0	1	-0,065	0,59
		1	-0,096	0,42
		4	-0,111	0,368
	4	8	-0,184	0,12
		1	0,063	0,607
		4	-0,082	0,501
		8	0,023	0,85



**Abbildung 31.** Korrelation der semi-automatischen Quantifizierung von RIF mit Höhe der absorbierten Gesamtdosis von Wismut Bergarbeitern.

Es wurde keine Abhängigkeit zwischen der Anzahl von **A, B**  $\gamma$ H2A.X Foci, **C, D** 53BP1 Foci oder **E, F** pKAP1 Signale und der Höhe der absorbierten Gesamtdosis auf das rote Knochenmark von ehemaligen Wismut Bergarbeitern ermittelt. Dargestellt ist die mittlere Foci/Signalanzahl nach einer *in vitro* Bestrahlung der kryokonservierten Lymphozyten mit 1 Gy (links) oder 4 Gy (rechts) und nach einer Inkubationszeit der Zellen von 1 h (rot), 4 h (blau) oder 8 h (grün). Der Zusammenhang zwischen Foci/Signalanzahl und Strahlenexposition wurde mit der Spearman's Rangkorrelation ermittelt.

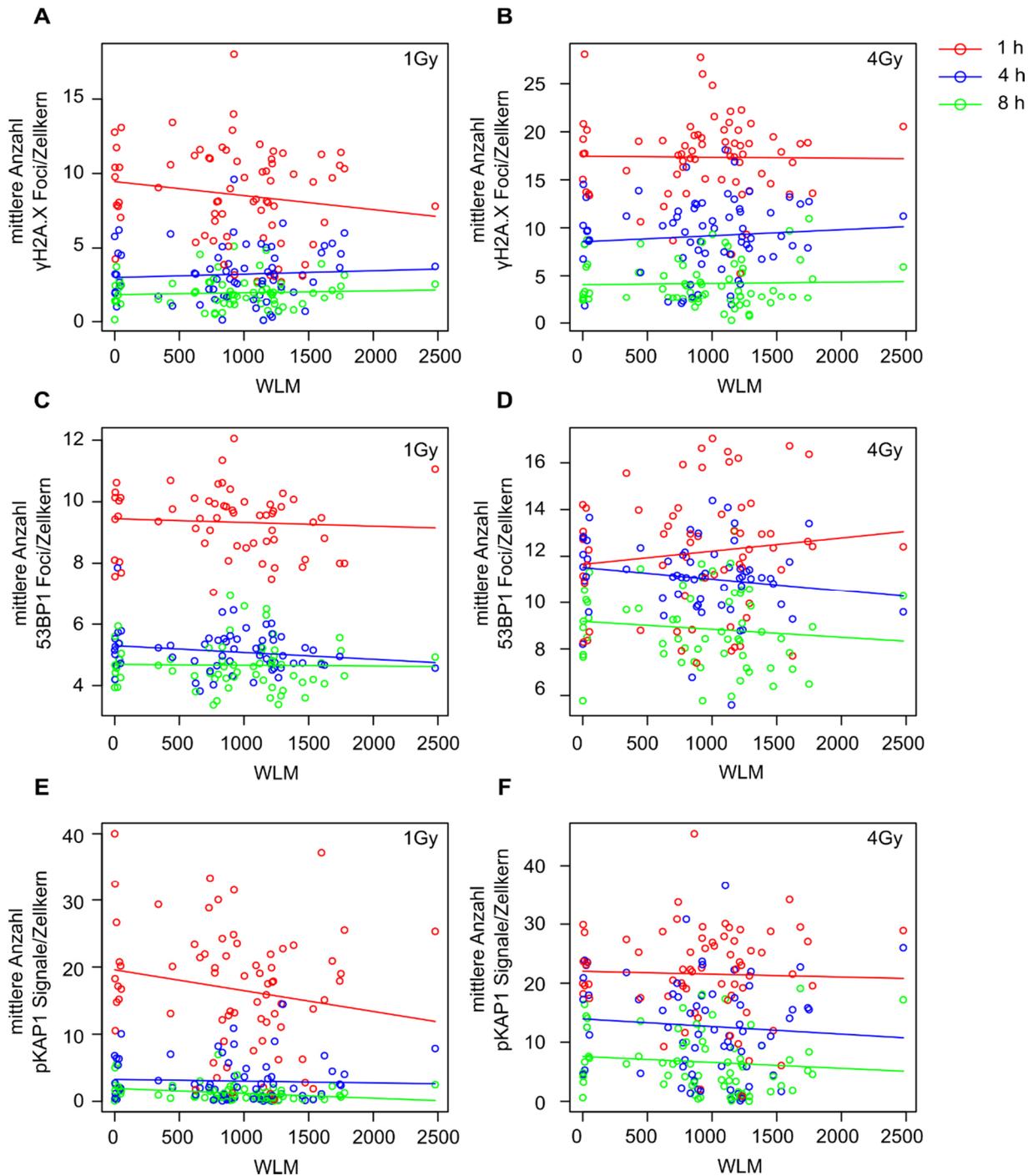
Bei Betrachtung der Foci Anzahl in Abhängigkeit der kumulativen Radonbelastung wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Foci Anzahl von  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 festgestellt (Abbildung 32A-D, Tabelle 9). Für pKAP1 wurde 8 h nach einer *in vitro* Bestrahlung mit 1 Gy eine Abnahme in der Signalanzahl mit steigender Radonbelastung ermittelt ( $r=-0,313$ ,  $p=0,007$ ) (Abbildung 32E-F, Tabelle 9).

In der Auswertung der Foci Anzahl nach gruppierter Expositionshöhe, wurden nach Bestrahlung mit 1 Gy und 4 Gy keine Unterschiede in der mittleren  $\gamma$ H2A.X Foci Anzahl mit steigender RBM Dosis (Abbildung 33A-B) oder zunehmender WLM beobachtet (Abbildung 34A-B). Im Gegensatz dazu wurde für pKAP1 8 h nach einer *in vitro* Bestrahlung mit 1 Gy eine Abnahme in der Signalanzahl mit steigender RBM Dosis ermittelt ( $p=0,04$ ) (Abbildung 33C). Mit steigender Radonbelastung wurde ebenfalls eine Abnahme in der Signalanzahl für 1 Gy und 8 h ( $p=0,01$ ) festgestellt (Abbildung 34C)

**Tabelle 9.** Korrelation der semi-automatischen Quantifizierung von RIF mit Höhe der kumulativen Radonexposition von Wismut Bergarbeitern.

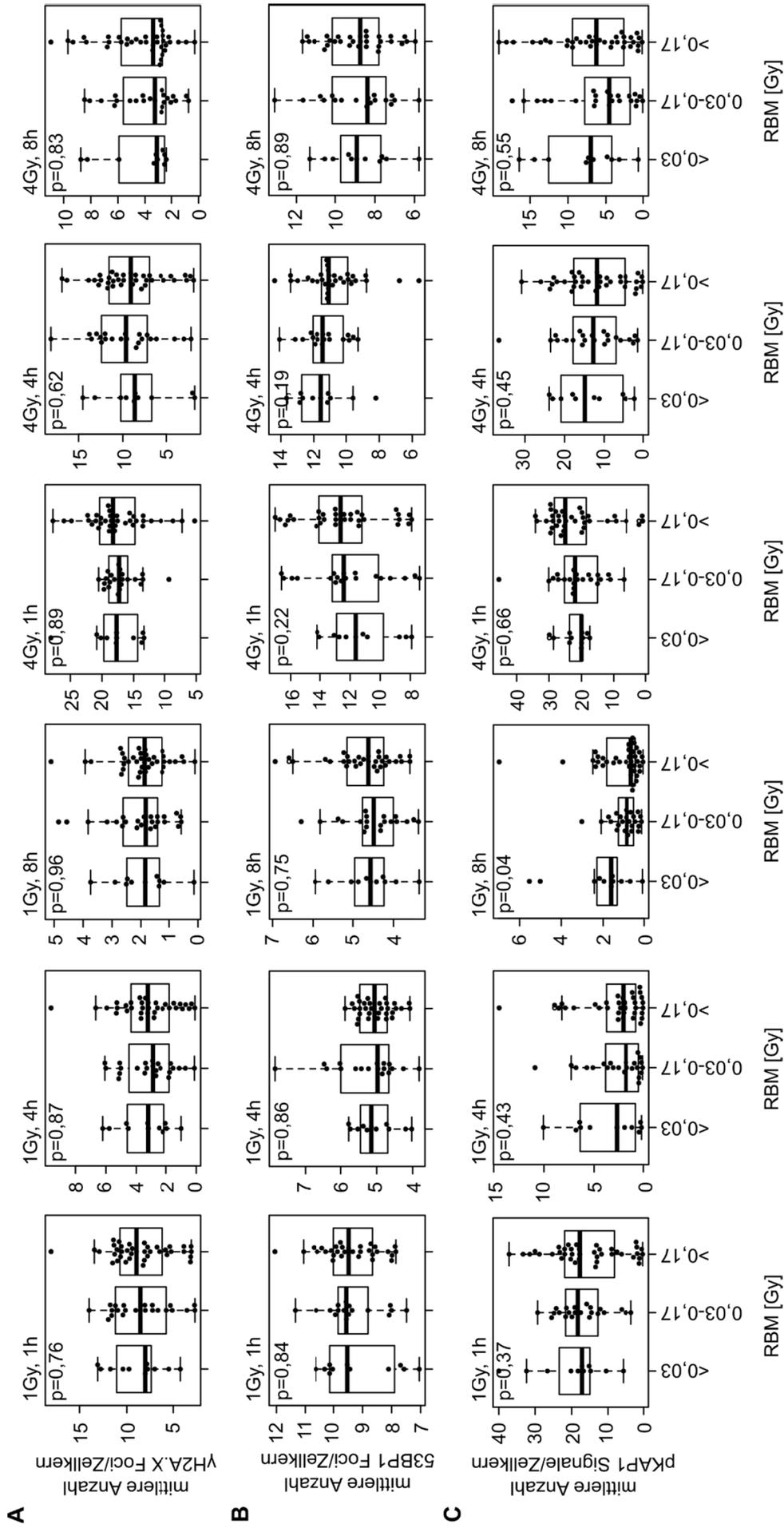
Die Anzahl der Foci pro Zellkern wurde nach *in vitro* Bestrahlung in mindestens 500 Zellen jedes Bergarbeiters bestimmt. Die Korrelation zwischen Foci Anzahl und kumulativer Radonkonzentration wurde mittels Spearman's Rangkorrelation analysiert.

Reparaturfoci	Dosis [Gy]	Inkubationszeit nach Bestrahlung [h]	Korrelationskoeffizient r	P-Wert	
$\gamma$ H2A.X	0	1	0,143	0,237	
		1	-0,177	0,138	
		4	0,109	0,377	
	4	8	0,039	0,741	
		1	0,022	0,855	
		4	0,076	0,533	
			8	-0,027	0,827
	53BP1	0	1	0,097	0,454
			1	-0,167	0,205
4			-0,131	0,315	
4		8	-0,03	0,817	
		1	0,069	0,592	
		4	-0,191	0,139	
			8	-0,151	0,247
pKAP1		0	1	-0,091	0,451
			1	-0,193	0,104
	4		-0,101	0,41	
	4	8	-0,313	0,007	
		1	-0,017	0,889	
		4	-0,134	0,273	
			8	-0,196	0,104



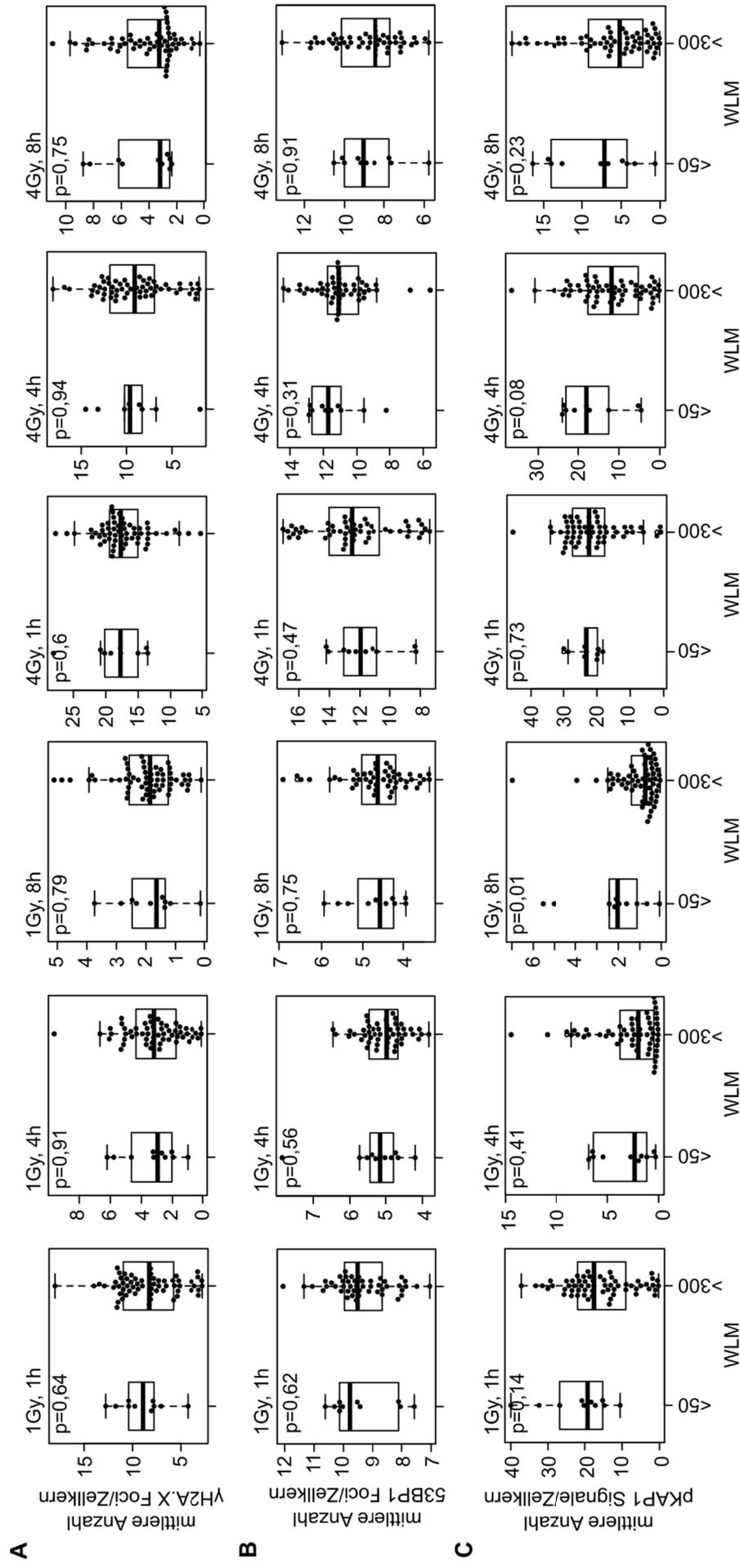
**Abbildung 32.** Korrelation der semi-automatischen Quantifizierung von RIF mit Höhe der kumulativen Radonexposition von Wismut Bergarbeitern.

Es wurde keine Abhängigkeit zwischen der Anzahl von **A, B**  $\gamma$ H2A.X Foci oder **C, D** 53BP1 Foci und der Höhe der kumulativen Radonbelastung von ehemaligen Wismut Bergarbeitern ermittelt. **E, F** Für pKAP1 wurde 8 h nach Bestrahlung mit 1 Gy eine Abnahme in der Signalanzahl mit steigender Radonbelastung beobachtet. Dargestellt ist die mittlere Foci/Signalanzahl nach einer *in vitro* Bestrahlung der kryokonservierten Lymphozyten mit 1 Gy (links) oder 4 Gy (rechts) und nach einer Inkubationszeit der Zellen von 1 h (rot), 4 h (blau) oder 8 h (grün). Der Zusammenhang zwischen Foci/Signalanzahl und Strahlenexposition wurde mit der Spearman's Rangkorrelation ermittelt.



**Abbildung 33.** Unterschiede in der Anzahl von RIF bei Wismut Bergarbeitern mit niedriger und hoher absorbiertener Gesamtdosis.

**A, B)** Es wurde kein Unterschied in der Anzahl von  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 Foci nach Bestrahlung (1, 4, 8 h) mit 1 und 4 Gy zwischen niedrig und hoch exponierten Wismut Bergarbeitern beobachtet. **C)** Für pKAP1 wurde 8 h nach einer Bestrahlung mit 1 Gy eine Abnahme in der Signalanzahl mit steigender RBM Dosis festgestellt. Dargestellt ist die mittlere Foci/Signalanzahl nach einer *in vitro* Bestrahlung der kryokonservierten Lymphozyten mit 1 Gy oder 4 Gy und nach einer Inkubationszeit der Zellen von 1 h, 4 h oder 8 h der einzelnen Wismut Bergarbeiter. Es wurde der Median mit unterem und oberem Quartil und dem Whisker ermittelt. Der Unterschied zwischen den nach Expositionshöhe gruppierten Bergarbeitern wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney statistisch ausgewertet.



**Abbildung 34. Unterschiede in der Anzahl von RIF bei Wismut Bergarbeitern mit niedriger und hoher kumulativer Radonexposition.**

**A, B)** Es wurde kein Unterschied in der Anzahl von  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 Foci nach Bestrahlung (1, 4, 8 h) mit 1 und 4 Gy zwischen niedrig und hoch exponierten Wismut Bergarbeitern beobachtet. **C)** Für pKAP1 wurde nach einer Bestrahlung mit 1 Gy (8 h) und mit 4 Gy (4 h) nach eine Abnahme in der Signalanzahl mit steigender Radonbelastung festgestellt. Dargestellt ist die mittlere Foci/Signalanzahl nach einer *in vitro* Bestrahlung der kryokonservierten Lymphozyten mit 1 Gy oder 4 Gy und nach einer Inkubationszeit der Zellen von 1 h, 4 h oder 8 h der einzelnen Wismut Bergarbeiter. Es wurde der Median mit unterem und oberem Quartil und dem Whisker ermittelt. Der Unterschied zwischen den nach Expositionshöhe gruppierten Bergarbeitern wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney statistisch ausgewertet.

### 4.3.3 Stimulierung von kryokonservierten Lymphozyten zur Analyse von Chromosomenschäden mittels mFISH Analyse

Neben RIF wurden Chromosomenschäden in kryokonservierten Lymphozyten der Wismut Bergarbeiter als mögliche Biomarker einer chronischen Strahlenexposition analysiert. Dafür wurde zunächst ein Verfahren zum Auftauen und Stimulieren von kryokonservierten Lymphozyten für die mFISH Analyse etabliert.

Lymphozyten von vier gesunden Spendern wurden mit zwei verschiedenen Einfriermedien (Einfriermedium A/B mit 69 % / 39 % RPMI-1640, 20 % / 50 % FBS, 10 % DMSO und 1 % Pen/Strep für mindestens 24 h bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurde in Intervallen zunächst der DMSO-Anteil verringert, die Zellen mehrmals gewaschen und in FBS regeneriert (Kapitel 3.2.4). Nach erfolgter Stimulierung mit PHA wurden die Lymphozyten in der nachfolgenden Metaphase durch Zugabe von Colcemid festgehalten. Die Kulturdauer wurde für kryokonservierte Lymphozyten um 24 h auf insgesamt 72 h erhöht. Anschließend wurden die Chromosomen präpariert und mittels Giemsa-Färbung oder Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung gefärbt (Kapitel 3.2.5 und 3.2.6).

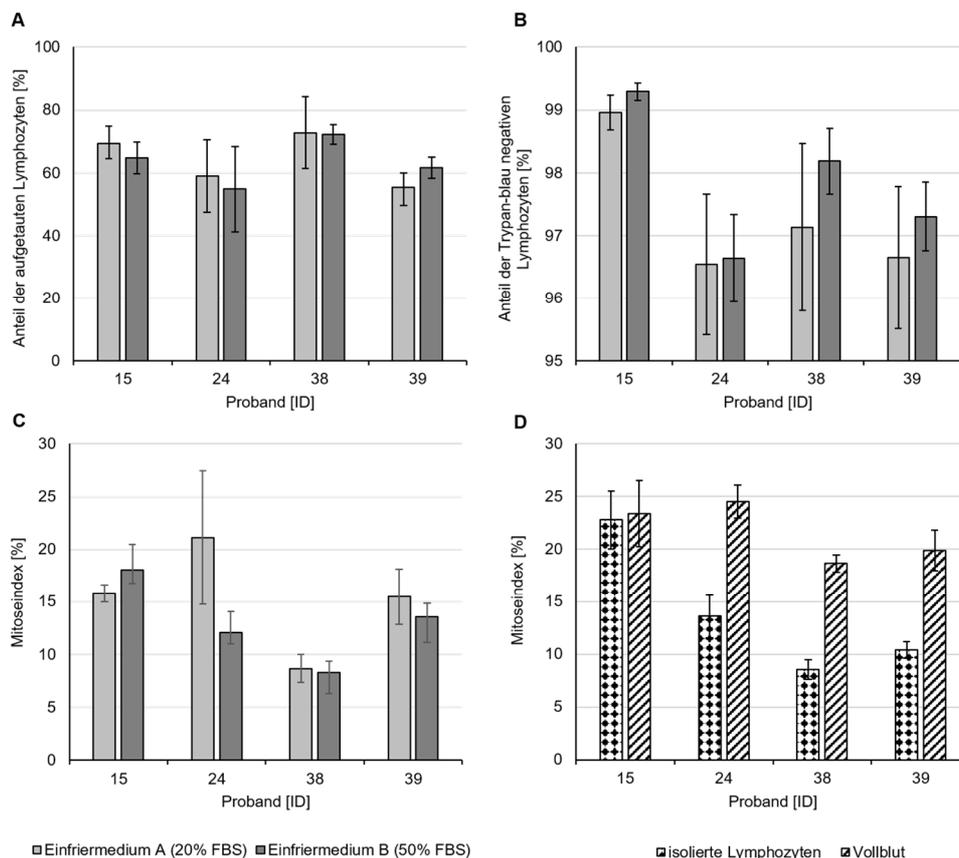
#### **Kryokonservierte Lymphozyten sind für die Chromosomenpräparation geeignet**

Die Zusammensetzung des Einfriermediums kann einen Effekt auf die Viabilität und auf die Stimulierungsfähigkeit der Lymphozyten haben. Aus diesem Grund wurden zwei Einfriermedien mit einer unterschiedlichen FBS Konzentration (Einfriermedium A 20 % FBS und Einfriermedium B 50 % FBS) in vier technischen Replikaten und bei vier Probanden verglichen.

Zunächst wurde der Anteil der eingefrorenen Lymphozyten bestimmt, die nach der Kryokonservierung wieder in Kultur gebracht werden konnten. In insgesamt 28 Versuchen konnten für die vier Probanden im Mittel zwischen 54,9 % und 72,8 % der eingefrorenen Lymphozyten wieder in Kultur gebracht werden. Für beide Einfriermedien wurde kein Unterschied im mittleren Anteil der aufgetauten Lymphozyten ermittelt (Abbildung 35A; 20 % FBS:  $64,1\% \pm 17,6\%$  vs. 50 % FBS:  $63,4\% \pm 15,1\%$ ). Die Viabilität der aufgetauten Lymphozyten lag bei allen vier Probanden im Mittel über 96 % (Abbildung 35B). Ein Unterschied zwischen den Einfriermedien wurde nicht ermittelt (Abbildung 35B; 20 % FBS:  $97,3\% \pm 2,1\%$  vs. 50 % FBS:  $97,9\% \pm 1,4\%$ ). Nach der Stimulierung und Kultivierung wurden Chromosomenpräparate angefertigt und der Mitoseindex von mindestens 500 Zellen bestimmt. Dabei wurden individuelle Unterschiede des mittleren Mitoseindex von 8,7 % bis 21,1 % zwischen den einzelnen Probanden festgestellt. Bei einem Probanden (ID 24) führte eine geringere FBS Konzentration zu einem höheren Mitoseindex (Abbildung 35C). Im Mittel wurde jedoch kein Unterschied zwischen den Einfriermedien im Mitoseindex ermittelt (Abbildung 36C; 20 % FBS:  $15,3\% \pm 7,8\%$  vs. 50 % FBS:  $13,0\% \pm 4,8\%$ ).

Insbesondere im Anteil der aufgetauten Lymphozyten und im Mitoseindex wurden interexperimentelle Variationen beobachtet. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde in weiteren Versuchen das Einfriermedium mit einem geringeren FBS Anteil genutzt. Anschließend wurde der Mitoseindex von Präparaten nach der Stimulierung von Vollblut und kryokonservierten Lymphozyten der vier Probanden mit jeweils vier Replikaten innerhalb eines Versuches verglichen. Bei Vollblut wurde ein höherer mittlerer Mitoseindex ( $21,6 \% \pm 4,5 \%$ ) im Vergleich zu kryokonservierten Lymphozyten ( $13,8 \% \pm 6,5 \%$ ) ermittelt. Jedoch wurde bei einem Probanden (ID15) kein Unterschied im Mitoseindex beobachtet (Abbildung 35D).

Mit Hilfe einer Giemsa-FPG-Färbung wurde der Anteil der zweiten Mitosen in den Chromosomenpräparaten untersucht. Für die Präparate von drei Probanden (ID24, ID38 und ID39) wurde in circa 500 ausgewerteten Metaphasen keine zweite Mitose gefunden und für einen Probanden (ID15) wurde in 760 untersuchten Metaphasen 1 Zelle gefunden, die sich vor der Colcemid-Zugabe bereits geteilt hatte.

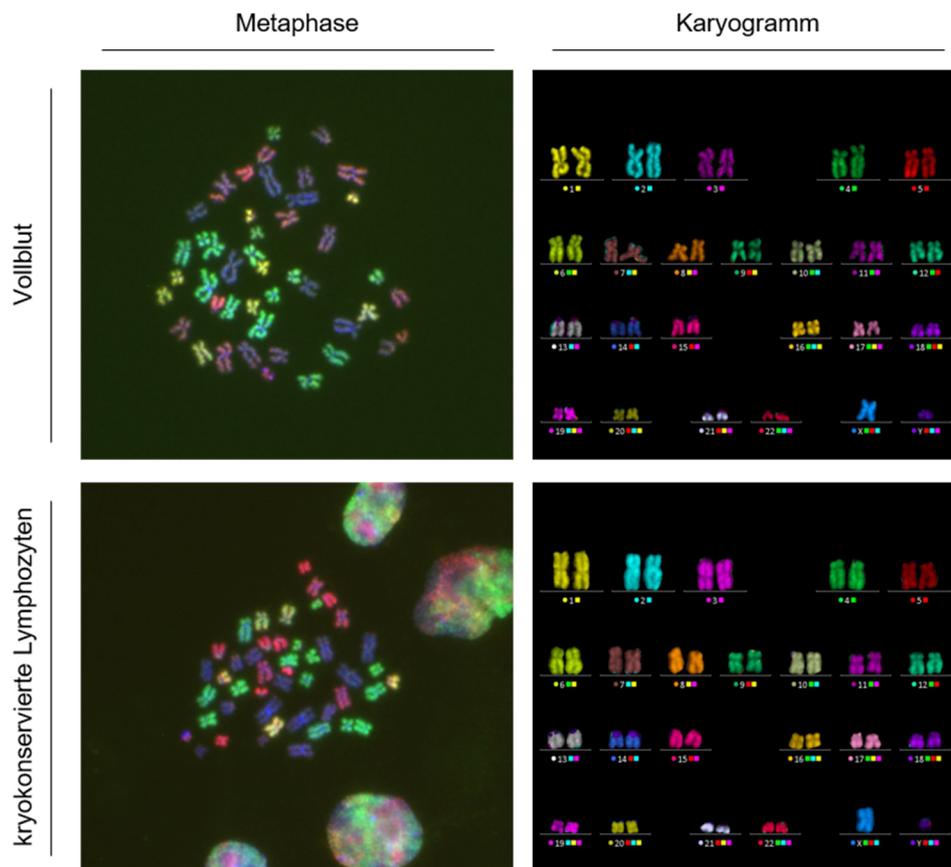


**Abbildung 35.** Stimulierung von kryokonservierten Lymphozyten für die Chromosomenpräparation.

**A)** zwischen 54,9 % und 72,8 % der ursprünglichen Lymphozyten konnte nach der Kryokonservierung wieder in Kultur gebracht werden. **B)** Von diesen Lymphozyten waren über 96 % vital. Ein Einfluss der FBS Konzentration auf die Lymphozytenanzahl und Viabilität wurde nicht beobachtet. **C)** Nach Stimulierung und 72 h Kulturdauer konnte für die kryokonservierten Lymphozyten ein Mitoseindex zwischen 8,7 % und 21,1 % ermittelt werden. Die Zusammensetzung des Einfriermediums hatte bei 3 von 4 Probanden keinen Einfluss auf den Mitoseindex. **D)** Damit lag der Mitoseindex insgesamt unter dem Mitoseindex bei einer Stimulierung von Vollblut. Dargestellt sind in A-C die Mittelwerte mit der Standardabweichung aus vier technischen Replikaten für vier Probanden. In D sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung von vier parallelen Stimulierungsansätzen von vier Probanden dargestellt.

### mFISH ermöglicht die Färbung von Chromosomen kryokonservierter Lymphozyten

Zur Überprüfung der Qualität der mFISH Färbung von kryokonservierten Lymphozyten wurde bei drei Probanden, von denen bereits aus den Vollblutproben mFISH Präparate angefertigt wurden, nach sechs Jahren erneut eine Färbung angefertigt. Sowohl für die Chromosomenpräparate aus Vollblut, als auch für die Chromosomenpräparate von kryokonservierten Lymphozyten war eine mFISH Färbung möglich. In beiden Fällen erfolgte eine gute Bindung der fluoreszierenden DNA Sonden an den Chromosomen und die unspezifische Hintergrundfärbung war in beiden Fällen minimal (Abbildung 36).



**Abbildung 36.** mFISH Färbung von Lymphozyten aus Vollblut oder nach Kryokonservierung.

Nach der Stimulierung von Vollblutproben und von isolierten, kryokonservierten Lymphozyten war eine Chromosomenpräparation und mFISH Färbung möglich. In beiden Fällen erfolgte eine gute Bindung der fluoreszierenden DNA Sonden an den Chromosomen mit einer geringen unspezifischen Hintergrundfärbung. Repräsentative mFISH Färbung einer Metaphase mit Karyogramm in der Falschfarbendarstellung des ehemaligen Wismut Bergarbeiters P194. Fluoreszenzaufnahmen und mFISH-Analyse wurde mit einem Metafer Scanning System bestehend auf dem Epifluoreszenzmikroskop Zeiss Axiolmager.Z2 und der Metafer4 und ISIS Software durchgeführt (Vergrößerung 63x).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass isolierte Lymphozyten nach einer Kryokonservierung für die Chromosomenpräparation und Analyse von Chromosomenschäden mittels mFISH Färbung genutzt werden können. Der Anteil der FBS Konzentration im Einfriermedium scheint dabei nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Allerdings führt die Kryokonservierung zu einem Verlust in der Zellzahl und zu einer verringerten Mitoseanzahl.

#### **4.3.4 Untersuchung von Chromosomenschäden in biologischen Proben von Wismut-Bergarbeitern mittels mFISH Analyse**

In vorhergehenden Untersuchungen wurden im Fachgebiet Strahlenbiologie bereits Vollblutproben von 69 der 106 ehemaligen Wismut Uranbergarbeitern zum Zeitpunkt der Probengewinnung auf Chromosomenschäden untersucht. Von weiteren 29 Probanden wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Chromosomenaberrationen mittels mFISH Analyse in isolierten und kryokonservierten Lymphozyten analysiert (Kapitel 3.2.4, 3.2.5, 4.3.3). Bei beiden Untersuchungen sollten 200 Metaphasen pro Proband analysiert werden und Probanden mit weniger als 50 auswertbaren Metaphasen wurden von der Analyse ausgeschlossen (5x). Außerdem wurden Individuen von der Untersuchung ausgeschlossen, die zuvor eine Strahlentherapie (1x) erhalten hatten oder im vergangenen Jahr mehr als 2x eine Röntgenuntersuchung hatten (3x). Insgesamt konnten von 89 Individuen 21.535 Zellen (im Mittel 242 Metaphasen/Proband) ausgewertet werden (Tabelle 10).

##### **Anzahl geschädigter Zellen könnte auf eine chronische Strahlenexposition hinweisen**

Bei allen untersuchten Wismut Uranbergarbeitern waren im Mittel 3,54 % (0,36-8,15 %) der Zellen geschädigt und es wurden 0,077 (0,007-0,179) Brüche pro Zelle detektiert (Tabelle 10). Dabei wurde mit steigender RBM Dosis im Vergleich zur steigenden kumulativen Radonbelastung eine stärkere Zunahme in der Anzahl der geschädigten Zellen ( $r=0,32$ ;  $p=0,002$  vs.  $r=0,23$ ;  $p=0,031$ ) und der Brüche pro Zelle ( $r=0,27$ ;  $p=0,011$  vs.  $r=0,18$ ;  $p=0,089$ ) beobachtet (Abbildung 37A-D). Nichtsdestotrotz zeigten einzelne Individuen mit niedriger Exposition eine hohe Anzahl geschädigter Zellen und Brüche pro Zelle.

Hingegen wurde bei der Auswertung der Gruppen mit steigender RBM Dosis kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der geschädigten Zellen ( $<0,03$  Gy = 3,45 %;  $0,03-0,17$  Gy = 3,11 %;  $>0,17$  Gy = 3,85 %,  $p=0,4$ ) oder der Brüche pro Zelle ( $<0,03$  Gy = 0,077;  $0,03-0,17$  Gy = 0,068;  $>0,17$  Gy = 0,083,  $p=0,74$ ) zwischen den Individuen der drei Gruppen ermittelt (Abbildung 38A-B). Ebenso wurde bei Betrachtung der Radonbelastung kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der geschädigten Zellen ( $<50$  WLM = 3,05 %;  $>300$  WLM = 3,65 %;  $p=0,23$ ) und der Brüche pro Zelle ( $<50$  WLM = 0,067 %;  $>300$  WLM = 0,079 %;  $p=0,3$ ) zwischen den Probanden festgestellt (Abbildung 38C-D).

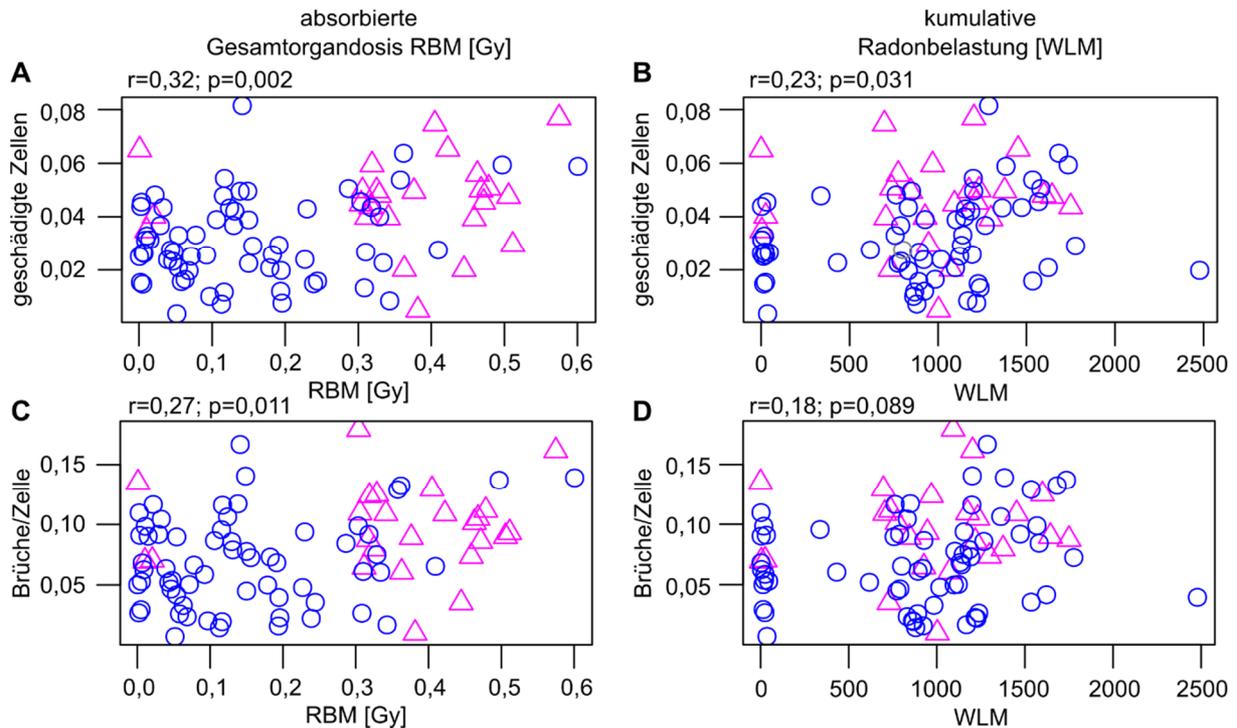
##### **Chronische Strahlenexposition könnte die Anzahl der komplexen Chromosomenaberrationen beeinflussen**

Aufgrund eines tendenziell leichten Anstiegs der Anzahl geschädigter Zellen und Brüche pro Zelle mit steigender Exposition wurde untersucht, welchen Einfluss eine chronische Strahlenexposition auf die Anzahl einzelner Aberrationsklassen hat (Tabelle 10, Abbildung 39). In der Auswertung wurde festgestellt, dass Translokationen (0,0259 Aberrationen pro Zelle) gefolgt von Chromosomenbrüchen ohne Austausch (0,0054 Aberrationen pro Zelle) und komplexen Aberrationen (0,004 Aberrationen pro Zelle) die häufigsten Aberrationen waren.

**Tabelle 10. Übersicht von Chromosomenschäden der Wismut Bergarbeiter.**

Chromosomenschäden wurden mittels mFISH Analyse von Präparaten der einzelnen Individuen ermittelt und quantifiziert. Der Mittelwert mit Minimum und Maximum wurde insgesamt für die Wismut Bergarbeiter und die nach Expositionshöhe eingeteilten Gruppen bestimmt.

	Wismut Bergarbeiter	absorbierte Gesamtdosis auf das rote Knochenmark [Gy]		jährliche Radonexposition [WLM]
		<0,03	0,03-0,17	>0,17
Individuen	89	15	29	16
Alter [Jahre]	77 (71-87)	75 (71-82)	78 (73-87)	74 (71-82)
RBM Dosis [Gy]	0,209 (0,001-0,601)	0,001 (0,001-0,029)	0,094 (0,033-0,156)	0,017 (0,0005-0,092)
Radonexposition [WLM]	924,53 (0,12-2487,5)	116,52 (0,12-788,62)	912,74 (22,02-1776,9)	1123,34 (337,66-2478,5)
Gesamtzahl analysierte Zellen	21535	3337	7867	4620
geschädigte Zellen [%]	3,54 (0,36-8,15)	3,45 (1,47-6,5)	3,11 (0,36-8,15)	3,05 (0,36-6,5)
Brüche pro Zelle	0,077 (0,007-0,179)	0,077 (0,027-0,135)	0,068 (0,007-0,167)	0,067 (0,007-0,135)
Chr.aberrationen ohne Austausch pro Zelle	0,0054 (0-0,0299)	0,0047 (0-0,0202)	0,0022 (0-0,0104)	0,0047 (0-0,0202)
Translokationen pro Zelle	0,0259 (0-0,0692)	0,0273 (0,0077-0,05)	0,0239 (0-0,063)	0,0235 (0,0036-0,05)
vollständige Translokationen pro Zelle	0,0202 (0-0,0539)	0,0227 (0,0049-0,045)	0,0182 (0-0,0519)	0,0203 (0,0036-0,045)
einseitige Translokationen pro Zelle	0,0047 (0-0,0198)	0,004 (0-0,0138)	0,0054 (0-0,0158)	0,0026 (0-0,001)
unvollständige Translokationen pro Zelle	0,001 (0-0,0149)	0,0006 (0-0,005)	0,0003 (0-0,0041)	0,0006 (0-0,005)
komplexe Chr.austausche pro Zelle	0,004 (0-0,0207)	0,0023 (0-0,0088)	0,004 (0-0,0207)	0,0021 (0-0,0088)
dizentrische Chromosomen pro Zelle	0,0024 (0-0,0161)	0,0038 (0-0,0105)	0,002 (0-0,0094)	0,0031 (0-0,0105)

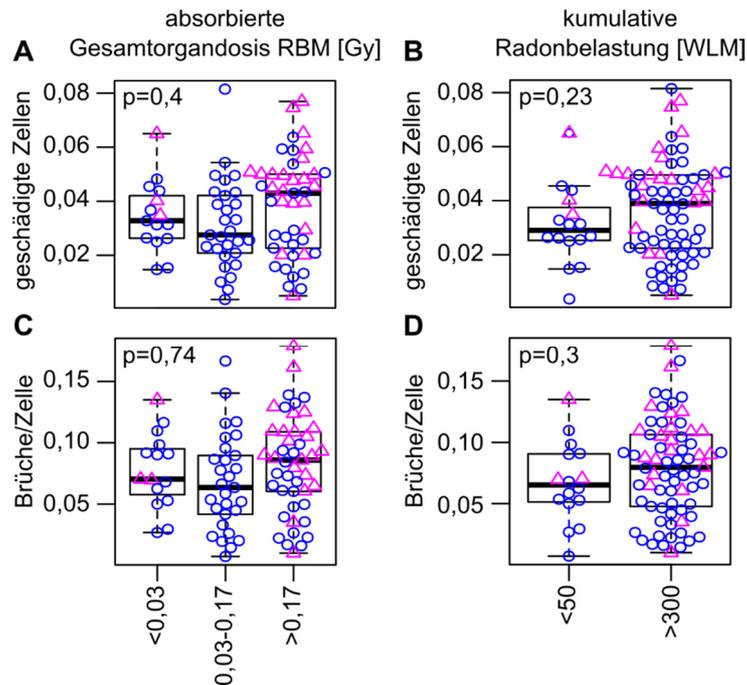


**Abbildung 37.** Korrelation geschädigter Zellen und Brüche pro Zelle mit Höhe der Strahlenexposition von Wismut Bergarbeitern.

Es wurde eine stärkere Zunahme in der Anzahl der geschädigten Zellen und Brüche pro Zelle mit **A, C**) steigender RBM Dosis im Vergleich zur **B, D**) steigenden Radonbelastung beobachtet. Dargestellt ist die mittlere Anzahl geschädigter Zellen und Brüche pro Zelle für jeden untersuchten Wismut Bergarbeiter mit der entsprechenden absorbierten Gesamtdosis auf das rote Knochenmark (RBM) in Gy (links) oder mit der kumulativen Radonbelastung in WLM (rechts). Analyseergebnisse von Vollblutproben (Kreise) und kryokonservierten Lymphozyten (Dreiecke). Der Zusammenhang zwischen Chromosomenschäden und Strahlenexposition wurde mit der Spearman's Rangkorrelation ermittelt und der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) und der P-Wert aufgeführt.

Dizentrische Chromosomen (0,0024 Aberrationen pro Zelle) wurden am wenigsten beobachtet. Bei Betrachtung der verschiedenen Translokationen zeigte sich, dass hauptsächlich vollständige Translokationen (0,0202 Aberrationen pro Zelle, 78 %) zum Anteil der Translokationen beitragen und einseitige Translokationen (0,0047 Aberrationen pro Zelle, 18 %) und unvollständige Translokationen (0,001 Aberrationen pro Zelle, 4 %) nur eine untergeordnete Rolle spielen (Tabelle 10).

Mit steigender RBM Dosis wurde eine stärkere Zunahme in der Anzahl der Chromosomenbrüche ohne Austausch ( $r=0,27$ ;  $p=0,01$ ) und komplexen Aberrationen ( $r=0,23$ ;  $p=0,027$ ) im Vergleich zu Translokationen ( $r=0,16$ ;  $p=0,14$ ) festgestellt (Abbildung 39A, 39C, 39E). Die Anzahl der dizentrischen Chromosomen ( $r=-0,04$ ;  $p=0,72$ ) wurde durch die RBM Dosis nicht beeinflusst (Abbildung 39G). Bei allen untersuchten Aberrationsklassen wurde eine ähnlich hohe Anzahl von Aberrationen in Individuen mit einer niedrigen und hohen RBM Dosis beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde mit steigender Radonbelastung keine eindeutige Zunahme in der Anzahl der Aberrationsarten beobachtet (Abbildung 39B, 39D, 39F, 39H).

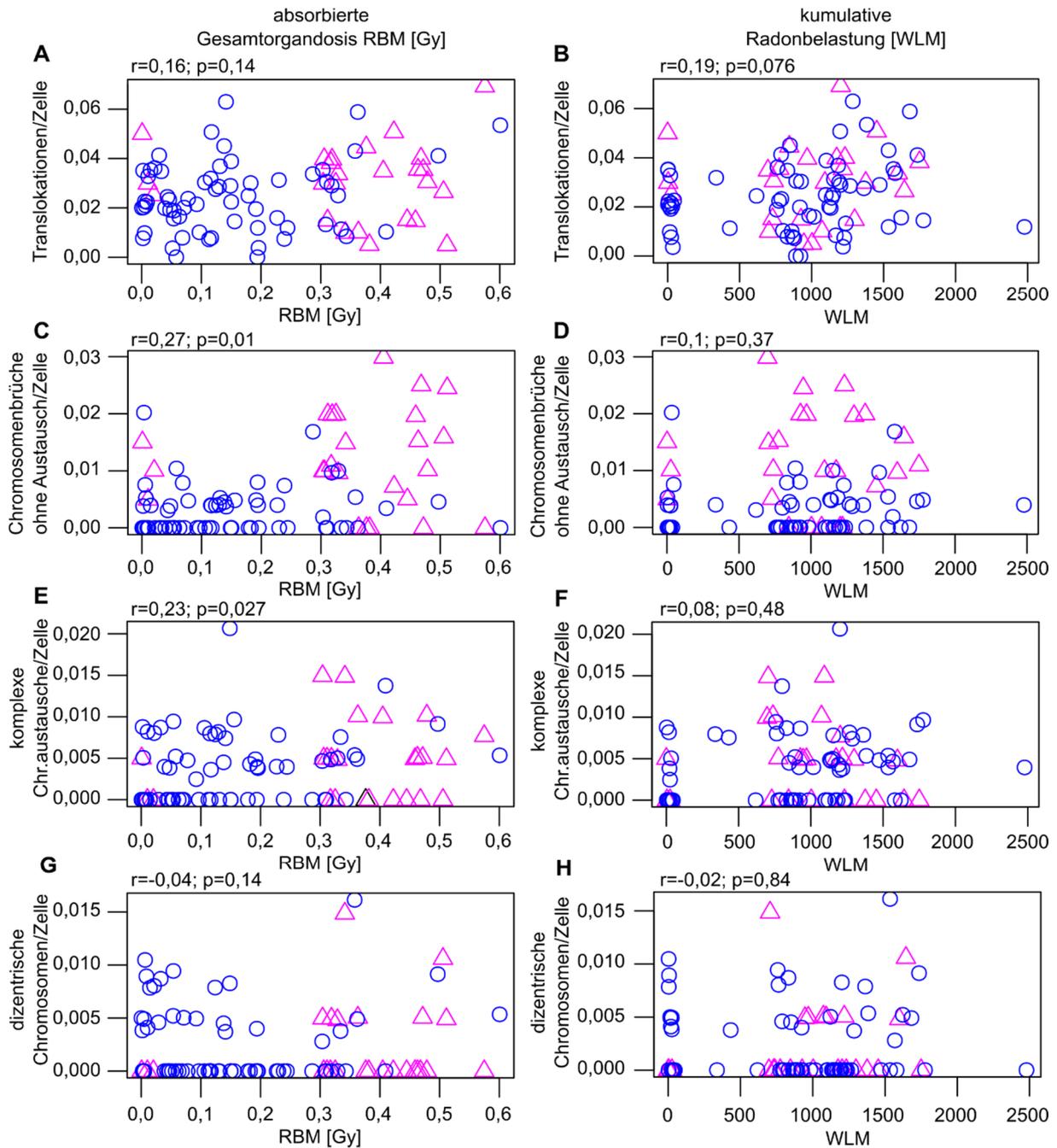


**Abbildung 38.** Unterschiede in der Anzahl geschädigter Zellen und Brüche pro Zelle bei Wismut Bergarbeitern mit niedriger und hoher Strahlenexposition.

Es wurde kein Unterschied in der **A, B**) Anzahl geschädigte Zellen oder **C, D**) Brüche pro Zelle zwischen niedrig und hoch exponierten Wismut Bergarbeitern beobachtet. Dargestellt ist die Anzahl der geschädigten Zellen oder Brüche pro Zelle der einzelnen Wismut Bergarbeiter und der Median mit unterem und oberem Quartil und dem Whisker. Analyseergebnisse von Vollblutproben (Kreise) und kryokonservierten Lymphozyten (Dreiecke). Der Unterschied zwischen den nach Expositionshöhe gruppierten Bergarbeiter wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney statistisch ausgewertet.

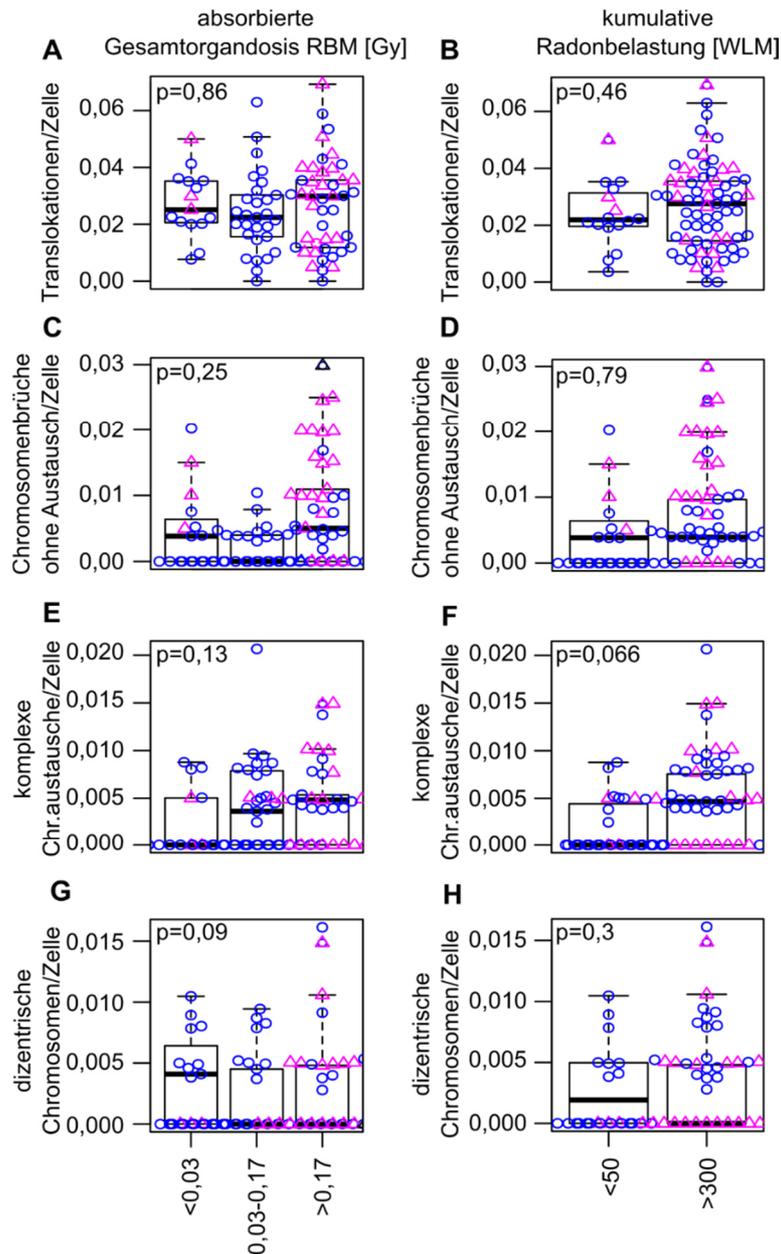
In der Auswertung der Aberrationsklassen nach gruppierter Expositionshöhe, wurde mit steigender RBM Dosis eine nicht signifikante Zunahme in der mittleren Anzahl der komplexen Aberrationen beobachtet (Abbildung 40E; <0,03 Gy = 0,0023; 0,03-0,17 Gy = 0,004; >0,17 Gy = 0,0045; p=0,13). Für Translokationen (<0,03 Gy = 0,0273; 0,03-0,17 Gy = 0,0239; >0,17 Gy = 0,0267; p=0,86), Chromosomenbrüche ohne Austausch (<0,03 Gy = 0,0047; 0,03-0,17 Gy = 0,0022; >0,17 Gy = 0,0077; p=0,25) und dizentrischen Chromosomen (<0,03 Gy = 0,0038; 0,03-0,17 Gy = 0,002; >0,17 Gy = 0,0023; p=0,09) wurde kein Anstieg zwischen den Gruppen ermittelt (Abbildung 40A, 40C, 40G).

Ebenso wurde bei Betrachtung der Radonexposition ein nicht signifikanter Anstieg in der mittleren Anzahl der komplexen Aberrationen zwischen den beiden Gruppen beobachtet (Abbildung 40F <50 WLM = 0,0021; >300 WLM = 0,0044; p= 0,066). Es wurde kein Unterschied zwischen den Gruppen für Translokationen (<50 WLM = 0,0235; >300 WLM = 0,0264; p= 0,46), Chromosomenbrüche ohne Austausch (<50 WLM = 0,0047; >300 WLM = 0,0056; p= 0,79) und dizentrische Chromosomen (<50 WLM = 0,0031; >300 WLM = 0,0023; p= 0,3) erfasst (Abbildung 40B, 40D, 40H).



**Abbildung 39.** Korrelation verschiedener Aberrationsklassen mit Höhe der Strahlenexposition von Wismut Bergarbeitern.

**A, B)** Es wurde keine Zunahme in der Anzahl der Translokationen mit steigender Strahlenbelastung beobachtet. **C, D)** Für Chromosomenbrüche ohne Austausch wurde mit zunehmender RBM Dosis ein Anstieg in der Anzahl der Aberrationen pro Zellen ermittelt, während mit steigender Radonbelastung kein Einfluss festgestellt wurde. **E, F)** Im Gegensatz zur steigenden Radonbelastung wurde für komplexe Aberrationen ein Anstieg in der Rate mit steigender RBM Dosis beobachtet. **G, H)** Für dizentrische Chromosomen wurde kein Unterschied in der Anzahl der Aberrationen pro Zelle mit steigender RBM Dosis oder steigender Radonbelastung erfasst. Dargestellt ist die mittlere Anzahl der geschädigten Zellen und Brüche pro Zelle für jeden untersuchten Wismut Bergarbeiter mit der entsprechenden absorbierten Gesamtdosis auf das rote Knochenmark (RBM) in Gy (links) oder mit der kumulativen Radonbelastung in WLM (rechts). Analyseergebnisse von Vollblutproben (Kreise) und kryokonservierten Lymphozyten (Dreiecke). Der Zusammenhang zwischen Chromosomenschäden und Strahlenexposition wurde mit der Spearman's Rangkorrelation ermittelt und der Korrelationskoeffizient (r) und der P-Wert aufgeführt.



**Abbildung 40.** Unterschiede in der Anzahl von Aberrationsklassen bei Wismut Bergarbeitern mit niedriger und hoher Strahlenexposition.

**A, B)** Es wurde kein Unterschied in der Anzahl von Translokationen zwischen niedrig und hoch exponierten Wismut Bergarbeitern beobachtet. **C, D)** Für Chromosomenbrüche ohne Austausch wurden keine Unterschiede zwischen den nach Expositionshöhe gruppierten Bergarbeitern erfasst. **E, F)** Mit steigender RBM Dosis und WLM wurde eine Zunahme in der mittleren Anzahl von komplexen Aberrationen festgestellt. **G, H)** Für dizentrische Chromosomen wurden keine Unterschiede zwischen den nach Expositionshöhe gruppierte Bergarbeitern ermittelt. Dargestellt ist die Anzahl der Aberrationen pro Zelle der einzelnen Wismut Bergarbeiter und der Median mit unterem und oberem Quartil und dem Whisker. Analyseergebnisse von Vollblutproben (Kreise) und kryokonservierten Lymphozyten (Dreiecke). Der Unterschied zwischen den nach Expositionshöhe gruppierten Bergarbeiter wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney statistisch ausgewertet.

Die Ergebnisse der mFISH Analyse von 89 ehemaligen Wismut Bergarbeitern geben Hinweise darauf, dass es aufgrund der chronischen Strahlenexposition mit steigender absorbierter Gesamtorgandosis auf das rote Knochenmark und mit steigender Radonexposition zu einer Zunahme von komplexen Aberrationen kommt. Zusätzlich könnte eine chronische Strahlenexposition einen Einfluss auf die Anzahl der geschädigten Zellen haben.

## 5. Diskussion

Zur Vorhersage des individuellen Effektes bei Exposition mit ionisierender Strahlung werden dringend Biomarker benötigt, die einen personalisierten Strahlenschutz mit effektiven Schutzstrategien und Präventionsmaßnahmen im Bereich der medizinischen und beruflichen Exposition ermöglichen. Darüber hinaus lässt die Identifikation von Patienten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit die Anwendung individualisierter Therapiekonzepte zur Verringerung von Nebenwirkungen der Strahlentherapie zu. In der vorliegenden Arbeit wurde die mikroskopische Analyse und Quantifizierung von strahlen-induzierten Reparaturfoci und von Chromosomenschäden als potenzielle Biomarker zur Vorhersage einer genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit und zum Nachweis einer zurückliegenden, chronischen Strahlenexposition untersucht. Der Fokus lag dabei auf der Etablierung und Validierung der Reparaturfoci-Analyse als Hochdurchsatz-Verfahren für die methodische Nutzung in populationsbasierten Studien oder der routinemäßigen Anwendung in Laboren. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die mikroskopische, semi-automatische Reparaturfoci-Analyse stark von individuellen, probandenbezogenen Faktoren abhängen und allein keine verlässliche Aussage über eine ausgeprägte Strahlenempfindlichkeit oder zurückliegende, chronische Strahlenexposition geben kann. Im Gegensatz dazu erlaubt die Analyse von Chromosomenschäden eine Identifikation von Individuen mit genetisch-bedingter Strahlenempfindlichkeit und liefert Anhaltspunkte zum Nachweis einer vergangenen, chronischen Strahlenexposition.

### 5.1 Nachweis einer genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit

Die besonders ausgeprägte Strahlenempfindlichkeit von Patienten mit Ataxia teleangiectatica zählt zu den Symptomen, die nicht auf den ersten Blick durch das klinische Erscheinungsbild ersichtlich sind. Diese kann in Laboruntersuchungen nachgewiesen werden oder macht sich sogar erst durch starke Komplikationen bei einer medizinischen Anwendung von ionisierender Strahlung bemerkbar (Pollard and Gatti 2009; Mandigers et al. 2011). Zusätzlich entwickeln AT Patienten häufig und in jungen Jahren Krebserkrankungen (Gatti and Good 1971; Perlman et al. 2003). Die Kombination aus diesen beiden Faktoren stellt nicht nur die behandelnden Ärzte vor einer Herausforderung, sondern erhöht zudem den Leidensdruck der Betroffenen und Angehörigen. Der Einsatz von Biomarkern zum Nachweis von Strahlenempfindlichkeit kann nicht nur in diesen extremen Fällen eine entscheidende Rolle spielen.

### 5.1.1 AT und molekulare Auswirkungen werden durch Mutationen im *ATM*-Gen verursacht

Aufgrund der autosomal-rezessiven Vererbung wird für die meisten AT Patienten eine kombiniert heterozygote Mutation im *ATM*-Gen beschrieben (Concannon and Gatti 1997; Verhagen et al. 2012). Alle untersuchten AT Patienten in der vorliegenden Arbeit waren klinisch auffällig und zeigten die charakteristischen Leitsymptome. Bei sechs der acht AT Patienten wurde eine Mutation im *ATM*-Gen als krankheitsauslösend detektiert. In vier von sechs AT Patienten wurden unterschiedliche Mutationen identifiziert, die in vier Patienten homozygot waren. Weit über 400 verschiedene Mutationen wurden im gesamten *ATM*-Gen detektiert, die größtenteils nur bei einem einzelnen AT Patienten gefunden wurden (Verhagen et al. 2012). Eine Literaturrecherche ergab, dass drei der vier Mutationen bereits in AT Patienten beobachtet wurden: eine Variante der Mutation von AT4 wurde von Magliozzi et al. 2006 erfasst, die Mutation von AT5 wurde von Castellvi-Bel et al. 1999 und Demuth et al. 2011 in einem Patienten türkischer Herkunft beobachtet und die Mutation von AT6 und AT7 wurde bereits von Broeks et al. 1998 ebenfalls in einem Patienten türkischer Herkunft beschrieben (Broeks et al. 1998; Castellvi-Bel et al. 1999; Magliozzi et al. 2006; Demuth et al. 2011). Generell führen die meisten *ATM* Mutationen zum Einbau eines Stoppcodons (AT8 und AT9), zu größeren Deletionen (AT6 und AT7), oder veränderten Spleißstellen, wodurch ganze Exons übersprungen werden (AT8 und AT9), und weniger als 10% der Veränderungen sind Missense Mutationen (AT4 und AT5) (Broeks et al. 1998; Perlman et al. 2003; Eng et al. 2004; Demuth et al. 2011). Als Konsequenz der Mutation fehlt bei 85 % der AT Patienten das ATM Protein komplett und bei den restlichen Patienten liegt die Proteinkonzentration unter der bei gesunden Menschen, obwohl ausreichend mRNA vorhanden sein kann (Becker-Catania et al. 2000; Sun et al. 2002). Weniger als 1 % der AT Patienten zeigen eine normale ATM Menge, wobei dabei die Proteinfunktion fehlerhaft sein kann (Stewart et al. 2001; Perlman et al. 2003).

Bereits 1986 waren Hanawalt und Sarasin erstaunt darüber, dass eine einzelne Mutation im *ATM*-Gen die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress, die Herstellung von Immunglobulinen und die stabile Entwicklung von Neuronen gravierend beeinträchtigen kann. Sie nahmen an, dass primär eine fehlerhafte DNA Reparatur die anderen Defekte bedingt und die Mutation die Funktion eines Enzyms, das vergleichbar mit Topoisomerase ist, stören muss (Hanawalt and Sarasin 1986). In der Tat trägt die Kinase ATM eine Schlüsselfunktion in der Organisation der DNA Schadensantwort bei DSB und deren Fehlfunktion ist ursächlich für die Symptome von AT Patienten (Lavin 2008). Trotz langjähriger Forschung ist die Rolle von ATM in der Reparatur von DSB und die Korrelation von molekularen und klinischen Beobachtung nicht vollständig geklärt, da gegensätzliche Forschungsergebnisse mit verschiedenen experimentellen Untersuchungsmethoden und unterschiedlichen biologischen Ausgangsmaterial erhoben wurden (Keimling et al. 2011; Clouaire et al. 2017).

### 5.1.2 $\gamma$ H2A.X Analyse gibt Hinweise auf individuelle Unterschiede bei strahlenempfindlichen AT Patienten

Die Analyse von phosphoryliertem H2A.X, als eines der Hauptakteure in der Signalisierung von DSB und Zielprotein von ATM, zeigte sowohl für AT Patienten als auch für die Kontrollen initial die Bildung von deutlichen  $\gamma$ H2A.X Foci nach einer *in vitro* Bestrahlung, eine Zunahme der Foci Anzahl pro Zelle mit steigender Dosis und mit zunehmender Reparaturzeit eine Abnahme der Foci Anzahl in beiden Gruppen. Die Phosphorylierung von H2A.X nach Einwirkung von ionisierender Strahlung ist trotz des Mangels von ATM, einer nachgewiesenen Mutation im *ATM*-Gen oder klinischem AT Phänotyp möglich, da die PI3-Kinasen DNA-PK die Funktion von ATM übernehmen kann (Stiff et al. 2004; Callen et al. 2009; Blackford and Jackson 2017). Die Phosphorylierung von H2A.X ist zwingend für die Akkumulierung von weiteren Proteinen der DNA-Schadenserkennung und Reparatur in der unmittelbaren Nähe der Schadensstelle erforderlich (Celeste et al. 2003). Die Kinase *Ataxia teleangiectasia and Rad3 related* (ATR), eine weitere PI3-Kinase, spielt in diesem Fall nur eine untergeordnete Rolle (Stiff et al. 2004).

Während in vorhergehenden Untersuchungen mit immortalisierten Zelllinien von AT Patienten in einigen Studien direkt nach Schadenssetzung eine leichte Verzögerung und langsamere Entwicklung von  $\gamma$ H2A.X Foci beobachtet wurde (Kato et al. 2006; Joubert et al. 2008; Granzotto et al. 2016), zeigten andere Analysen eine ähnlich Anzahl an induzierten  $\gamma$ H2A.X Foci zwischen AT Zellen und Kontrollen (Kuhne et al. 2004; Strasser et al. 2007). Mit zunehmender Reparaturzeit konnte nach 8 h und 24 h und späteren Zeitpunkten generell eine langsamere Abnahme der Foci und ein höherer Restschaden in AT Patienten identifiziert werden (Kuhne et al. 2004; Kato et al. 2006; Porcedda et al. 2006; Bakr et al. 2015; Granzotto et al. 2016). In den vorliegenden Untersuchungen mit primären Lymphozyten wurden hohe individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen AT Patienten beobachtet.

In der semi-automatischen Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Foci wiesen zwei AT Patienten (AT4 und AT8) eine hohe Foci Induktion (1 h) auf und reparierten den gesetzten Schaden adäquat (6 h), während bei drei AT Patienten (AT3, AT5 und AT6) eine deutlich geringere Anzahl an initialen  $\gamma$ H2A.X Foci und eine niedrigere Reparaturkapazität im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet wurde. Diese Beobachtungen konnten bei der manuellen Auswertung bestätigt werden. Die erhobenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Lymphozyten von einigen AT Patienten die induzierten DSB zunächst nicht adäquat signalisieren und bestehende Brüche im weiteren Verlauf durch eine ineffiziente Reparatur langsamer repariert werden und damit akkumulieren (Porcedda et al. 2006; Martin et al. 2009).

Diese Heterogenität in den Untersuchungsdaten zu AT Patienten deutet mit weiteren Studien zur DSB Reparatur darauf hin, dass verschiedene Mutationen im *ATM*-Gen unterschiedliche Auswirkungen auf die Signalübertragung, die Reparaturwege, den Zellzyklus oder programmierten Zelltod haben (Strasser et al. 2007; Keimling et al. 2011). Ursächlich hierfür können die direkten Auswirkungen der *ATM* Mutation auf nachfolgende Signalwege und Netzwerke sein oder zusätzliche genetische Veränderungen in weiteren Genen, die die DNA Schadensantwort beeinflussen (Keimling et al. 2011).

Zusätzlich zeigten frühere Untersuchungen zu Strahlenempfindlichkeit in Zelllinien oder kleinen Patientenkollektiven und Studien zu Überempfindlichkeitsreaktionen nach Bestrahlung bei Krebspatienten ebenfalls eine Heterogenität in Daten der  $\gamma$ H2A.X-Analyse, was den Einsatz als Biomarker für Strahlenempfindlichkeit erschwert (Joubert et al. 2008; Granzotto et al. 2016; Gomolka et al. 2020). Ursachen dafür liegen in der Vielzahl an experimentellen Analysetechniken, Protokollen und der Komplexität von DSB Reparatur-Mechanismen (Granzotto et al. 2016). Aufgrund der Beschränkung im primären Probenmaterial wurde in den durchgeführten Experimenten die  $\gamma$ H2A.X-Analyse nur 1 h und 6 h nach der Bestrahlung durchgeführt. Die Untersuchung einer engeren Zeitreihe und von späteren Reparaturzeitpunkten könnte eine verzögerte Signalisierung und Reparatur von DSB in AT Zellen detektieren. Dies erfordert jedoch weiteres primäres Probenmaterial, welches insbesondere bei (Klein-)Kindern nicht ohne weiteres verfügbar ist. Diese Einschränkung im Probenmaterial wäre ebenfalls in großen Studien und Routineuntersuchungen relevant, in denen  $\gamma$ H2A.X als Biomarker für Strahlenempfindlichkeit eingesetzt würde.

Zwischen der manuellen und semi-automatischen Foci Quantifizierung kommt es in den vorliegenden Untersuchungen zu einer Abweichung in der absoluten Foci Anzahl aufgrund der unterschiedlichen Auflösung zwischen dem Auge des Experimentators und der Analyse-Algorithmen der Bildauswertung, die allerdings die qualitative Aussage nicht beeinflusst. Die Abweichung in der Reparaturkapazität zwischen semi-automatischer Auswertung und manueller Auswertung nach einer Bestrahlung mit 4 Gy ist darauf zurückzuführen, dass der für die Berechnung zugrundeliegende initiale Schaden bei einer manuellen Auswertung aufgrund der hohen Foci Anzahl und Foci Dichte vermutlich nicht korrekt erfasst wurde (Rothkamm, Barnard, et al. 2013).

### 5.1.3 Chromosomenanalyse detektiert zuverlässig strahlenempfindliche AT Patienten

Entscheidend für die Ausprägung der Strahlenempfindlichkeit und die Auswirkung einer Exposition gegenüber ionisierender Strahlung ist neben der Erkennung und Signalisierung von DNA Schäden auch die anschließende Reparatur. Daher wurden Chromosomenschäden als Ergebnis einer fehlerhaften Reparatur und der Einfluss von individuellen Unterschieden in der Signalisierung von DSB auf die anschließende Reparatur mittels mFISH-Analyse untersucht.

Bisher wurden nur wenige mFISH Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit von AT Patienten durchgeführt, da bereits durch klassische zytogenetische Färbungen oder FISH Untersuchungen eine spontane Chromosomenbrüchigkeit und Strahlenempfindlichkeit von AT Patienten beobachtet werden kann (Bender et al. 1985; Neubauer et al. 2002). Allerdings erlauben diese Untersuchungen meist keine genaue Unterscheidung in den Aberrationsarten der chromosomalen Veränderungen. Die hier untersuchten Lymphozyten von AT Patienten weisen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen vor und nach einer *in vitro* Bestrahlung einen höheren Anteil an geschädigten Zellen, mehr Chromosomenbrüche pro Zelle und eine stärkere Schädigung auf. Beide Parameter erlauben damit bereits eine Unterscheidung zwischen AT Patienten und gesunden Kontrollen. In Übereinstimmung mit früheren FISH Untersuchungen zeigten Zellen von AT Patienten eine höhere Anzahl an Chromosomenbrüchen ohne Austausch, Translokationen, komplexen Aberrationen und dizentrischen Chromosomen (Stumm et al. 2001; Neubauer et al. 2002; Martin et al. 2003). Obwohl bereits das Grundlevel der spontanen Aberrationshäufigkeit in AT Patienten erhöht ist, kommt es durch eine *in vitro* Bestrahlung zu einem stärkeren Anstieg aller Aberrationsraten im Vergleich zu den Kontrollen.

Mit Blick auf die Identifikation von strahlenempfindlichen AT Patienten zeigt die Zahl der Chromosomenbrüche ohne Austausch und Translokationen damit die spontane Chromosomenbrüchigkeit von AT Patienten, während komplexe Aberrationen und dizentrische Chromosomen eindeutig die Strahlenempfindlichkeit nachweisen (Neubauer et al. 1997). Chromosomen von AT Patienten sind jedoch nicht anfälliger für Strahlung und brechen nicht leichter, da der initiale DNA Schaden in AT Patienten und gesunden Kontrollen direkt nach der Bestrahlung (Inkubationszeit 0 h) zunächst ähnlich hoch ist (Cornforth and Bedford 1985; Hittelman and Pandita 1994). Die erhöhte Anzahl an Chromosomenschäden deutet daraufhin, dass DSB häufiger in Aberrationen umgewandelt werden, DNA-Schäden fehlerhaft repariert werden und AT Zellen eine geringere Reparaturkapazität aufweisen (Pandita and Hittelman 1992; Kawata et al. 2003). Ursache für die vermehrte Bildung von komplexen Chromosomenschäden kann in der Funktion von ATM als Zellzyklusregulator in der G1- und G2-Phase liegen (Lavin and Khanna 1999; Neubauer et al. 2002).

Trotz Unterschieden in der Anzahl von Chromosomenschäden zwischen den einzelnen AT Patienten konnte in der mFISH Analyse auf individueller Ebene jeder einzelne AT Patient und die gesamte Gruppe der AT Patienten eindeutig von den Kontrollen unterschieden werden.

Schäden an den Chromatiden werden häufig durch chemische Agenzien hervorgerufen (Bender, Preston, et al. 1988). Demzufolge kann die höhere Anzahl an Chromatidschäden bei den untersuchten AT Patienten in unbestrahlten Proben auf die Einnahme von Medikamenten im Rahmen der symptomatischen Behandlung zurückzuführen sein. Ein linearer Zusammenhang zwischen ionisierender Strahlung und der Anzahl an Chromatidschäden, kann meist nur kurz nach einer Exposition (1 h) in gesunden Zellen beobachtet werden (Taylor AM et al. 1987; Bryant et al. 2010). Allerdings konnte bei Lymphozyten von AT Patienten ein deutlicher Anstieg der Chromatidaberrationen nach Bestrahlung in der G<sub>0</sub>-Phase beobachtet werden (Taylor AM et al. 1976; Bender et al. 1985; Taylor AM et al. 1987) und in den hier durchgeführten Untersuchungen auch 48 h nach Bestrahlung bestätigt werden. Ursache für den Anstieg an Chromatidschäden kann in der Persistenz von DNA-Einzelstrangbrüchen in der nachfolgenden S-Phase liegen und gibt damit ein Indiz auf die verzögerte DNA-Reparatur (Natarajan and Meyers 1979; Bender et al. 1985; Liu and Bryant 1994).

Die Anzahl und Art der chromosomalen Schäden geben somit, als fehlerhaftes Endresultat der durchgeführten DNA Reparatur, einen Hinweis auf die Qualität der DNA Reparatur und die starke chromosomale Schädigung kann verschiedene Auswirkungen haben. Chromosomale Instabilität und Translokationen, die zu den stabilen Aberrationsarten zählen und über Zellteilungen hinweg erhalten bleiben, können zur Tumorgenese beitragen (Stumm et al. 2001; Lavin 2008). In AT Patienten wurde nach Bestrahlung eine erhöhte Anzahl an Translokationen zwischen den Chromosomen 4 und 8 und den Chromosomen 5 und 12 detektiert. Eine Translokation zwischen Chromosom 4 und 8 kann die Funktion von Phosphodiesterasen und Transkriptionsfaktoren von Homöobox-Genen beeinflussen, die in Krebserkrankungen, wie Leukämie oder Lymphomen, dereguliert sind (Abate-Shen 2002; Owens and Hawley 2002; Nagel et al. 2011). Eine Translokation zwischen Chromosom 5 und 12 wurde bereits in Patienten mit myelodysplastischem Syndrom und Leukämie beobachtet und kann zu Fusionsgenen mit Transkriptionsfaktoren führen (Baranger et al. 1994; Yamamoto et al. 2000; Greipp et al. 2004). Bei AT Patienten wurden die Chromosomen 7 und 14 ungewöhnlich häufig geschädigt und 2% der Zellen zeigten einen Chromosomenübergang zwischen beiden Chromosomen. Diese Translokation involviert häufig Bruchpunkte in T-Zell Rezeptorgenen, hat damit einen direkten Einfluss auf das Immunsystem und ist besonders häufig in malignen Lymphomen und bei AT Patienten zu finden (Aurias et al. 1980; Russo et al. 1988; Khanna and Jackson 2001).

Trotz intensiver Untersuchungen von AT Patienten und der Erforschung des *ATM*-Gens und Proteins wurde in der Vergangenheit nur in wenigen Fällen eine mFISH Analyse durchgeführt. In einer Studie wurde im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen in unbestrahlten Proben eines AT Patienten und einer Kontrolle keine Aberrationen detektiert (Martin et al. 2003). Nach Bestrahlung mit 1 Gy einer Co<sup>60</sup> Quelle zeigten 50 % der Zellen des AT Patienten und 36 % der Zellen der Kontrolle chromosomale Aberrationen und die Frequenz einzelner Aberrationstypen war geringer (Martin et al. 2003). Grund für die abweichenden Ergebnisse der früheren Studie könnte in der geringen Anzahl analysierter Zellen (0 Gy/1 Gy: 20 bzw. 100 Zellen) liegen (Martin et al. 2003). Zusätzlich wurde jeweils nur eine lymphoblastoide Zelllinie eines Probanden untersucht. Übereinstimmend in den Untersuchungen war die Beobachtung, dass bei AT Patienten häufiger inkomplette Translokationen und Chromosomenbrüche ohne Austausch gefunden wurden (Martin et al. 2003).

Defekte in der DNA Reparatur und Chromosomenbrüchigkeit sind neben AT Merkmale des Nijmegen-Breakage-Syndrom, des Bloom-Syndrom und der Fanconi-Anämie (Taylor A. Malcolm R. et al. 2019) und könnten ebenfalls durch die hier verwendete  $\gamma$ H2A.X und mFISH Analyse detektiert werden. Zusätzlich können medizinische Behandlungen, Medikation und Begleiterkrankungen zur Heterogenität der DNA Schadensantwort und erhöhten Chromosomenbrüchigkeit beitragen.

#### **5.1.4 Signalisierung von DSB kann mit der Qualität der Reparatur zusammenhängen**

Kombinierte Untersuchungen von  $\gamma$ H2A.X und mFISH an einzelnen Zellen eines AT Patienten zeigten in einer früheren Studie, dass mehr Brüche ohne  $\gamma$ H2A.X Signalisierung vorkommen und diese nicht signalisierten Brüche häufiger bei unvollständigen Aberrationen zu finden sind (Martin et al. 2009). Hingegen führen mit  $\gamma$ H2A.X signalisierte Brüche zu vollständigen Chromosomenaberrationen und Chromatidbrüchen (Martin et al. 2009). Einen Zusammenhang zwischen niedriger  $\gamma$ H2A.X Foci Induktion und einer besonders hohen Anzahl einseitiger Translokationen und Chromosomenbrüche ohne Austausch konnte bei den hier untersuchten AT Patienten nicht beobachtet werden. Zusätzlich konnte kein direkter Zusammenhang zwischen chromosomalen Aberrationen und den starken, individuell unterschiedlichen  $\gamma$ H2A.X Foci Werten beobachtet werden.

Im direkten Vergleich der  $\gamma$ H2A.X und mFISH Analyse zeigten Probanden mit einer hohen Zahl induzierter  $\gamma$ H2A.X Foci und hoher Reparaturkapazität die höchste Anzahl an komplexen Aberrationen und dizentrischen Chromosomen vor Bestrahlung und eine niedrigere strahleninduzierte Zunahme (AT4/AT8 vs. AT3/AT5/AT6). Diese Beobachtung kann andeuten, dass DSB in vorgeschädigten AT Zellen besser erkannt und signalisiert werden.

### **5.1.5 Individuelle Unterschiede in AT Patienten sollten genauer charakterisiert werden**

Starke individuelle Unterschiede finden sich bei AT Patienten in der Charakteristik von neurologischen Symptomen, in Laborparametern, im Krankheitsbeginn, in der Ausprägung der Strahlenempfindlichkeit und der ATM Proteinkonzentration (Chun and Gatti 2004; Taylor A M R and Byrd 2005). In Einklang mit vorhergehenden Untersuchungen, bei der in der Mehrzahl der AT Patienten kein ATM Protein vorhanden war, konnte in LCL Zelllinien von fünf AT Patienten bei keinem Probanden ATM oder pATM detektiert werden (Becker-Catania et al. 2000; Sun et al. 2002).

LCL Zelllinien ermöglichen die genaue Untersuchung einer genetisch-bedingten Strahlenempfindlichkeit, die aufgrund ihrer niedrigen Frequenz nur selten in der Normalbevölkerung auftritt (Strasser et al. 2007). Zusätzlich war die pKAP1 Konzentration in den AT Patienten im Vergleich zu der gesunden Kontrolle deutlich geringer. Jedoch wurden keine individuellen Unterschiede festgestellt, die mit der heterogenen Anzahl an  $\gamma$ H2A.X Foci korreliert werden konnte. Ein Endpunkt der ATM Signalisierung ist die Regulierung von Heterochromatin über die ATM-abhängige Phosphorylierung von KAP1 (Goodarzi et al. 2008). Durch Auflockerung der Chromatinstruktur wird der Zugang von Reparaturproteinen zum Schaden gewährleistet (Ziv et al. 2006; Goodarzi et al. 2008). Ist dies nicht der Fall bleiben DSB im Heterochromatin zurück (Goodarzi et al. 2008; Lavin 2008). Die Existenz eines einzelnen unreparierten DSB kann in der folgenden DNA Replikation oder Zellteilung zur Einleitung des programmierten Zelltods führen (Riballo et al. 2004). Folglich könnte die reduzierte Reparaturkapazität dieser residualen Schäden und unreparierten DSB im Heterochromatin für die erhöhte Strahlenempfindlichkeit verantwortlich sein und eine mechanistische Erklärung für die erhöhte Anzahl an chromosomalen Aberrationen geben (Kuhne et al. 2000; Lavin 2008; Granzotto et al. 2016). Unreparierte DSB leisten zusätzlich einen erheblichen Beitrag zu genomischer Instabilität und der Entstehung von Krebs und können damit das erhöhte Krebsrisiko in AT Patienten erklären. (Porcedda et al. 2006; Granzotto et al. 2016). Die Akkumulation von unreparierten DSB in AT Patienten bereits nach einmaliger Bestrahlung im Rahmen der Strahlentherapie kann in nachfolgenden Bestrahlungssitzungen zu erheblichen Überreaktionen führen (Joubert et al. 2008).

In weiteren Untersuchungen sollte daher insbesondere die Rolle des Heterochromatins in Verbindung mit der Reparatur von DSB in den hier charakterisierten AT Patienten geklärt werden und der Zusammenhang zu individuellen Unterschieden in der Signalisierung von DSB hergestellt werden.

## **5.2 Untersuchung der DNA Schadensantwort mit Hilfe von RIF in kryokonservierten Lymphozyten**

Zahlreiche, vergangene Untersuchungen zur individuellen Strahlenempfindlichkeit machten deutlich, dass die Stichprobengröße der Untersuchungen, Stör- und Umweltfaktoren, wie Nikotinkonsum, die hohe Variabilität von biologischen Untersuchungen (speziell wenn diese über einen langen Zeitraum durchgeführt werden) und die Komplexität der untersuchten genetischen Mechanismen einen kritischen Einfluss auf die Ergebnisse haben (Hornhardt et al. 2014). Insbesondere beim Nachweis und der Untersuchung von selten auftretenden Ereignissen und kleinen Effekten sind groß-angelegte, populationsbasierte Studien notwendig, um zellbasierte prädiktive Testverfahren zum Nachweis von Strahlenempfindlichkeit zu validieren oder einzelne genetische Variationen oder Gene zu identifizieren, die als Biomarker zur Vorhersage von Strahlenempfindlichkeit geeignet sind und eingesetzt werden können (Greve et al. 2012; Hornhardt et al. 2014; Rosenstein 2017).

Bis heute gibt es nur wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen DNA Reparatur und Strahlenempfindlichkeit systematisch in einem sehr großen Untersuchungskollektiv untersucht haben (Berthel et al. 2019; Seibold et al. 2019). Die Sammlung, Lagerung und zeitversetzte Untersuchung von biologischen Proben bietet daher ein enormes Potenzial zur Erforschung von Ursachen und Einflussfaktoren der individuellen Strahlenempfindlichkeit.

### **5.2.1 Semi-automatische Reparaturfoci-Analyse ermöglicht einen hohen Probendurchsatz**

Eine statistisch abgesicherte Untersuchung von DNA Schäden bedarf, insbesondere bei kleinen Effekten aufgrund von interindividuellen und interexperimentellen Schwankungen, eine hohe Anzahl an Experimenten und zu analysierenden Zellen und Individuen (Schunck et al. 2004; Hornhardt et al. 2014). Die manuelle Quantifizierung von Foci ist sehr eintönig und zeitintensiv, wodurch die Analyse nicht für die Untersuchung von hunderten bis tausenden Individuen geeignet ist (Ivashkevich et al. 2011). Die (semi-)automatische Bildanalyse von mikroskopbasierten Analyseverfahren verspricht eine Reduktion des Zeitaufwandes und die bessere Vergleichbarkeit von Daten, da die semi-automatische Quantifizierung frei von der Subjektivität des Experimentators ist (Schunck et al. 2004; Ivashkevich et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Hochdurchsatzverfahren zur semi-automatischen Foci Quantifizierung etabliert. Jede semi-automatische Analyse erfordert jedoch die Anpassung von Parametern durch den Operator und Auswerte-Algorithmen sollten daher nur wenig Parameter aufweisen, die verändert werden müssen (Ivashkevich et al. 2011). Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag daher zunächst auf der Etablierung einer Antikörperfärbung und der anschließenden Anpassung der Auswertealgorithmen anhand der Parameter Integrationszeit und Intensität der Fluoreszenzsignale.

Als Untersuchungsmaterial wurden ausschließlich periphere Leukozyten (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) genutzt, da diese über eine Venenpunktion leicht zugänglich sind, zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach einer Exposition entnommen werden können und damit ein ideales Untersuchungssystem für Biomarker darstellen (Lorat et al. 2020). Lymphozyten gehören zu den am häufigsten verwendeten Zellen in der biologischen Dosimetrie, strahlenbiologischen Forschung und  $\gamma$ H2A.X Analyse (Belloni et al. 2008; Porcedda et al. 2008; Valdiglesias et al. 2013). Durch die im Auswertalgorithmus genutzte Zellselektion wurden ausschließlich Zellen verwendet, die eine weitestgehend runde Form haben und damit der Morphologie von Lymphozyten entsprechen. Die große Mehrheit von Lymphozyten befindet sich in einem ruhenden Zellstatus (G0-Phase) und nur 0,7 % in der S-Phase (Inghirami et al. 1990; Vilasová et al. 2008; Ghardi et al. 2012). Aus diesem Grund wurde eine semi-automatische Auswertung nur für Proteine etabliert, die im NHEJ eine Rolle spielen oder an der initialen Signalisierung des Schadens beteiligt sind:  $\gamma$ H2A.X, 53BP1, MDC1 und pKAP1.

Für diese Proteine konnte eine semi-automatische Auswertung zur Signal Quantifizierung etabliert werden, bei der eine Dosis-Wirkungs-Beziehung und Zeitkinetik erfasst wurde und die sich an den Werten einer manuellen Auszählung orientiert. Die erhaltenen Ergebnisse decken sich mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen zur Bildung von RIF.

Erstens, die dosisabhängige Bildung von Signalen erreicht ihr Maximum 0,5 – 1 h nach der Bestrahlung (Rogakou et al. 1999; Schultz et al. 2000; Ziv et al. 2006; Turner et al. 2014).

Zweitens, die dosisabhängige Foci Anzahl steigt solange linear an, bis durch die hohe Anzahl und Dichte der überlappenden Foci eine Sättigung in der Quantifizierung erreicht wird (Noon et al. 2010; Roch-Lefevre et al. 2010; Horn Simon and Rothkamm 2011). Diese Sättigung ist von der Untersuchungsmethode abhängig, da bei der Reparaturfoci-Analyse im Transmissionselektronenmikroskop durch die deutlich höhere Auflösung erst bei höheren Bestrahlungsdosen im Vergleich zur Immunfluoreszenzmikroskopie diese Sättigung erreicht wird (Lorat et al. 2020). Zusätzlich entstehen bei höheren Bestrahlungsdosen mehr DSB, wodurch die akkumulierte Proteinmenge an der Schadensstelle geringer sein kann und damit die Antikörperbindung und schlussendlich die Sichtbarkeit reduziert ist (Horn S. et al. 2011). Dies könnte der Grund für die in den durchgeführten Untersuchungen beobachtete Verschiebung des Foci Maximums von 53BP1, MDC1 und pKAP1 bei höheren Bestrahlungsdosen sein.

Drittens, einer initialen, schnellen Abnahme, in der innerhalb von 8 h ein Großteil der Foci Signale verschwindet, folgt eine langsame Abnahme der Foci Anzahl auf das Basalniveau, die abhängig vom Protein länger als 24 h andauern kann (Schultz et al. 2000; Bouquet et al. 2006; Turner et al. 2014).

Die Reduktion der Signale steht im Zusammenhang mit der Reparaturkapazität für DSB und residuale Foci können unreparierte, persistierende DSB darstellen und damit ein Anzeichen für genomische Instabilität sein (Sedelnikova et al. 2004; Bouquet et al. 2006; Podhorecka et al. 2010; Sánchez-Flores et al. 2015). Untersuchungen am Transmissions-elektronenmikroskop konnten jedoch zeigen, dass persistierende Foci nach Bestrahlung nicht zwangsläufig an unreparierten DSB lokalisiert sind, sondern ebenso einen Hinweis auf Apoptoseprozesse geben können (Lorat et al. 2020).

Vergleichbar mit vorangegangenen Untersuchungen wurden bereits in unbestrahlten Proben geringe Basallevel von  $\gamma$ H2A.X und MDC1 Foci detektiert und ein diffuses 53BP1 Signal beobachtet (Rogakou et al. 1999; Schultz et al. 2000; Horn S. et al. 2011). Im Gegensatz zur manuellen Analyse, die sich mit den in der Literatur beschriebenen basalen Foci Werten von  $<0,2$   $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern deckt, lagen die beobachteten Basallevel von  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 in der semi-automatischen Analyse höher, da diese falsch-positiven Hintergrundsignale in der manuellen Auswertung besser von distinkten Foci getrennt werden können (Horn S. et al. 2011; Hernández et al. 2013; Durdik et al. 2015). Die erhöhten Basallevel führen zusammen mit größeren Standardfehlern zu einer verringerten Sensitivität der semi-automatischen Analyse (Rothkamm, Barnard, et al. 2013). Die schlechtere Sensitivität und höheren Hintergrundsignale von 53BP1 im Gegensatz zu  $\gamma$ H2A.X könnten auf die verwendeten Antikörper zurückzuführen sein. Während für  $\gamma$ H2A.X ein hoch spezifischer, monoklonaler Antikörper genutzt wurde, wurde für 53BP1 ein weniger selektiver polyklonaler Antikörper verwendet (Wojewodzka et al. 2015).

Durch eine Anpassung des Klassifikators könnte das Basallevel reduziert werden, wodurch jedoch deutlich früher eine Sättigung in der Dosis-Effekt-Kurve erreicht wird. Daher kann im Hinblick auf erhöhte Basallevel, die beobachtet Sättigung der Dosis-Effekt-Kurven oder die Verschiebung des Foci-Maximums die Anpassung der Klassifikatoren für verschiedene Dosisbereiche sinnvoll sein. Das Hintergrundlevel von RIF ist in Lymphozyten niedriger als in anderen primären Zellen oder Zellkulturen, da aufgrund der G0 Phase von Lymphozyten keine Foci durch Replikationsstress bei einer Zellteilung gebildet werden (Horn S. et al. 2011). Dennoch können verschiedene zelluläre Prozesse, wie Seneszenz oder die Bildung von reaktivem Sauerstoff zu DSB führen und damit unter anderem zur Bildung von  $\gamma$ H2A.X Signalen (Bonner et al. 2008; Sharma et al. 2015).

Obwohl die Initiierung von  $\gamma$ H2A.X Signalen nach Exposition mit ionisierender Strahlung unabhängig von Geschlecht, Alter, ethnischer Herkunft und Alkoholkonsum sein soll, wird der Einfluss dieser Faktoren auf die Hintergrundlevel und Variabilität der DNA Schadensantwort diskutiert, wobei mit zunehmenden Alter das Basallevel ansteigt (Roch-Lefevre et al. 2010; Sharma et al. 2015; Gomolka et al. 2018).

Die interindividuelle Variabilität im basalen Foci Niveau macht immer eine individuelle Betrachtung des Probanden erforderlich und erschwert damit die Identifikation von kleinen Effekten (Zahnreich et al. 2015). So zeigten Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen aufgrund von genomischer Instabilität ein deutlich erhöhtes Basallevel von  $\gamma$ H2A.X Foci (Jacoby et al. 2014; Zahnreich et al. 2015). Die Induktion und Reparatur von  $\gamma$ H2A.X Foci war jedoch zwischen Krebspatienten und Kontrollen vergleichbar (Zahnreich et al. 2015).

In den etablierten Doppelfärbungen konnte die in der Literatur beschriebene Kolo-kalisation von  $\gamma$ H2A.X mit 53BP1 und 53BP1 mit MDC1 bestätigt werden (Schultz et al. 2000; Stewart et al. 2003; Sedelnikova et al. 2004; Noon et al. 2010). Die Kombination von Antikörpern und Untersuchung verschiedener Proteine in einer Probe reduziert den benötigten Probenmaterialeinsatz und erhöht die Robustheit der Auswertung und Aussage, da individuelle Unterschiede damit genauer charakterisiert werden können. In Doppelfärbungen kann es jedoch durch die gewählten Farbstoffe zu einer Überlappung des Absorptions- und Emissionsspektrums kommen und damit zu falsch-positiven Ergebnissen in der Immunfluoreszenzmikroskopie kommen (Rénier et al. 2007). Die erhaltenen Daten sollten daher immer mit Daten einer Einzelfärbung verglichen werden (Berthel et al. 2019).

Zusätzlich konnte für die Proteine pATM (Ser1981), Rap80 und pDNA-PK (Thr2609) eine semi-automatische Auswertestrategie erstellt werden, bei der sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigte. Allerdings konnten die Ergebnisse für pATM und Rap80 nicht stabil reproduziert werden, sodass in nachfolgenden Versuchen die Färbung und mikroskopische Auswertung weiter optimiert werden sollte.

Ein entscheidender Einflussfaktor der semi-automatischen Analyse ist die Qualität der Färbung und die Morphologie der Foci. Während in den hier durchgeführten Untersuchungen  $\gamma$ H2AX, 53BP1, MDC1 und Rap 80 große, distinkte und intensiv leuchtende Foci bildeten, die vom Hintergrundsignal in bestrahlten Proben unterschieden werden konnten, bildeten pATM und DNA-PK kleine und filigrane Foci und pKAP1 zeigte ein pan-nukleäres Signal. Zusätzlich muss bei der semi-automatischen Analyse eine Qualitätskontrolle der untersuchten Präparate durchgeführt werden. Speziell für  $\gamma$ H2A.X wurde in der durchgeführten Qualitätskontrolle Zellen beobachtet, die ein pan-nukleäres Signal aufwiesen und damit aufgrund der starken Intensität die Foci Signale in umliegenden Zellen überstrahlen könnten. Diese pan-nukleäre Färbung deutet auf ein frühes Apoptose-Stadium hin, da H2A.X ebenfalls bei der DNA Fragmentierung in der Apoptose an Serin 139 phosphoryliert wird (Rogakou et al. 2000; MacPhail et al. 2003; Nowak et al. 2006; Markova et al. 2011).

Foci könnten anhand ihrer Intensität ebenso mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Durch die schnelle Analysezeit und den geringen Probeneinsatz ermöglicht diese Methode einen noch höheren Probenumsatz im Vergleich zur semi-automatischen Mikroskopie (Sánchez-Flores et al. 2015). Allerdings ist die Immunfluoreszenzmikroskopie deutlich spezifischer und sensitiver, da es auf Einzelzellebene die Lokalisierung von Foci im Zellkern erfasst, Aussagen zur Fluoreszenzintensität und Focigröße ermöglicht und damit bei niedrigen Bestrahlungsdosen (<0,5 Gy) eine Aussage zum Effekt der Exposition liefern kann (Horn Simon and Rothkamm 2011; Venkateswarlu et al. 2015). Die Technologie der *Imaging* Durchflusszytometrie könnte die Vorteile beider Methoden verbinden und die Analyse von RIF mit Hinblick auf die Anwendung als Hochdurchsatzverfahren erheblich verbessern (Durdik et al. 2015).

### **5.2.2 Kryokonservierung lässt die Möglichkeit der zeitlich entkoppelten Probensammlung und semi-automatischen Reparaturfoci-Analyse zu**

Bei der Durchführung von molekular-epidemiologischen Studien ist es aufgrund der Größe der Studiengruppe und der zeitaufwendigen Analyseverfahren nicht immer möglich innerhalb eines Tages das Probenmaterial zu gewinnen, zu transportieren, vorzubereiten und die funktionellen Testverfahren durchzuführen (Risom and Knudsen 1999; Allione et al. 2013). Die Kryokonservierung ermöglicht die Sammlung von großen Probenkollektiven und reduziert durch die gleichzeitige und einheitliche Analyse von Proben die Variabilität von wiederholenden, biologischen Analyseverfahren, sodass einheitlichere Daten erhoben werden (Sears and Rosenberg 1977; Vingerhoets et al. 1995).

Es wurde daher der Einfluss der Kryokonservierung von Lymphozyten auf die semi-automatische Reparaturfoci-Analyse für  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und pKAP1 untersucht. Für kryokonservierte und frisch isolierte Lymphozyten wurde für alle Proteine eine Dosis-Effekt Kurve beobachtet. Im Gegensatz zu  $\gamma$ H2A.X konnte für 53BP1 und pKAP1 in kryokonservierten Lymphozyten im Vergleich zu frisch isolierten Lymphozyten eine niedrigere Bestrahlungsdosis von 0 Gy unterschieden werden. Obwohl sich für  $\gamma$ H2A.X tendenziell ein geringeres Basallevel in frisch isolierten Lymphozyten zeigte, war die mittlere Foci Anzahl pro Zellkern für  $\gamma$ H2A.X für keinen Dosispunkt signifikant unterschiedlich zwischen kryokonservierten und frisch isolierten Lymphozyten.

Im Gegensatz dazu wurde für 53BP1 für einen Dosispunkt und für pKAP1 für vier Dosispunkte ein signifikanter Unterschied ermittelt. Obwohl bereits seit den 1950er Jahren die Kryokonservierung von Lymphozyten in der Forschung und bei *Biomonitoring* Studien genutzt wird, gibt es nur wenige Untersuchungen zur RIF Bildung (Meryman 1956; Pegg 1965; Risom and Knudsen 1999; Sánchez-Flores et al. 2015). Dabei konnten in kryokonservierten Proben höhere Basallevel für  $\gamma$ H2A.X Foci und höhere  $\gamma$ H2A.X Proteinlevel ermittelt werden (Peng et al. 2008; Sánchez-Flores et al. 2015).

Nach der Induktion von DSB durch chemische Agenzien, konnte in kryokonservierten Lymphozyten ebenfalls eine stärkere DSB Signalisierung durch  $\gamma$ H2A.X beobachtet werden (Sánchez-Flores et al. 2015). Obwohl vereinzelt eine leichte Zunahme des Basalniveaus von Einzelstrangbrüchen beobachtet wurde (Koppen et al. 2018; Ladeira et al. 2019), hatte in anderen Studien die Kryokonservierung scheinbar keinen Einfluss auf die Anzahl von Einzelstrangbrüchen und führte nicht zu Unterschieden in der Induktion und Reparaturkapazität von Einzelstrangbrüchen (Visvardis et al. 1997; Duthie et al. 2002; Ho et al. 2011; Milić et al. 2019; Gajski et al. 2020). Allerdings kann es durch die Kryokonservierung auf epigenetischer Ebene zu Veränderungen in der DNA Methylierung, bei Histonmodifikationen und in der Chromatinstruktur kommen (Chatterjee et al. 2017; Falk et al. 2018). Diese Effekte können insbesondere ursächlich für die Unterschiede in der pKAP1 Signalisierung sein. Einen weiteren Einfluss auf funktionelle Testverfahren scheint die Lagerung des Vollblutes nach der Gewinnung bis zur Kryokonservierung zu haben, da es mit zunehmender Zeit zur vermehrten Bildung von Einzel-, Doppelstrangstrangbrüchen und weiteren DNA Schäden kommen kann (Narayanan et al. 2001; Allione et al. 2013; Wojewodzka et al. 2015). Werden hingegen Lymphozyten aus diesen Vollblutproben gewonnen und kryokonserviert, dann kann kein Einfluss auf die Signalisierung und Reparatur von DNA Schäden festgestellt werden (Allione et al. 2013). Möglicherweise werden zuvor verursachte Schäden durch eine Kultivierung über Nacht in den Zellen bereits repariert (Allione et al. 2013).

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass kryokonservierte Lymphozyten für die Untersuchung des DNA Schadens durch DSB Signalisierung und mittels semi-automatischer Reparaturfoci-Analyse geeignet sind. Dennoch sollten Ergebnisse aus Untersuchungen von kryokonservierten Lymphozyten und frisch isolierten Zellen nicht direkt verglichen werden, sondern die Ergebnisse innerhalb eines Untersuchungssystems ausgewertet werden.

### **5.2.3 Einbindung von ungeübten Mitarbeitern kann die Untersuchungskapazität der Reparaturfoci-Analyse erhöhen**

Bei einer hohen Anzahl an zu untersuchenden Proben werden zahlreiche Mitarbeiter benötigt und trotz semi-automatischer Analyseverfahren und der Möglichkeit der Lagerung von Proben können Labore schnell ihre Kapazitätsgrenze erreichen (Venkateswarlu et al. 2015). Durch die Einbindung von ungeübten Mitarbeitern in die Anfertigung der Immunfluoreszenzfärbungen von  $\gamma$ H2A.X und der anschließenden semi-automatischen Analyse könnte die Laborkapazität erhöht werden.

In den durchgeführten Untersuchungen konnte kein signifikanter Unterschied in der mittleren  $\gamma$ H2A.X Foci Anzahl nach Bestrahlung zwischen Experten und ungeübten Mitarbeitern beobachtet werden und technische Replikate der Objektträger zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit bei allen Experimentatoren.

In allen Fällen konnte anhand der Foci Anzahl zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben und zwischen den beiden Bestrahlungsdosen unterschieden werden.

Für die Analyse von  $\gamma$ H2A.X Foci bei einer großen Probenanzahl, beispielsweise im Falle eines Strahlenunfalls, kann die Kooperation zwischen Laboren bei der Anfertigung von Präparaten oder der Auswertung entscheidend die Untersuchungskapazität erhöhen (Moquet et al. 2017). Jedoch zeigten Ringversuche in diesen Netzwerken eine Variation in der ermittelten Anzahl von  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern und Unterschiede in der Qualität der Immunfluoreszenzfärbung zwischen den einzelnen Laboren (Rothkamm, Beinke, et al. 2013; Rothkamm, Horn, et al. 2013). Die Qualität und damit die Sensitivität der Reparaturfoci-Analyse kann durch die Erfahrung und dem Forschungsschwerpunkt der Labore, durch Unterschiede in der methodischen Durchführung der Objektträgerpräparation, des Färbeverfahrens oder der verwendeten Chemikalien erheblich beeinflusst werden (Rothkamm, Barnard, et al. 2013; Rothkamm, Beinke, et al. 2013; Vandevoorde et al. 2015). Die Standardisierung des Färbeprotokolls und der technischen Ausstattung wäre daher essenziell, um zuverlässige und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten und wäre schon allein aufgrund des hohen Kostenaufwands nicht umsetzbar (Barnard et al. 2015; Sánchez-Flores et al. 2015). Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen eine andere Möglichkeit auf, da durch die Einbindung von ungeübten Mitarbeitern die Laborkapazität innerhalb eines Labors erhöht wird und Unterschiede im Färbeprotokoll, Antikörpernutzung und technischen Ausstattung zwischen Laboren minimiert werden können.

Nach der Immunfluoreszenzfärbung erfolgt die Quantifizierung von RIF in vielen Fällen per Auge und stellt damit einen weiteren Kapazitätsengpass dar. Die manuelle Quantifizierung durch ungeübte Mitarbeiter könnte die Menge der analysierten Objektträger erhöhen, ohne die Zeit der Auswertung zu verlängern.

Die manuelle  $\gamma$ H2A.X Foci Zählung anhand von Bilddateien vorbereiteter und aufgenommener Objektträger durch ungeübte Mitarbeiter zeigte einen Dosis-Wirkungs-Effekt. Außer für die Bestrahlungsdosis 0 und 0,05 Gy zählte der Experte eine höhere Anzahl  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern und die Zählung des Experten war nicht im Konfidenzband der Zählung von ungeübten Mitarbeitern für 6 von 8 Dosispunkten. In früheren Ringversuchen zur manuellen  $\gamma$ H2A.X Foci Zählung anhand von Bilddateien wurden ebenfalls erhebliche Unterschiede in der Foci Anzahl pro Zellkern zwischen den Laboren beobachtet, jedoch konnten die Proben anhand ihrer Dosis geordnet werden (Barnard et al. 2015). Unterschiede in der Größe und Intensität der Foci können eine objektive und vergleichbare Quantifizierung der Foci Anzahl verhindern (Roch-Lefevre et al. 2010). Zusätzlich ist die Zählung von Foci mit zunehmender Dosis aufgrund der hohen Foci Dichte und Signalüberlappungen erschwert (Rothkamm, Barnard, et al. 2013).

In der manuellen 53BP1 Foci Zählung konnte durch die ungeübten Mitarbeiter ebenfalls eine Dosis-Effekt-Kurve ermittelt werden, allerdings lagen die Anzahl der 53BP1 Foci pro Zellkern der Zählung des Experten nur bei 2 von 8 Dosispunkten außerhalb des Konfidenzbandes der Zählung der ungeübten Mitarbeiter. Die Unterschiede zwischen der Zählung des Experten und der der ungeübten Mitarbeiter waren für alle Bestrahlungsdosen  $\geq 0,1$  Gy geringer im Vergleich zu  $\gamma$ H2A.X und kolokalisierten  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci. Allerdings führt die konstitutive Expression von 53BP1 zu einem diffusen Hintergrundsignal, dass die manuelle Foci Zählung erschweren kann (Turner et al. 2014; Durdik et al. 2015).

Da  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 im Zellkern kolokalisieren, könnte die Auszählung von kolokalisierten  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci die Anzahl der falsch-positiven Foci reduzieren und damit die Zuverlässigkeit der Ergebnisse erhöhen (Schultz et al. 2000; Horn S. et al. 2011; Horn Simon and Rothkamm 2011). In der Auszählung wurde ebenfalls eine Dosis-Effekt-Kurve ermittelt. Die Zählung des Experten lag für 5 von 8 Dosispunkten außerhalb des Konfidenzbandes der Zählung der ungeübten Kräfte. Allerdings war der Unterschied zwischen der Zählung des Experten und der der ungeübten Mitarbeiter  $< 0,1$  Gy geringer im Vergleich zu 53BP1 und  $\gamma$ H2A.X und bei Bestrahlungsdosen  $\geq 0,1$  Gy geringer im Vergleich zu  $\gamma$ H2A.X und höher im Vergleich zu 53BP1.

Insgesamt konnten ungeübte Mitarbeiter in der manuellen Foci Zählung eine Dosis-Effekt-Kurve für  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und kolokalisierte  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci ermitteln und zeigt damit den potenziellen Einsatz von ungeübten Mitarbeitern in der RIF Quantifizierung. Dabei scheint die Quantifizierung der 53BP1 Foci aufgrund der intensiven und klaren Form in bestrahlten Proben einfacher zu sein im Vergleich zur  $\gamma$ H2A.X Foci Zählung. Dennoch kann das diffuse Hintergrundsignal die 53BP1 Foci Zählung in unbestrahlten Proben erschweren. Die Quantifizierung von kolokalisierten  $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci könnte daher das Mittel der Wahl sein, um die Zuverlässigkeit der Foci Zählung in unbestrahlten Proben zu erhöhen und die Zahl der falsch-positiven Zählungen zu minimieren. Für die Einbindung von ungeübten Mitarbeitern bei molekular-epidemiologischen Studien in denen meist kleine Effekte durch die Reparaturfoci-Analyse untersucht werden, sollte in weiteren Untersuchungen die Sensitivität der Analyse mit ungeübten Mitarbeitern ermittelt werden.

### **5.3 Nachweis einer chronischen Strahlenexposition**

Biomarker und Testverfahren werden häufig in einer definierten Laborumgebung mit kontrollierten Rahmenbedingungen und minimierten Einflussfaktoren etabliert. Daher muss eine Validierung in größeren Untersuchungskollektiven im Rahmen von molekular-epidemiologischen Studien erfolgen (Gomolka et al. 2020).

Diese Untersuchungen ermöglichen eine kritische Einschätzung in Bezug auf die Fehleranfälligkeit, interexperimentellen Schwankungen und interindividuellen Unterschiede der Probanden und geben Aufschlüsse über die Belastbarkeit, Handhabung und Kapazitätsgrenze des Testverfahrens bei einer großen Probenanzahl. Der Fokus von strahlenbiologischen oder epidemiologischen Studien und Biobanken liegt häufig auf dem Bereich der medizinischen Strahlenexposition und der Entstehung von Krebs (Seibold et al. 2019; Averbek et al. 2020; Gomolka et al. 2020; Seibold et al. 2020). Gleichzeitig kann der Nachweis einer vergangenen, chronischen Strahlenexposition zusammen mit der biologischen Charakterisierung des Probenmaterials und den epidemiologischen Daten entscheidende Erkenntnisse zur Entstehung von strahlen-induzierten Krebs- und weiteren Folgeerkrankungen und deren Einflussfaktoren liefern. Damit kann die deutsche Uranbergarbeiter Biobank zusammen mit der deutschen Uranbergarbeiter Kohorte zur Aufklärung der individuellen Auswirkung einer Strahlenexposition beitragen.

### **5.3.1 Vorerkrankungen, Lebensstil und Umweltnoxen können die Untersuchungen der Wismut Bergarbeiter verzerren**

Die hier untersuchten 106 Wismut Bergarbeiter wiesen im Mittel mit 0,22 Gy (0 – 0,6 Gy) eine geringere absorbierte Gesamtorgandosis auf das rote Knochenmark im Vergleich zu den 58.982 Kohortenmitgliedern mit im Mittel 0,5 – 0,6 Gy (0 – 0,94 Gy) auf (Schnelzer et al. 2014). Im Vergleich dazu liegt die kumulative Radonbelastung der hier untersuchten Uranbergarbeiter mit durchschnittlich 922,1 WLM (0,1 – 2478,5 WLM) höher im Vergleich zu den Mitgliedern der Kohortenstudie mit durchschnittlich 280 WLM (Maximum 3224 WLM) (Schnelzer et al. 2014). Die große Spannbreite der Expositionshöhe liegt darin begründet, dass neben Bergarbeitern mit sehr hoher Strahlenbelastung Individuen ausgewählt wurden, die in den Metadaten „Alter“ und „Lebensstil“ vergleichbar waren, aber eine sehr niedrige Exposition aufwiesen und damit als Kontrollgruppe fungieren konnten.

Die Expositionsabschätzung beruht auf einer Arbeitsanamnese, bei der die ausgeübte Tätigkeit, der Arbeitsort im Betrieb und der Standort des Bergbaubetriebes angegeben wurden (Schnelzer et al. 2014). Während die Konzentration und Exposition von Radongas und externe Gamma-Strahlung ab 1955, Radonfolgeprodukte ab 1964 und langlebige Radionuklide ab 1967 durch Messungen aufgezeichnet wurden, ergeben sich die Expositionswerte für die Zeiträume davor aus Expertenabschätzungen (Schnelzer et al. 2014). Dabei besteht die Möglichkeit von Unsicherheiten und Fehleinschätzungen der Expositionshöhe insbesondere in den Betriebsjahren ohne entsprechende Messwerte, die jedoch wahrscheinlich keine größeren Abweichungen zur Folge haben (Schnelzer et al. 2014). Dennoch muss in den nachfolgenden Untersuchungen und bei der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse, die mögliche Unsicherheit in der Expositionsabschätzung berücksichtigt werden.

Übereinstimmend mit der häufigsten Todesursache leiden die hier untersuchten Wismut-Bergarbeiter ebenfalls am häufigsten an Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Schnelzer et al. 2014). Weitere häufige Todesursachen der ehemaligen Wismut Bergarbeiter sind Krebserkrankungen und Atemwegserkrankungen (Schnelzer et al. 2014). Im Gegensatz dazu leiden die hier untersuchten Bergarbeiter der Bioprobenbank am zweit-häufigsten an Atemwegserkrankungen gefolgt von Krebserkrankungen. Ursache in der Abweichung kann in der Datenerhebung begründet sein.

Während für die Bioprobenbank ausschließlich Probenmaterial und Daten zur medizinischen Vorgeschichte von lebenden ehemaligen Wismut Bergarbeitern gesammelt wurden, erfolgt die Datenerhebung der Kohortenstudie über Sterberegister und Totenscheine (Schnelzer et al. 2014; Walsh et al. 2015). Die Erkrankungen und potenziellen Todesursachen können neben der chronischen Strahlenexposition durch die Feinstaubbelastung oder Exposition gegenüber arsenhaltigem Gestein verursacht werden und durch das Alter und den Lebensstil beeinflusst werden (Kreuzer et al. 2013). Dabei zeigten Daten einer Fall-Kontrolle-Studie, dass 73 % der Bergarbeiter im Laufe ihres Lebens geraucht haben und 12 % an Diabetes Mellitus erkrankt waren (Schnelzer et al. 2010; Kreuzer et al. 2013). Von den hier untersuchten Bergarbeitern haben 73,6 % in ihrem Leben bereits geraucht und 29,6 % litten an Diabetes Mellitus. Sowohl Daten aus epidemiologischen als auch biologischen Untersuchungen sollten daher vor dem Hintergrund dieser Einflussfaktoren kritische betrachtet werden. Zusätzlich können Strahlenexpositionen durch medizinische Anwendungen, die kurz vor der Probengewinnung durchgeführt wurden, die Ergebnisse von biologischen Untersuchungen verzerren. Diese Strahlenexposition könnte jedoch durch die Analyse von chromosomalen Aberrationen detektiert werden.

Entscheidend für den Nutzen einer Biobank sind daher neben qualitativ hochwertigen biologischen Proben, umfangreiche Metadaten und die Kombination von biologischen und epidemiologischen Untersuchungen. Die deutsche Uranbergarbeiter Biobank hat somit folgende Hauptziele: 1.) die Etablierung von prognostischen und prädiktiven Biomarkern zur Identifizierung von chronisch strahlenexponierten Individuen und 2.) die Identifizierung von veränderten Genen, Proteinen oder DNA Sequenzen die mit chronischer Exposition und möglichen Folgeerkrankungen verbunden sind. Der Fokus der hier durchgeführten Untersuchungen lag dabei auf der Validierung der etablierten, semi-automatischen Reparaturfoci-Analyse zum Nachweis einer chronischen Strahlenexposition.

### 5.3.2 Individuelle Unterschiede beeinflussen den Nachweis einer chronischen Strahlenexposition mittels semi-automatischer RIF Analyse

Die chronische Strahlenexposition der ehemaligen Wismut Bergarbeiter gegenüber Gamma-Strahlung und Radon und dessen Folgeprodukte kann zahlreiche zytotoxische und genotoxische Effekte, wie Mutationen, Modifikationen des Zellzykluses, oder die direkte Bildung von DSB, hervorrufen (Chauhan et al. 2012; Robertson et al. 2013; Ding et al. 2016). Eine akute Radonexposition mit geringer Dosis (1,74 bis 6,85 mGy) führt zur Bildung von  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und pKAP1 Foci an DSB, die allerdings 12 bis 24 Stunden nach der Exposition nicht mehr nachweisbar sind (Ding et al. 2016). In Tierexperimenten konnte nach einer Radoninhalation über mehrere Wochen von insgesamt 30 bis 60 WLM ein Anstieg der  $\gamma$ H2A.X Foci Anzahl in peripheren Blutzellen beobachtet werden (Wang J et al. 2016). Zusätzlich war eine akute Strahlenexposition gegenüber Gamma-Strahlung (0,5 Gy) zwei bis vier Wochen mittels  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 Foci nachweisbar (Marková et al. 2011).

Aufgrund der schnellen und initialen Bildung von Foci, mit einem Signalmaximum 1 h nach Exposition, und des schnellen Signalverlustes mit zunehmender Zeit, konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen nur die Signalisierung und Reparatur von DSB nach einer erneuten *in vitro* Bestrahlung von kryokonservierten Lymphozyten ehemaliger Wismut Bergarbeiter mittels semi-automatischer Reparaturfoci-Analyse von  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und pKAP1 mit Erfolg nachgewiesen werden. Damit könnte eine mögliche genomische Instabilität oder adaptive Strahlenantwort nach chronischer Strahlenexposition detektiert werden. Für  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 wurde keine signifikante Abhängigkeit zwischen der Foci Anzahl und der Höhe der Strahlenexposition der ehemaligen Wismut Bergarbeiter ermittelt. Im Gegensatz dazu wurde für pKAP1 8 h nach einer Bestrahlung mit 1 Gy eine stärkere Abnahme in der Signalanzahl mit steigender RBM Dosis und WLM beobachtet. Phosphoryliertes KAP1 führt zur Dekondensierung der Chromatinstruktur, verbessert damit die Zugänglichkeit der Schadensstelle für die DNA Reparatur und hat somit eine entscheidende Rolle in der DSB Reparatur (White DE et al. 2006; Iyengar and Farnham 2011). Zusätzlich beeinflusst pKAP1 den Zellzyklusarrest und Apoptose nach Exposition mit ionisierender Strahlung (Noon et al. 2010). Während die Persistenz von  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und pKAP1 Signale auf unreparierte DSB hindeuten können, steht eine Abnahme der Signalanzahl von pKAP1 im Zusammenhang mit der Kondensierung der Chromatinstruktur nach erfolgter Reparatur (White DE et al. 2006; Noon et al. 2010; Iyengar and Farnham 2011; Ding et al. 2016). Die stärkere Abnahme in der pKAP1 Signalanzahl deutet damit auf eine schnellere Reparatur von DSB in Lymphozyten von hoch exponierten, ehemaligen Wismut Bergarbeitern nach einer erneuten Strahlenexposition hin. Diese Beobachtung zeigte sich tendenziell 4 und 8 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy für 53BP1, konnte jedoch nicht mit  $\gamma$ H2A.X bestätigt werden.

Prinzipiell kann es durch eine chronische und wiederholte Strahlenexposition zu epigenetischen Veränderungen kommen, wodurch wiederum die DNA Schadensantwort beeinflusst werden kann (Belli and Tabocchini 2020). Auch die Möglichkeit der adaptiven Strahlenantwort oder Strahlensensitivität von Zellen nach wiederholter Strahlenexposition ist Gegenstand aktueller Diskussionen (Devic et al. 2020). So wiesen periphere Leukozyten von Bewohnern in Gebieten mit hoher natürlicher Radioaktivität (0,005 Gy pro Jahr) nach einer erneuten *in vitro* Bestrahlung eine geringere Anzahl  $\gamma$ H2A.X positiver Zellen und eine schnellere Reparaturkinetik auf und deuten damit auf eine verbesserte DSB Reparatur in Folge einer adaptiven Strahlenantwort durch chronische Exposition hin (Jain et al. 2017). Die Hintergrundlevel von  $\gamma$ H2A.X waren bei diesen Bewohnern nicht erhöht (Jain et al. 2016). Bei ehemaligen Arbeitern, die beim Aufbau einer Schutzkonstruktion des verunglückten Reaktors von Tschernobyl chronischen exponiert waren (<0,015 Gy), wurden 3 bis 5 Jahre nach den Arbeiten ebenfalls keine erhöhten  $\gamma$ H2A.X Werte beobachtet (Bazyka et al. 2018). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine frühere Exposition und Inkorporation von Radionukliden in Wismut Bergarbeitern nicht zu einer anhaltenden, erhöhten Frequenz von DNA Strangbrüchen führte und ein Einfluss der Höhe der Radonexposition wurde ebenfalls nicht gefunden (Popp et al. 2000).

Ein direkter und eindeutiger Nachweis der vergangenen, chronischen Strahlenexposition war mithilfe der semi-automatischen Reparaturfoci-Analyse in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht möglich. Ebenso konnte kein deutlicher Zusammenhang zwischen Expositionshöhe und der Signalisierung und Reparatur von DSB hergestellt werden. Möglicherweise ist das auf die hohe Schwankung in der absoluten Signalanzahl zurückzuführen. Neben der zu erwartenden interindividuellen Variabilität wurde daher die interexperimentelle Variation untersucht (Hall et al. 2017). Dabei zeigte sich für die untersuchten Proteine mit zunehmender Signalanzahl in Folge der zunehmenden Bestrahlungsdosis eine niedrigere Abweichung zwischen den Versuchen. Die niedrigste Variation wurde für 53BP1 nach 1 Gy beobachtet. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Schwankungen kleiner werden, je stärker und deutlicher das zu detektierende Signal der RIF ist und bei hohen Hintergrundfärbungen oder intensitätsschwachen Signalen die Abweichungen in der absoluten Foci Anzahl zwischen Versuchen zunimmt.

Trotz einheitlicher Protokolle, Chemikalien und Laborausstattung sind die interexperimentellen Abweichungen daher auf die durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung und die anschließende mikroskopische Messung zurückzuführen und decken sich mit zahlreichen, vorhergehenden Untersuchungen zur  $\gamma$ H2A.X Foci Analyse (Rothkamm, Barnard, et al. 2013; Barnard et al. 2015; Sánchez-Flores et al. 2015; Vandevoorde et al. 2015). Die Zellqualität kann durch den Transport der Vollblutproben aus den Untersuchungszentren und die Weiterverarbeitung für die Kryokonservierung beeinflusst sein.

Des Weiteren konnte in den Versuchen ein Einfluss der Probenposition im Bestrahlungsfeld festgestellt werden. Selbst bei kleinen Entfernungen von wenigen Zentimetern zum Zentrum des Bestrahlungsfeldes konnte ein Unterschied in der Dosis zwischen dem Zentrum und den benachbarten Proben ermittelt werden (Trinkl et al. 2020). Kleine Veränderungen und Effekte in der absoluten Foci Anzahl können aus diesen Gründen verloren gehen. In einer weiteren Evaluation der Untersuchungsergebnisse sollte die hier durchgeführte statistische Analyse erweitert werden und die Einflussfaktoren der Versuchseffekte in statistische Modelle einbezogen werden. Zusätzlich sollten die Metadaten der einzelnen Probanden (Alter, Gesundheitsstatus, Lebensstil) oder die Expositionshöhe gegenüber Alpha- und Gamma-Strahlung berücksichtigt werden.

Mithilfe einer manuellen Zählung könnten die erhobenen Ergebnisse bestätigt werden und die Quantifizierung von kolokalisierten  $\gamma$ H2A.X und 53BP1 Foci kann weitere Erkenntnisse zur Signalisierung und Reparatur von DSB liefern.

### **5.3.3 Kryokonservierte Lymphozyten eignen sich zur Auswertung von Chromosomenschäden mittels mFISH Analyse**

Der direkte Nachweis von DSB, die *in vivo* in strahlenexponierten Individuen entstanden sind, ist mithilfe der Reparaturfoci-Analyse in kryokonservierten Lymphozyten somit nicht ohne weiteres möglich. Alternativ können jedoch chromosomale Aberrationen als Endresultat und Qualitätsmerkmal der DNA Reparatur untersucht werden. Durch ionisierende Strahlung hervorgerufene Chromosomenschäden werden in der biologischen, retrospektiven Dosimetrie genutzt, da diese über mehrere Zellteilungen oder sogar viele Jahre in den Zellen nachgewiesen werden können (Lucas et al. 1992; Morgan WF and Sowa 2005). Es wurde daher ein Verfahren zum schonenden Auftauen von kryokonservierten Lymphozyten und anschließender Stimulierung etabliert und der Einfluss der FBS Konzentration im Einfriermedium untersucht.

Nach der Kryokonservierung wurden 54,9 % bis 72,8 % der tiefgefrorenen Lymphozyten wieder in Kultur gebracht von denen 96 % vital waren. Diese Werte sind vergleichbar mit anderen Auftauverfahren bei denen zwischen 52 % bis 94 % der eingefrorenen Lymphozyten mit einer Vitalität zwischen 90 % und 100 % wieder in Kultur gebracht wurden (Sears and Rosenberg 1977; Karpovitch et al. 1980; Hviid et al. 1993). Der größte Zellverlust wird durch die Lymphozytenisolierung vor der Kryokonservierung und die zahlreichen Waschschrte verursacht (Ho et al. 2011). Während in den hier durchgeführten Untersuchungen die FBS Konzentration im Einfriermedium keinen bedeutsamen Einfluss auf die Anzahl oder Viabilität der Lymphozyten hatte, konnten Li et al. 2009 zeigen, dass Einfriermedium mit 40 % Serum eine höhere Viabilität zur Folge hat im Vergleich zu Einfriermedium mit einem niedrigeren Serumgehalt (Li et al. 2009).

Einen deutlich größeren Einfluss hat die Lagerung des frischen Vollblutes vor der Kryokonservierung. Bei sofortiger Isolierung kann mit 98 % vitaler Lymphozyten gerechnet werden, während 24h nach der Blutabnahme nur noch 90 % bis 95 % der Lymphozyten vital sind (McFee et al. 1997). Zusätzlich sollten Proben bei Raumtemperatur gelagert werden und hohe Temperaturschwankungen vermieden werden, da die Viabilität durch Hämolyse abnimmt (McFee et al. 1997). Übereinstimmend mit vorhergehenden Untersuchungen, konnten kryokonservierte Lymphozyten durch Zugabe von PHA in das Kulturmedium stimuliert werden, jedoch wurde ein geringerer Mitoseindex im Vergleich zu Vollblut beobachtet (Sears and Rosenberg 1977; Littlefield et al. 1987). Das Einfrieren und Auftauen von bestrahlten Zellen könnte durch eine Verstärkung des strahlen-induzierten Zelltodes die Anzahl der geschädigten Zellen reduzieren und damit zu einer Unterschätzung der Aberrationszahl (Chambrette et al. 1996).

In den hier durchgeführten Untersuchungen ist eine mFISH Färbung der Chromosomen von kryokonservierten Lymphozyten bis zu sechs bis acht Jahre nach der Probengewinnung gelungen. In zahlreichen Vergleichsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Kryokonservierung keinen Einfluss auf die Anzahl dizentrischer Chromosomen, zentrischer Ringe, azentrischer Fragmente, Deletionen, weiteren Aberrationen und auf vorhandene Klone mit chromosomalen Aberrationen hat (Tomkins and Scheid 1986; Littlefield et al. 1987; Chambrette et al. 1996; Karhu et al. 2002). Allerdings wurde in einzelnen Untersuchungen beobachtet, dass die Anzahl der Chromatidaberrationen erhöht sein kann (Littlefield et al. 1987). Zusätzlich kann ebenfalls die Lagerung des Vollblutes vor der Kryokonservierung die Anzahl der Aberrationen verändern (Belloni et al. 2010).

In der Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Stimulierung von kryokonservierten Lymphozyten nach einer jahrelangen Lagerung möglich ist und eine spezifische mFISH Färbung von Chromosomen durchgeführt werden kann. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die Untersuchung von Chromosomenschäden von strahlenexponierten Individuen und die Möglichkeit zum Aufbau von strahlenexponierten Kollektiven insbesondere wenn die Untersuchung zum Zeitpunkt der Blutabnahme oder Materialgewinnung aufgrund einer großen Probenanzahl nicht möglich ist.

#### **5.3.4 mFISH Analyse gibt Hinweise auf eine vergangene und chronische Strahlenexposition bei Wismut Bergarbeitern**

Aufgrund einer chronischen Strahlenexposition könnte die Anzahl von chromosomalen Aberrationen aufgrund verschiedener Ursachen erhöht sein.

Erstens, in Folge der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung werden periphere Leukozyten geschädigt und können Jahre nach der Exposition noch Aberrationen aufweisen (Pernot et al. 2012; Gregoire et al. 2018; Herate and Sabatier 2020).

Zweitens, Stammzellen im blutbildenden Gewebe werden geschädigt und die daraus entstehenden Klone weisen Chromosomenschäden auf (Lindholm and Edwards 2004; Cho et al. 2015; Herate and Sabatier 2020).

Drittens, Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu exponierten Zellen könnten ungezielte Effekte (*Bystander*-Effekte) zeigen, wodurch genomische Instabilität einige Zellgenerationen nach einer Exposition beobachtet werden könnten (Marder and Morgan 1993; Morgan WF and Sowa 2005).

Daher wurde die Anzahl der Chromosomenschäden mittels mFISH Analyse bestimmt und der Einfluss der Höhe der chronischen Strahlenexposition untersucht. Durch die Verwendung von fluoreszenz-markierten Chromosomsonden ermöglicht die mFISH Technik die Detektion von vollständigen und unvollständigen Translokationen, komplexen Aberrationen, Ringchromosomen, dizentrischen Chromosomen, Chromosomenbrüchen ohne Austausch, Insertionen und Chromatidaberrationen (Kuechler et al. 2002; Keller, Grabenbauer, et al. 2004; Liehr et al. 2013). Dabei zeigten ehemalige Bergarbeiter einen Anstieg von geschädigten Zellen und Brüchen pro Zelle mit steigender absorbierte Gesamtdosis auf das rote Knochenmark. Allerdings wurde dieser Anstieg nicht in einer Analyse nach gruppierter RBM Dosis festgestellt und es wurde kein Anstieg mit steigender Radonbelastung ermittelt. In der retrospektiven Dosisabschätzung ist ein Nachweis der Strahlenbelastung anhand der Frequenz stabiler Translokationen prinzipiell über 30 bis 50 Jahre nach einer Exposition von über 0,3 Gy möglich, da diese für die Zelle bei der Zellteilung nicht letal sind (Bender, Awa, et al. 1988; Lucas et al. 1992; McFee et al. 1997; Vozilova et al. 2013; Cho et al. 2015; Hall et al. 2017; Gregoire et al. 2018). In früheren Untersuchungen von ehemaligen Arbeitern des Nuklearkomplexes Sellafield, der Mayak Kernwaffenfabrik in Chelyabinsk und Exponierten bei Atombombentests konnte eine erhöhte Translokationsrate und eine erhöhte Anzahl von komplexen Aberrationen Jahrzehnte nach der Exposition beobachtet werden und damit die Eignung von Translokationen als Marker für eine Exposition gegenüber Gamma-Strahlung und komplexe Aberrationen als Marker für eine Exposition gegenüber Alpha-Strahlung zeigen (Hande et al. 2003; Tawn et al. 2004; Anderson et al. 2005; Hande et al. 2005; Sotnik et al. 2014; Vozilova et al. 2014; Gregoire et al. 2018).

Die Wismut Uranbergarbeiter waren sowohl gegenüber Gamma-Strahlung als auch Alpha-Strahlung (Zerfall von Radon) exponiert (Robertson et al. 2013; Schnelzer et al. 2014). Bei Betrachtung der Aberrationsklassen in der hier durchgeführten mFISH Analyse wurden vollständige Translokationen am häufigsten mit im Mittel 2,6 Translokationen pro 100 Zellen gefunden.

Diese Rate ist vergleichbar mit der Rate von  $2,2 \pm 0,5$  Translokationen pro 100 Zellen in ehemaligen Mayak Arbeitern, die ebenfalls vor Jahrzehnten gegenüber externer Gamma-Strahlung und interner Alpha-Strahlung exponiert waren (Sotnik et al. 2014). In früheren Studien wurde in der Normalbevölkerung eine altersabhängige Zunahme der Translokationen festgestellt und eine Hintergrundrate von 1,5 – 1,8 Translokationen in 100 Zellen von Probanden ab einem Alter von 70 Jahren beobachtet (Whitehouse et al. 2005; Sigurdson et al. 2008). Trotz der höheren Translokationsrate in ehemaligen Bergarbeitern im Vergleich zur Normalbevölkerung wurde kein Anstieg der Rate mit steigender Expositionshöhe ermittelt. Wolf et al. (2004) fanden mittels klassischer Giemsa-Färbung bei 60 ehemaligen Wismut Bergarbeitern ebenfalls eine erhöhte Anzahl von chromosomalen Aberrationen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, wobei kein Einfluss der Expositionshöhe und keine Unterschiede zu ehemaligen Kohlebergarbeitern gefunden wurde (Wolf et al. 2004).

Die Anzahl der Translokationen in Wismut Bergarbeitern könnte daher ebenso durch die hohe, natürlich-vorkommende Radonbelastung in den Bergbaugebieten, die Exposition gegenüber Chemikalien und Umweltnoxen, der schlechte allgemeine Gesundheitsstatus, die Medikation, zahlreiche vergangene Röntgenuntersuchungen oder Zigaretten-Konsum erhöht werden (Smith et al. 1998; Maeng et al. 2004; Wolf et al. 2004; Sigurdson et al. 2008; Beinke and Meineke 2012). Zusätzlich beeinflusst die hohe, altersabhängige Hintergrundrate der Translokationen die Sensitivität der Analyse, wodurch kleine Effekte möglicherweise nicht mehr detektiert werden können (Beinke and Meineke 2012; Gregoire et al. 2018). Im Gegensatz zu den Translokationen konnte für komplexe Aberrationen bei den Wismut Bergarbeitern sowohl in der kontinuierlichen Analyse der RBM Dosis als auch in Analysen nach gruppierter RBM Dosis und gruppierter Radonbelastung ein Anstieg in der Rate komplexer Aberrationen mit steigender Exposition beobachtet werden und damit einen Hinweis auf die vergangene, chronische Exposition geben.

Die Anzahl von dizentrischen Chromosomen in peripheren, mononukleären Blutzellen wird aufgrund der geringen Häufigkeit in unbestrahlten Proben (durchschnittlich 1 in 1000 Zellen) bereits seit den 1960er Jahren für den Nachweis einer Strahlenexposition und die retrospektive, biologische Dosisabschätzung genutzt (Bender and Gooch 1962; Lucas et al. 1992). Allerdings handelt es sich um instabile Aberrationen, die durch Zellteilungen oder im Zuge der Neubildung von Leukozyten verloren gehen können und dadurch die Zeitspanne zwischen Exposition und Analyse auf durchschnittlich 110 bis 470 Tage begrenzt ist (Lucas et al. 1992; McFee et al. 1997; Natarajan et al. 1998; Balajee and Hande 2018). Einzelne, langlebige T-Zellen können allerdings eine Lebensdauer von bis zu 6,3 Jahre haben und damit Jahre nach einer Exposition Aberrationen aufweisen (Bogen 1993).

Dizentrische Chromosomen wurden mit der geringsten Häufigkeit aller beobachteten Chromosomenaberration mit im Mittel 2,4 Aberrationen in 1000 Zellen ermittelt. Im Einklang mit der sehr lang zurückliegenden Exposition von mehr als 20 Jahren wurde kein Einfluss der Höhe der chronischen Strahlenexposition auf die Anzahl der dizentrischen Chromosomen beobachtet. Allerdings konnte in einer Studie zu ungarischen Uranbergarbeitern 8 bis 25 Jahre nach der Exposition eine erhöhte Frequenz mit steigender WLM Dosis von di- und azentrischen Chromosomen gefunden werden, die Hinweise auf genomische Instabilität geben können (Mészáros et al. 2004; Vozilova et al. 2013). Weitere Untersuchungen von Wismut-Bergarbeitern und tschechischen Uranbergarbeitern, bei denen instabile Aberrationen unter anderem mithilfe des Mikronuklei-Test nachgewiesen wurden, gaben ebenfalls Hinweise auf genomische Instabilität (Popp et al. 2000; Kryscio et al. 2001; Zölzer et al. 2012; Herate and Sabatier 2020).

Bei allen untersuchten Aberrationsklassen wurde beobachtet, dass Individuen mit vergleichsweise hohen Aberrationsrate eine niedrige Exposition aufweisen können und umgekehrt. Die verwendete Korrelation ist nicht robust durch diese Ausreißer und kann dadurch verzerrt werden. Außerdem treten die ermittelten Aberrationen mit einer sehr geringen Häufigkeit auf und können die Analyse beeinflussen. Berücksichtigt werden muss zusätzlich, dass die Vollblutproben und kryokonservierten Lymphozyten von verschiedenen Experimentatoren ausgewertet wurden und dadurch die Korrelation verzerrt werden kann.

Die Anzahl der untersuchten Probanden sollte daher für Vollblutproben und kryokonservierte Lymphozyten möglichst hoch sein und die Auswertungsmethoden sowie die Metadaten der einzelnen Probanden sollten im Rahmen von statistischen Modellen in die Analyse einbezogen werden, um mögliche Einflussfaktoren zu identifizieren. In zukünftigen Untersuchungen können die Ergebnisse der mFISH Auswertung mit der Exposition gegenüber Alpha- oder Gamma-Strahlung korreliert werden, um die hier erhaltenen Ergebnisse zur Anzahl der Translokationen und komplexen Aberrationen genauer zu untersuchen. Die Unterteilung der analysierten Zellen nach stabilen und instabilen Aberrationen kann weitere Erkenntnisse zur vergangenen Strahlenexposition geben, wobei vermutlich nach der langen, zurückliegenden Expositionszeit der Großteil der Zellen stabile Aberrationen aufweisen sollten (Lindholm and Edwards 2004; Gregoire et al. 2006). Mithilfe dieser weiterführenden Untersuchungen können möglicherweise weitere Effekte der chronischen Strahlenexposition nachgewiesen werden. In der hier durchgeführten mFISH Analyse kann die erhöhte Anzahl der Translokationen mit der Tätigkeit der untersuchten Bergarbeiter in Verbindung stehen und die Anzahl der komplexen Aberrationen einen Hinweis auf die Höhe der chronischen Strahlenexposition der Wismut Bergarbeiter geben. Die Untersuchungen zeigten jedoch, dass die mFISH Analyse aufgrund des hohen Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwandes nicht für Routineuntersuchungen und molekular-epidemiologische Studien mit einer Vielzahl von Probanden geeignet ist.

## 6. Verzeichnis

### 6.1 Bibliografie

- Abate-Shen C. 2002. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer*. 2(10):777-785. eng.
- Allione A, Porcedda P, Russo A, Ricceri F, Simonelli V, Minoprio A, Guarrera S, Pardini B, Mazzei F, Dogliotti E et al. 2013. Effect of blood storage conditions on DNA repair capacity measurements in peripheral blood mononuclear cells. *Mutat Res*. 749(1-2):73-79. eng.
- Anderson RM, Tsepenko VV, Gasteva GN, Molokanov AA, Sevan'kaev AV, Goodhead DT. 2005. mFISH analysis reveals complexity of chromosome aberrations in individuals occupationally exposed to internal plutonium: a pilot study to assess the relevance of complex aberrations as biomarkers of exposure to high-LET alpha particles. *Radiat Res*. 163(1):26-35. eng.
- Aurias A, Dutrillaux B, Buriot D, Lejeune J. 1980. High frequencies of inversions and translocations of chromosomes 7 and 14 in ataxia telangiectasia. *Mutat Res*. 69(2):369-374. eng.
- Averbeck D, Candéias S, Chandna S, Foray N, Friedl AA, Haghdoost S, Jeggo PA, Lumniczky K, Paris F, Quintens R et al. 2020. Establishing mechanisms affecting the individual response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 96(3):297-323. eng.
- Awa AA, Neel JV. 1986. Cytogenetic "rogue" cells: what is their frequency, origin, and evolutionary significance? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(4):1021-1025. eng.
- Bakkenist CJ, Kastan MB. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 421(6922):499-506. eng.
- Bakr A, Oing C, Kocher S, Borgmann K, Dornreiter I, Petersen C, Dikomey E, Mansour WY. 2015. Involvement of ATM in homologous recombination after end resection and RAD51 nucleofilament formation. *Nucleic Acids Res*. 43(6):3154-3166.
- Balajee AS, Hande MP. 2018. History and evolution of cytogenetic techniques: Current and future applications in basic and clinical research. *Mutat Res*. 836(Pt A):3-12. eng.
- Balajee AS, Sanders JT, Gollosi R, Shuryak I, McCord RP, Dainiak N. 2018. Investigation of Spatial Organization of Chromosome Territories in Chromosome Exchange Aberrations After Ionizing Radiation Exposure. *Health Phys*. 115(1):77-89. eng.
- Baranger L, Szapiro N, Gardais J, Hillion J, Derre J, Francois S, Blanchet O, Boasson M, Berger R. 1994. Translocation t(5;12)(q31-q33;p12-p13): a non-random translocation associated with a myeloid disorder with eosinophilia. *Br J Haematol*. 88(2):343-347. eng.
- Barnard S, Ainsbury EA, Al-hafidh J, Hadjidekova V, Hristova R, Lindholm C, Monteiro Gil O, Moquet J, Moreno M, Rossler U et al. 2015. The first gamma-H2AX biodosimetry intercomparison exercise of the developing European biodosimetry network RENEB. *Radiation protection dosimetry*. 164(3):265-270.
- Barnes DE. 2001. Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair. *Curr Biol*. 11(12):R455-457. eng.
- Barnett GC, Kerns SL, Noble DJ, Dunning AM, West CM, Burnet NG. 2015. Incorporating Genetic Biomarkers into Predictive Models of Normal Tissue Toxicity. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 27(10):579-587. eng.
- Bazyka D, Iliencko I, Sushko V, Loganovsky K, Lyashenko L, Golyarnik N, Lyaskivska O, Nechaev S, Shvayko L, Bazyka K et al. 2018. BIOLOGICAL MARKERS OF EXTERNAL AND INTERNAL EXPOSURE IN SHELTER CONSTRUCTION WORKERS: A 13-YEAR EXPERIENCE. *Radiation protection dosimetry*. 182(1):146-153. eng.
- Becker-Catania SG, Chen G, Hwang MJ, Wang Z, Sun X, Sanal O, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Chessa L, Lee EY, Gatti RA. 2000. Ataxia-telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity. *Mol Genet Metab*. 70(2):122-133. eng.

- Beinke C, Meineke V. 2012. High potential for methodical improvements of FISH-based translocation analysis for retrospective radiation biodosimetry. *Health Phys.* 103(2):127-132. eng.
- Belli M, Tabocchini MA. 2020. Ionizing Radiation-Induced Epigenetic Modifications and Their Relevance to Radiation Protection. *International journal of molecular sciences.* 21(17). eng.
- Belloni P, Meschini R, Palitti F. 2008. Effects of storage conditions of human whole blood on the viability of lymphocytes. *Int J Radiat Biol.* 84(7):613-619. eng.
- Belloni P, Pepe G, Palitti F. 2010. Effect of storage conditions of blood on radiation-induced chromosomal aberrations and apoptosis in human lymphocytes. *Mutat Res.* 695(1-2):35-39. eng.
- Bender MA, Awa AA, Brooks AL, Evans HJ, Groer PG, Littlefield LG, Pereira C, Preston RJ, Wachholz BW. 1988. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutat Res.* 196(2):103-159. eng.
- Bender MA, Gooch PC. 1962. Types and rates of x-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 48(4):522-532. eng.
- Bender MA, Preston RJ, Leonard RC, Pyatt BE, Gooch PC, Shelby MD. 1988. Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. *Mutat Res.* 204(3):421-433. eng.
- Bender MA, Rary JM, Kale RP. 1985. G<sub>0</sub> chromosomal radiosensitivity in ataxia telangiectasia lymphocytes. *Mutat Res.* 150(1-2):277-282. eng.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological).* 57(1):289-300.
- Bensimon A, Schmidt A, Ziv Y, Elkon R, Wang SY, Chen DJ, Aebbersold R, Shiloh Y. 2010. ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage. *Science signaling.* 3(151):rs3. eng.
- Berthel E, Ferlazzo ML, Devic C, Bourguignon M, Foray N. 2019. What Does the History of Research on the Repair of DNA Double-Strand Breaks Tell Us?-A Comprehensive Review of Human Radiosensitivity. *International journal of molecular sciences.* 20(21). eng.
- Blackford AN, Jackson SP. 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell.* 66(6):801-817. eng.
- Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier-Depois JF, Victor JM, Maalouf M, Fares G, Foray N. 2013. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J Theor Biol.* 333:135-145. eng.
- Bogen KT. 1993. Reassessment of human peripheral T-lymphocyte lifespan deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation. *Int J Radiat Biol.* 64(2):195-204. eng.
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y. 2008. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer.* 8(12):957-967. eng.
- Borras-Fresneda M, Barquinero JF, Gomolka M, Hornhardt S, Rossler U, Armengol G, Barrios L. 2016. Differences in DNA Repair Capacity, Cell Death and Transcriptional Response after Irradiation between a Radiosensitive and a Radioresistant Cell Line. *Sci Rep.* 6:27043. eng.
- Bouquet F, Muller C, Salles B. 2006. The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell cycle.* 5(10):1116-1122. eng.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254. eng.
- Broeks A, de Klein A, Floore AN, Muijtjens M, Kleijer WJ, Jaspers NG, van 't Veer LJ. 1998. ATM germline mutations in classical ataxia-telangiectasia patients in the Dutch population. *Hum Mutat.* 12(5):330-337. eng.
- Bryant PE, Riches AC, Terry SY. 2010. Mechanisms of the formation of radiation-induced chromosomal aberrations. *Mutat Res.* 701(1):23-26. eng.

- Bucher M, Duchrow L, Endesfelder D, Roessler U, Gomolka M. 2020. Comparison of inexperienced operators and experts in  $\gamma$ H2A.X and 53BP1 foci assay for high-throughput biodosimetry approaches in a mass casualty incident. *Int J Radiat Biol.* 1-28. eng.
- Bucher M, Endesfelder D, Rößler U, Borkhardt A, Dückers G, Kirlum H, Lankisch P, Oommen P, Niehus T, Rube C et al. 2020. Analysis of chromosomal aberrations and  $\gamma$ H2A.X foci to identify radiation-sensitive ataxia-telangiectasia patients. *submitted*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.
- Callen E, Jankovic M, Wong N, Zha S, Chen HT, Difilippantonio S, Di Virgilio M, Heidkamp G, Alt FW, Nussenzweig A et al. 2009. Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *Mol Cell.* 34(3):285-297. eng.
- Caron P, Choudjaye J, Clouaire T, Bugler B, Daburon V, Aguirrebengoa M, Mangeat T, Iacovoni JS, Alvarez-Quilon A, Cortes-Ledesma F et al. 2015. Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Cell reports.* 13(8):1598-1609. eng.
- Carrano AV, Heddle JA. 1973. The fate of chromosome aberrations. *J Theor Biol.* 38(2):289-304. eng.
- Castellvi-Bel S, Sheikhavandi S, Telatar M, Tai LQ, Hwang M, Wang Z, Yang Z, Cheng R, Gatti RA. 1999. New mutations, polymorphisms, and rare variants in the ATM gene detected by a novel SSCP strategy. *Hum Mutat.* 14(2):156-162. eng.
- Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, Fernandez-Capetillo O, Pilch DR, Sedelnikova OA, Eckhaus M, Ried T, Bonner WM, Nussenzweig A. 2003. H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell.* 114(3):371-383. eng.
- Chambrette V, Laroche P, Lataillade JJ, Voisin P. 1996. Technical report: effect of cryopreservation on chromosomal aberration yield in irradiated lymphocytes. *Int J Radiat Biol.* 70(6):671-675. eng.
- Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18(8):495-506. eng.
- Chatterjee A, Saha D, Niemann H, Gryshkov O, Glasmacher B, Hofmann N. 2017. Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. *Cryobiology.* 74:1-7. eng.
- Chauhan V, Howland M, Kutzner B, McNamee JP, Bellier PV, Wilkins RC. 2012. Biological effects of alpha particle radiation exposure on human monocytic cells. *Int J Hyg Environ Health.* 215(3):339-344. eng.
- Cho MS, Lee JK, Bae KS, Han EA, Jang SJ, Ha WH, Lee SS, Barquinero JF, Kim WT. 2015. Retrospective biodosimetry using translocation frequency in a stable cell of occupationally exposed to ionizing radiation. *J Radiat Res.* 56(4):709-716. eng.
- Chun HH, Gatti RA. 2004. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst).* 3(8-9):1187-1196. Eng.
- Clouaire T, Marnef A, Legube G. 2017. Taming Tricky DSBs: ATM on duty. *DNA Repair (Amst).* eng.
- Concannon P, Gatti RA. 1997. Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat.* 10(2):100-107. eng.
- Cornforth MN, Bedford JS. 1985. On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia. *Science.* 227(4694):1589-1591. eng.
- Crawford TO, Skolasky RL, Fernandez R, Rosquist KJ, Lederman HM. 2006. Survival probability in ataxia telangiectasia. *Arch Dis Child.* 91(7):610-611.
- Crompton NE. 1997. Telomeres, senescence and cellular radiation response. *Cell Mol Life Sci.* 53(7):568-575. eng.
- Crompton NE, Ozsahin M. 1997. A versatile and rapid assay of radiosensitivity of peripheral blood leukocytes based on DNA and surface-marker assessment of cytotoxicity. *Radiat Res.* 147(1):55-60. eng.

- Demuth I, Dutrannoy V, Marques W, Jr., Neitzel H, Schindler D, Dimova PS, Chrzanowska KH, Bojinova V, Gregorek H, Graul-Neumann LM et al. 2011. New mutations in the ATM gene and clinical data of 25 AT patients. *Neurogenetics*. 12(4):273-282. eng.
- Devic C, Ferlazzo ML, Berthel E, Foray N. 2020. Influence of Individual Radiosensitivity on the Hormesis Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleoshuttling of ATM Protein. *Dose Response*. 18(2):1559325820913784. eng.
- Ding D, Zhang Y, Wang J, Wang X, Fan D, He L, Zhang X, Gao Y, Li Q, Chen H. 2016. gamma-H2AX/53BP1/pKAP-1 foci and their linear tracks induced by in vitro exposure to radon and its progeny in human peripheral blood lymphocytes. *Sci Rep*. 6:38295. eng.
- Durdik M, Kosik P, Gursky J, Vokalova L, Markova E, Belyaev I. 2015. Imaging flow cytometry as a sensitive tool to detect low-dose-induced DNA damage by analyzing 53BP1 and gammaH2AX foci in human lymphocytes. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 87(12):1070-1078. eng.
- Duthie SJ, Pirie L, Jenkinson AM, Narayanan S. 2002. Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability. *Mutagenesis*. 17(3):211-214. eng.
- Eidinoff ML, Cheong L, Rich MA. 1959. Incorporation of unnatural pyrimidine bases into deoxyribonucleic acid of mammalian cells. *Science*. 129(3362):1550-1551. eng.
- Eng L, Coutinho G, Nahas S, Yeo G, Tanouye R, Babaei M, Dork T, Burge C, Gatti RA. 2004. Nonclassical splicing mutations in the coding and noncoding regions of the ATM Gene: maximum entropy estimates of splice junction strengths. *Hum Mutat*. 23(1):67-76. eng.
- Falck J, Coates J, Jackson SP. 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*. 434(7033):605-611. eng.
- Falk M, Falková I, Kopečná O, Bačíková A, Pagáčová E, Šimek D, Golan M, Kozubek S, Pekarová M, Follett SE et al. 2018. Chromatin architecture changes and DNA replication fork collapse are critical features in cryopreserved cells that are differentially controlled by cryoprotectants. *Sci Rep*. 8(1):14694.
- Ferlazzo ML, Bourguignon M, Foray N. 2017. Functional Assays for Individual Radiosensitivity: A Critical Review. *Semin Radiat Oncol*. 27(4):310-315. eng.
- Fokkema IF, den Dunnen JT, Taschner PE. 2005. LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach. *Hum Mutat*. 26(2):63-68. eng. <https://databases.lovd.nl/shared/view/ATM>
- Gajski G, Gerić M, Živković Semren T, Tariba Lovaković B, Oreščanin V, Pizent A. 2020. Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage from frozen human whole blood samples: Implications for human biomonitoring. *Toxicol Lett*. 319:58-65. eng.
- Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K et al. 1988. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature*. 336(6199):577-580. eng.
- Gatti RA, Good RA. 1971. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer*. 28(1):89-98. eng.
- Ghardi M, Moreels M, Chatelain B, Chatelain C, Baatout S. 2012. Radiation-induced double strand breaks and subsequent apoptotic DNA fragmentation in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Mol Med*. 29(5):769-780. eng.
- Gilda JE, Gomes AV. 2013. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots. *Anal Biochem*. 440(2):186-188. eng.
- Gomolka M, Blyth B, Bourguignon M, Badie C, Schmitz A, Talbot C, Hoeschen C, Salomaa S. 2020. Potential screening assays for individual radiation sensitivity and susceptibility and their current validation state. *Int J Radiat Biol*. 96(3):280-296. eng.
- Gomolka M, Bucher M. 2019. Die Deutsche Uranbergarbeiter Biobank. *Krankenhaus & Management*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1.

- Gomolka M, Oestreicher U, Rossler U, Samaga D, Endesfelder D, Lang P, Neumaier K, Belka C, Niemeyer M, Kiechle M et al. 2018. Age-dependent differences in DNA damage after in vitro CT exposure. *Int J Radiat Biol.* 94(3):272-281. eng.
- Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M, Jeggo PA. 2008. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell.* 31(2):167-177. eng.
- Gotoff SP, Amirmokri E, Liebner EJ. 1967. Ataxia Telangiectasia: Neoplasia, Untoward Response to X-Irradiation, and Tuberous Sclerosis. *JAMA Pediatrics.* 114(6):617-625.
- Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, Pereira S, Sonzogni L, Forcheron F, Viau M et al. 2016. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 94(3):450-460. eng.
- Gregoire E, Roy L, Buard V, Delbos M, Durand V, Martin-Bodiot C, Voisin P, Sorokine-Durm I, Vaurijoux A, Voisin P et al. 2018. Twenty years of FISH-based translocation analysis for retrospective ionizing radiation biodosimetry. *Int J Radiat Biol.* 94(3):248-258. eng.
- Gregoire E, Sorokine-Durm I, Bertho JM, Jacquet N, Delbos M, Demarquay C, Voisin P, Roy L. 2006. Follow-up of stable chromosomal aberrations in gamma-ray irradiated non-human primates. *Int J Radiat Biol.* 82(7):493-502. eng.
- Greipp PT, Dewald GW, Tefferi A. 2004. Prevalence, breakpoint distribution, and clinical correlates of t(5;12). *Cancer Genet Cytogenet.* 153(2):170-172. eng.
- Greve B, Bolling T, Amler S, Rossler U, Gomolka M, Mayer C, Popanda O, Dreffke K, Rickinger A, Fritz E et al. 2012. Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison--lessons for future studies. *PLoS One.* 7(10):e47185.
- Guleria A, Chandna S. 2016. ATM kinase: Much more than a DNA damage responsive protein. *DNA Repair (Amst).* 39:1-20. eng.
- Gurtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch A. 2013. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem.* 433(2):105-111.
- Hall J, Jeggo PA, West C, Gomolka M, Quintens R, Badie C, Laurent O, Aerts A, Anastasov N, Azimzadeh O et al. 2017. Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies - An update. *Mutat Res.* 771:59-84. eng.
- Hanawalt PC, Sarasin A. 1986. Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. *Trends Genet.* 2:124-129.
- Hande MP, Azizova TV, Burak LE, Khokhryakov VF, Geard CR, Brenner DJ. 2005. Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: an mFISH study. *Genes Chromosomes Cancer.* 44(1):1-9. eng.
- Hande MP, Azizova TV, Geard CR, Burak LE, Mitchell CR, Khokhryakov VF, Vasilenko EK, Brenner DJ. 2003. Past exposure to densely ionizing radiation leaves a unique permanent signature in the genome. *Am J Hum Genet.* 72(5):1162-1170. eng.
- Harper JW, Elledge SJ. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell.* 28(5):739-745. eng.
- Hecht F, Koler R, Rigas D, Dahnke G, Case M, Tisdale V, Miller R. 1966. LEUKÆMIA AND LYMPHOCYTES IN ATAXIA-TELANGIECTASIA. *The Lancet.* 288(7474):1193.
- Herate C, Sabatier L. 2020. Retrospective biodosimetry techniques: Focus on cytogenetics assays for individuals exposed to ionizing radiation. *Mutat Res.* 783:108287. eng.
- Hernández L, Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. 2013. Highly sensitive automated method for DNA damage assessment: gamma-H2AX foci counting and cell cycle sorting. *International journal of molecular sciences.* 14(8):15810-15826. eng.
- Higurashi M, Conen PE. 1973. In vitro chromosomal radiosensitivity in "chromosomal breakage syndromes". *Cancer.* 32(2):380-383. eng.

- Hittelman WN, Pandita TK. 1994. Possible role of chromatin alteration in the radiosensitivity of ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol.* 66(6 Suppl):S109-113. eng.
- Ho CK, Choi SW, Siu PM, Benzie IF. 2011. Cryopreservation and storage effects on cell numbers and DNA damage in human lymphocytes. *Biopreservation and biobanking.* 9(4):343-347. eng.
- Horn S, Barnard S, Rothkamm K. 2011. Gamma-H2AX-based dose estimation for whole and partial body radiation exposure. *PLoS One.* 6(9):e25113.
- Horn S, Rothkamm K. 2011. Candidate protein biomarkers as rapid indicators of radiation exposure. *Radiat Measur.* 46(9):903-906.
- Hornhardt S, Rossler U, Sauter W, Rosenberger A, Illig T, Bickeboller H, Wichmann HE, Gomolka M. 2014. Genetic factors in individual radiation sensitivity. *DNA Repair (Amst).* 16:54-65.
- Huen MS, Chen J. 2008. The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res.* 18(1):8-16. eng.
- Hviid L, Albeck G, Hansen B, Theander TG, Talbot A. 1993. A new portable device for automatic controlled-gradient cryopreservation of blood mononuclear cells. *J Immunol Methods.* 157(1-2):135-142. eng.
- Iacovoni JS, Caron P, Lassadi I, Nicolas E, Massip L, Trouche D, Legube G. 2010. High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* 29(8):1446-1457. eng.
- Inghirami G, Zhu BY, Chess L, Knowles DM. 1990. Flow cytometric and immunohistochemical characterization of the gamma/delta T-lymphocyte population in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. *Am J Pathol.* 136(2):357-367. eng.
- Ivashkevich AN, Martin OA, Smith AJ, Redon CE, Bonner WM, Martin RF, Lobachevsky PN. 2011. gammaH2AX foci as a measure of DNA damage: a computational approach to automatic analysis. *Mutat Res.* 711(1-2):49-60. eng.
- Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S. 1994. Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(13):6098-6102. eng.
- Iyengar S, Farnham PJ. 2011. KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome. *J Biol Chem.* 286(30):26267-26276. eng.
- Jachimowicz RD, Goergens J, Reinhardt HC. 2019. DNA double-strand break repair pathway choice - from basic biology to clinical exploitation. *Cell cycle.* 18(13):1423-1434. eng.
- Jacoby MA, De Jesus Pizarro RE, Shao J, Koboldt DC, Fulton RS, Zhou G, Wilson RK, Walter MJ. 2014. The DNA double-strand break response is abnormal in myeloblasts from patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 28(6):1242-1251. eng.
- Jain V, Kumar PR, Koya PK, Jaikrishan G, Das B. 2016. Lack of increased DNA double-strand breaks in peripheral blood mononuclear cells of individuals from high level natural radiation areas of Kerala coast in India. *Mutat Res.* 788:50-57. eng.
- Jain V, Saini D, Kumar PRV, Jaikrishan G, Das B. 2017. Efficient repair of DNA double strand breaks in individuals from high level natural radiation areas of Kerala coast, south-west India. *Mutat Res.* 806:39-50. eng.
- Jeggo PA, Lobrich M. 2006. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst).* 5(9-10):1192-1198.
- Jensen RB, Rothenberg E. 2020. Preserving genome integrity in human cells via DNA double-strand break repair. *Mol Biol Cell.* 31(9):859-865. eng.
- Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Chavaudra N, Favaudon V, Arlett CF, Foray N. 2008. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int J Radiat Biol.* 84(2):107-125. eng.

- Karhu R, Vilpo L, Isola J, Knuutila S, Vilpo J. 2002. Cryopreserved chronic lymphocytic leukemia cells analyzed by multicolor fluorescence in situ hybridization after optimized mitogen stimulation. *Genes Chromosomes Cancer*. 34(3):345-348. eng.
- Karpovitch XL, Rosenkovitch E, Ben-Basset H, Izak G. 1980. Structure and functional alterations in lymphocytes induced by cryopreservation. *Cryobiology*. 17(1):12-17. eng.
- Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Little JB, Bedford JS. 2006. Levels of gamma-H2AX Foci after low-dose-rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two at families and in another apparently normal individual. *Radiat Res*. 166(3):443-453. eng.
- Kawata T, Ito H, George K, Wu H, Uno T, Isobe K, Cucinotta FA. 2003. Radiation-induced chromosome aberrations in ataxia telangiectasia cells: high frequency of deletions and misrejoining detected by fluorescence in situ hybridization. *Radiat Res*. 159(5):597-603. eng.
- Keimling M, Volcic M, Csernok A, Wieland B, Dörk T, Wiesmüller L. 2011. Functional characterization connects individual patient mutations in ataxia telangiectasia mutated (ATM) with dysfunction of specific DNA double-strand break-repair signaling pathways. *FASEB J*. 25(11):3849-3860. eng.
- Keller U, Grabenbauer G, Kuechler A, Sauer R, Distel L. 2004. Technical report. Radiation sensitivity testing by fluorescence in-situ hybridization: how many metaphases have to be analysed? *Int J Radiat Biol*. 80(8):615-620. eng.
- Keller U, Kuechler A, Liehr T, Muller E, Grabenbauer G, Sauer R, Distel L. 2004. Impact of various parameters in detecting chromosomal aberrations by FISH to describe radiosensitivity. *Strahlenther Onkol*. 180(5):289-296. eng.
- Khanna KK, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 27(3):247-254. eng.
- Koppen G, De Prins S, Jacobs A, Nelen V, Schoeters G, Langie SAS. 2018. The comet assay in human biomonitoring: cryopreservation of whole blood and comparison with isolated mononuclear cells. *Mutagenesis*. 33(1):41-47. eng.
- Koppisch D, Hagemeyer O, Friedrich K, Butz M, Otten H. 2004. Das Berufskrankheitengeschehen im Uranerzbergbau der 'Wismut' von 1946–2000. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed*. 39:120-128.
- Kreuzer M, Brachner A, Lehmann F, Martignoni K, Wichmann HE, Grosche B. 2002. Characteristics of the German uranium miners cohort study. *Health Phys*. 83(1):26-34. eng.
- Kreuzer M, Dufey F, Sogl M, Schnelzer M, Walsh L. 2013. External gamma radiation and mortality from cardiovascular diseases in the German WISMUT uranium miners cohort study, 1946-2008. *Radiat Environ Biophys*. 52(1):37-46.
- Kreuzer M, Grosche B, Dufey F, Schnelzer M, Tschense A, Walsh L. 2011. The German Uranium Miners Cohort Study (Wismut cohort), 1946-2003 : Technical Report.
- Kreuzer M, Schnelzer M, Tschense A, Walsh L, Grosche B. 2010. Cohort profile: the German uranium miners cohort study (WISMUT cohort), 1946-2003. *Int J Epidemiol*. 39(4):980-987. eng.
- Krysto A, Ulrich Muller WU, Wojcik A, Kotschy N, Grobelny S, Streffer C. 2001. A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay. *Int J Radiat Biol*. 77(11):1087-1093. eng.
- Kuechler A, Neubauer S, Grabenbauer GG, Claussen U, Liehr T, Sauer R, Wendt TG. 2002. Is 24-color FISH detection of in-vitro radiation-induced chromosomal aberrations suited to determine individual intrinsic radiosensitivity? *Strahlenther Onkol*. 178(4):209-215. eng.
- Kuhne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Lobrich M. 2004. A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res*. 64(2):500-508. eng.
- Kuhne M, Rothkamm K, Lobrich M. 2000. No dose-dependence of DNA double-strand break misrejoining following alpha-particle irradiation. *Int J Radiat Biol*. 76(7):891-900. eng.

- Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB. 2017. ImerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models [denominator degree of freedom, Satterthwaite's approximation, ANOVA, R, linear mixed effects models, lme4]. 2017. 82(13):26.
- Ladeira C, Koppen G, Scavone F, Giovannelli L. 2019. The comet assay for human biomonitoring: Effect of cryopreservation on DNA damage in different blood cell preparations. *Mutat Res.* 843:11-17. eng.
- Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W et al. 2018. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 46(D1):D1062-d1067. eng. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
- Lavin MF. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(10):759-769. eng.
- Lavin MF, Birrell G, Chen P, Kozlov S, Scott S, Gueven N. 2005. ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res.* 569(1-2):123-132. eng.
- Lavin MF, Khanna KK. 1999. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol.* 75(10):1201-1214. eng.
- Lee JH, Paull TT. 2004. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science.* 304(5667):93-96. eng.
- Lehmann F. 2004. Job-exposure-matrix Ionisierende Strahlung im Uranerzbergbau der ehemaligen DDR (Version 06/2003). Bergbau BG, Gera.
- Lemaître C, Soutoglou E. 2014. Double strand break (DSB) repair in heterochromatin and heterochromatin proteins in DSB repair. *DNA Repair (Amst).* 19:163-168. eng.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 396(6712):643-649. eng.
- Li X, Zhong Z, Liang S, Wang X, Zhong F. 2009. Effect of cryopreservation on IL-4, IFN $\gamma$  and IL-6 production of porcine peripheral blood lymphocytes. *Cryobiology.* 59(3):322-326. eng.
- Liehr T, Starke H, Weise A, Lehrer H, Claussen U. 2004. Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol.* 19(1):229-237. eng.
- Liehr T, Weise A, Hamid AB, Fan X, Klein E, Aust N, Othman MA, Mrasek K, Kosyakova N. 2013. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. Expert review of molecular diagnostics. 13(3):251-255. eng.
- Lindholm C, Edwards A. 2004. Long-term persistence of translocations in stable lymphocytes from victims of a radiological accident. *Int J Radiat Biol.* 80(8):559-566. eng.
- Littlefield LG, Joiner EE, Colyer SP, Frome EL. 1987. Effects of Cryopreservation on the Recovery of Radiation-Induced Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes. *Radiat Prot Dosimet.* 18(1):25-29.
- Liu N, Bryant PE. 1994. Enhanced chromosomal response of ataxia-telangiectasia cells to specific types of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol.* 66(6 Suppl):S115-121. eng.
- Lobrich M, Rief N, Kuhne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, Uder M. 2005. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(25):8984-8989. eng.
- Lorat Y, Fleckenstein J, Görlinger P, Rube C, Rube CE. 2020. Assessment of DNA damage by 53PB1 and pKu70 detection in peripheral blood lymphocytes by immunofluorescence and high-resolution transmission electron microscopy. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft [et al].* 10.1007/s00066-00020-01576-00061. eng.
- Loucas BD, Cornforth MN. 2001. Complex chromosome exchanges induced by gamma rays in human lymphocytes: an mFISH study. *Radiat Res.* 155(5):660-671. eng.
- Lucas JN, Awa A, Straume T, Poggensee M, Kodama Y, Nakano M, Ohtaki K, Weier HU, Pinkel D, Gray J et al. 1992. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 62(1):53-63. eng.

- MacPhail SH, Banáth JP, Yu Y, Chu E, Olive PL. 2003. Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. *Radiat Res.* 159(6):759-767. eng.
- Maeng SH, Chung HW, Kim KJ, Lee BM, Shin YC, Kim SJ, Yu IJ. 2004. Chromosome aberration and lipid peroxidation in chromium-exposed workers. *Biomarkers.* 9(6):418-434. eng.
- Magliozzi M, Piane M, Torrente I, Sinibaldi L, Rizzo G, Savio C, Lulli P, De Luca A, Dallapiccola B, Chessa L. 2006. DHPLC screening of ATM gene in Italian patients affected by ataxia-telangiectasia: fourteen novel ATM mutations. *Dis Markers.* 22(4):257-264. eng.
- Mandigers CM, van de Warrenburg BP, Strobbe LJ, Kluijft I, Molenaar AH, Schinagel DA. 2011. Ataxia telangiectasia: the consequences of a delayed diagnosis. *Radiother Oncol.* 99(1):97-98. eng.
- Marder BA, Morgan WF. 1993. Delayed chromosomal instability induced by DNA damage. *Mol Cell Biol.* 13(11):6667-6677. eng.
- Markova E, Schultz N, Belyaev IY. 2007. Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int J Radiat Biol.* 83(5):319-329.
- Markova E, Torudd J, Belyaev I. 2011. Long time persistence of residual 53BP1/gamma-H2AX foci in human lymphocytes in relationship to apoptosis, chromatin condensation and biological dosimetry. *Int J Radiat Biol.* 87(7):736-745.
- Marková E, Torudd J, Belyaev I. 2011. Long time persistence of residual 53BP1/ $\gamma$ -H2AX foci in human lymphocytes in relationship to apoptosis, chromatin condensation and biological dosimetry. *Int J Radiat Biol.* 87(7):736-745. eng.
- Martin M, Genesca A, Latre L, Ribas M, Miro R, Egozcue J, Tusell L. 2003. Radiation-induced chromosome breaks in ataxia-telangiectasia cells remain open. *Int J Radiat Biol.* 79(3):203-210. eng.
- Martin M, Terradas M, Iliakis G, Tusell L, Genesca A. 2009. Breaks invisible to the DNA damage response machinery accumulate in ATM-deficient cells. *Genes Chromosomes Cancer.* 48(9):745-759. eng.
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lereenthal Y et al. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* 316(5828):1160-1166. eng.
- McFarlin DE, Strober W, Waldmann TA. 1972. Ataxia-telangiectasia. *Medicine (Baltimore).* 51(4):281-314. eng.
- McFee AF, Sayer AM, Salomaa SI, Lindholm C, Littlefield LG. 1997. Methods for improving the yield and quality of metaphase preparations for FISH probing of human lymphocyte chromosomes. *Environ Mol Mutagen.* 29(1):98-104. eng.
- McKinnon PJ. 2004. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO reports.* 5(8):772-776. Eng.
- Meryman HT. 1956. Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science.* 124(3221):515-521. eng.
- Mészáros G, Bognár G, Köteles GJ. 2004. Long-term persistence of chromosome aberrations in uranium miners. *J Occup Health.* 46(4):310-315. eng.
- Milić M, Ožvald I, Vinković Vrček I, Vučić Lovrenčić M, Oreščanin V, Bonassi S, Del Castillo ER. 2019. Alkaline comet assay results on fresh and one-year frozen whole blood in small volume without cryo-protection in a group of people with different health status. *Mutat Res.* 843:3-10. eng.
- Moquet J, Barnard S, Staynova A, Lindholm C, Monteiro Gil O, Martins V, Rossler U, Vral A, Vandevoorde C, Wojewodzka M et al. 2017. The second gamma-H2AX assay inter-comparison exercise carried out in the framework of the European biodosimetry network (RENEB). *Int J Radiat Biol.* 93(1):58-64. eng.
- Morgan JL, Holcomb TM, Morrissey RW. 1968. Radiation Reaction in Ataxia Telangiectasia. *JAMA Pediatrics.* 116(5):557-558.

- Morgan WF, Sowa MB. 2005. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(40):14127-14128. eng.
- Nagel S, Schneider B, Rosenwald A, Meyer C, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RA. 2011. t(4;8)(q27;q24) in Hodgkin lymphoma cells targets phosphodiesterase PDE5A and homeobox gene ZHX2. *Genes Chromosomes Cancer*. 50(12):996-1009. eng.
- Narayanan S, O'Donovan MR, Duthie SJ. 2001. Lysis of whole blood in vitro causes DNA strand breaks in human lymphocytes. *Mutagenesis*. 16(6):455-459. eng.
- Natarajan AT, Meyers M. 1979. Chromosomal radiosensitivity of ataxia telangiectasia cells at different cell cycle stages. *Hum Genet*. 52(1):127-132. eng.
- Natarajan AT, Santos SJ, Darroudi F, Hadjidikova V, Vermeulen S, Chatterjee S, Berg M, Grigorova M, Sakamoto-Hojo ET, Granath F et al. 1998. 137Cesium-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence in situ hybridization: eight years follow up of the Goiânia radiation accident victims. *Mutat Res*. 400(1-2):299-312. eng.
- Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK. 1989. Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry*. 10(1):20-27. eng.
- Neubauer S, Arutyunyan R, Stumm M, Dork T, Bendix R, Bremer M, Varon R, Sauer R, Gebhart E. 2002. Radiosensitivity of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome homozygotes and heterozygotes as determined by three-color FISH chromosome painting. *Radiat Res*. 157(3):312-321. eng.
- Neubauer S, Dunst J, Gebhart E. 1997. The impact of complex chromosomal rearrangements on the detection of radiosensitivity in cancer patients. *Radiother Oncol*. 43(2):189-195. eng.
- Niewald M, Seegenschmiedt MH, Micke O, Gräber S. 2008. Randomized multicenter trial on the effect of radiotherapy for plantar Fasciitis (painful heel spur) using very low doses--a study protocol. *Radiat Oncol*. 3:27. eng.
- Noon AT, Shibata A, Rief N, Loblrich M, Stewart GS, Jeggo PA, Goodarzi AA. 2010. 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol*. 12(2):177-184. eng.
- Nowak-Wegrzyn A, Crawford TO, Winkelstein JA, Carson KA, Lederman HM. 2004. Immunodeficiency and infections in ataxia-telangiectasia. *J Pediatr*. 144(4):505-511. eng.
- Nowak E, Etienne O, Millet P, Lages CS, Mathieu C, Mouthon M-A, Boussin FD. 2006. Radiation-induced H2AX phosphorylation and neural precursor apoptosis in the developing brain of mice. *Radiat Res*. 165(2):155-164. eng.
- Nowell PC. 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res*. 20:462-466. eng.
- Owens BM, Hawley RG. 2002. HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*. 20(5):364-379. eng.
- Pandita TK, Hittelman WN. 1992. Initial chromosome damage but not DNA damage is greater in ataxia telangiectasia cells. *Radiat Res*. 130(1):94-103. eng.
- Panier S, Boulton SJ. 2014. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15(1):7-18. eng.
- Pegg PJ. 1965. The preservation of leucocytes for cytogenetic and cytochemical studies. *Br J Haematol*. 11(5):586-591. eng.
- Peng L, Wang S, Yin S, Li C, Li Z, Wang S, Liu Q. 2008. Autophosphorylation of H2AX in a cell-specific frozen dependent way. *Cryobiology*. 57(2):175-177. eng.
- Pereira S, Bodgi L, Duclos M, Canet A, Ferlazzo ML, Devic C, Granzotto A, Deneuve S, Vogin G, Foray N. 2018. Fast and Binary Assay for Predicting Radiosensitivity Based on the Theory of ATM Nucleo-Shuttling: Development, Validation, and Performance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 100(2):353-360. eng.
- Perlman S, Becker-Catania S, Gatti RA. 2003. Ataxia-telangiectasia: diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Neurol*. 10(3):173-182.

- Pernot E, Hall J, Baatout S, Benotmane MA, Blanchardon E, Bouffler S, El Saghire H, Gomolka M, Guertler A, Harms-Ringdahl M et al. 2012. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutat Res.* 751(2):258-286.
- Perry P, Wolff S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature.* 251(5471):156-158. eng.
- Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. 2010. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of nucleic acids.* 2010. eng.
- Pollard JM, Gatti RA. 2009. Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 74(5):1323-1331. eng.
- Ponomarev AL, George K, Cucinotta FA. 2014. Generalized time-dependent model of radiation-induced chromosomal aberrations in normal and repair-deficient human cells. *Radiat Res.* 181(3):284-292. eng.
- Popp W, Plappert U, Muller WU, Rehn B, Schneider J, Braun A, Bauer PC, Vahrenholz C, Presek P, Brauksiepe A et al. 2000. Biomarkers of genetic damage and inflammation in blood and bronchoalveolar lavage fluid among former German uranium miners: a pilot study. *Radiat Environ Biophys.* 39(4):275-282. eng.
- Porcedda P, Turinetto V, Brusco A, Cavalieri S, Lantelme E, Orlando L, Ricardi U, Amoroso A, Gregori D, Giachino C. 2008. A rapid flow cytometry test based on histone H2AX phosphorylation for the sensitive and specific diagnosis of ataxia telangiectasia. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology.* 73(6):508-516. eng.
- Porcedda P, Turinetto V, Lantelme E, Fontanella E, Chrzanoska K, Ragona R, De Marchi M, Delia D, Giachino C. 2006. Impaired elimination of DNA double-strand break-containing lymphocytes in ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome. *DNA Repair (Amst).* 5(8):904-913. eng.
- Quante AS, Ming C, Rottmann M, Engel J, Boeck S, Heinemann V, Westphalen CB, Strauch K. 2016. Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer medicine.* 5(9):2649-2656. eng.
- Redon CE, Nakamura AJ, Martin OA, Parekh PR, Weyemi US, Bonner WM. 2011. Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging (Albany NY).* 3(2):168-174. eng.
- Rénier W, Joubert A, Bencokova Z, Gastaldo J, Massart C, Foray N. 2007. Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci. *Int J Radiat Biol.* 83(8):543-549. eng.
- Riballo E, Kuhne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A et al. 2004. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell.* 16(5):715-724. eng.
- Risom L, Knudsen LE. 1999. Use of cryopreserved peripheral mononuclear blood cells in biomonitoring. *Mutat Res.* 440(2):131-138. eng.
- Robert-Koch-Institut, e.V. GdeKiD. 2019. Krebs in Deutschland 2015/2016. ger.
- Robertson A, Allen J, Laney R, Curnow A. 2013. The cellular and molecular carcinogenic effects of radon exposure: a review. *International journal of molecular sciences.* 14(7):14024-14063. eng.
- Roch-Lefevre S, Mandina T, Voisin P, Gaetan G, Mesa JE, Valente M, Bonnesoeur P, Garcia O, Voisin P, Roy L. 2010. Quantification of gamma-H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiat Res.* 174(2):185-194.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 146(5):905-916. eng.
- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem.* 275(13):9390-9395. eng.
- 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(10):5858-5868. eng.

- Rosenstein BS. 2017. Radiogenomics: Identification of Genomic Predictors for Radiation Toxicity. *Semin Radiat Oncol.* 27(4):300-309. eng.
- 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(1):159. eng.
- Rothkamm K, Barnard S, Ainsbury EA, Al-Hafidh J, Barquinero JF, Lindholm C, Moquet J, Perala M, Roch-Lefevre S, Scherthan H et al. 2013. Manual versus automated gamma-H2AX foci analysis across five European laboratories: can this assay be used for rapid biodosimetry in a large scale radiation accident? *Mutat Res.* 756(1-2):170-173.
- Rothkamm K, Beinke C, Romm H, Badie C, Balagurunathan Y, Barnard S, Bernard N, Boulay-Greene H, Brengues M, De Amicis A et al. 2013. Comparison of established and emerging biodosimetry assays. *Radiat Res.* 180(2):111-119. eng.
- Rothkamm K, Horn S, Scherthan H, Rossler U, De Amicis A, Barnard S, Kulka U, Lista F, Meineke V, Braselmann H et al. 2013. Laboratory intercomparison on the gamma-H2AX foci assay. *Radiat Res.* 180(2):149-155.
- 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(9):5057-5062.
- Rube CE, Fricke A, Wendorf J, Stutzel A, Kuhne M, Ong MF, Lipp P, Rube C. 2010. Accumulation of DNA double-strand breaks in normal tissues after fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 76(4):1206-1213.
- Russo G, Isobe M, Pegoraro L, Finan J, Nowell PC, Croce CM. 1988. Molecular analysis of a t(7;14)(q35;q32) chromosome translocation in a T cell leukemia of a patient with ataxia telangiectasia. *Cell.* 53(1):137-144. eng.
- Sánchez-Flores M, Pásaro E, Bonassi S, Laffon B, Valdiglesias V. 2015.  $\gamma$ H2AX assay as DNA damage biomarker for human population studies: defining experimental conditions. *Toxicol Sci.* 144(2):406-413. eng.
- Savic V, Yin B, Maas NL, Bredemeyer AL, Carpenter AC, Helmink BA, Yang-Iott KS, Sleckman BP, Bassing CH. 2009. Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Mol Cell.* 34(3):298-310. eng.
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S et al. 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 268(5218):1749-1753. eng.
- Schneider J, Philipp M, Yamini P, Dork T, Voitowitz HJ. 2007. ATM gene mutations in former uranium miners of SDAG Wismut: a pilot study. *Oncol Rep.* 17(2):477-482. eng.
- Schneider J, Presek P, Braun A, Voitowitz HJ. 1999. Serum levels of pantropic p53 protein and EGF-receptor, and detection of anti-p53 antibodies in former uranium miners (SDAG Wismut). *Am J Ind Med.* 36(6):602-609. eng.
- Schnelzer M, Dufey F, Grosche B, Sogl M, Tschense A, Walsh L, Dahmann D, Lehmann F, Otten H, Kreuzer M. 2014. Berufliche Exposition und Mortalität in der deutschen Uranbergarbeiterkohorte. *ASU Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin.* 49:761-770. de.
- Schnelzer M, Hammer GP, Kreuzer M, Tschense A, Grosche B. 2010. Accounting for smoking in the radon-related lung cancer risk among German uranium miners: results of a nested case-control study. *Health Phys.* 98(1):20-28. eng.
- Schröder C, Friedrich K, Butz M, Koppisch D, Otten H. 2002. Uranium mining in Germany: incidence of occupational diseases 1946-1999. *Int Arch Occup Environ Health.* 75(4):235-242. eng.
- Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. 2000. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology.* 151(7):1381-1390. eng.
- Schunck C, Johannes T, Varga D, Lorch T, Plesch A. 2004. New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals. *Cytogenet Genome Res.* 104(1-4):383-389. eng.

- Scott SP, Pandita TK. 2006. The cellular control of DNA double-strand breaks. *J Cell Biochem.* 99(6):1463-1475. eng.
- Sears HF, Rosenberg SA. 1977. Advantages of cryopreserved lymphocytes for sequential evaluation of human immune competence. I. Mitogen stimulation. *J Natl Cancer Inst.* 58(2):183-187. eng.
- Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC. 2004. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 6(2):168-170.
- Seibold P, Auvinen A, Auerbeck D, Bourguignon M, Hartikainen JM, Hoeschen C, Laurent O, Noël G, Sabatier L, Salomaa S et al. 2020. Clinical and epidemiological observations on individual radiation sensitivity and susceptibility. *Int J Radiat Biol.* 96(3):324-339. eng.
- Seibold P, Webb A, Aguado-Barrera ME, Azria D, Bourgier C, Brengues M, Briers E, Bultijnck R, Calvo-Crespo P, Carballo A et al. 2019. REQUITE: A prospective multicentre cohort study of patients undergoing radiotherapy for breast, lung or prostate cancer. *Radiother Oncol.* 138:59-67. eng.
- Sharma PM, Ponnaiya B, Taveras M, Shuryak I, Turner H, Brenner DJ. 2015. High throughput measurement of  $\gamma$ H2AX DSB repair kinetics in a healthy human population. *PLoS One.* 10(3):e0121083-e0121083. eng.
- Shibata A, Jeggo PA. 2014. DNA double-strand break repair in a cellular context. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 26(5):243-249. eng.
- Shiloh Y. 2014. ATM: expanding roles as a chief guardian of genome stability. *Exp Cell Res.* 329(1):154-161. eng.
- Sigurdson AJ, Ha M, Hauptmann M, Bhatti P, Sram RJ, Beskid O, Tawn EJ, Whitehouse CA, Lindholm C, Nakano M et al. 2008. International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutat Res.* 652(2):112-121. eng.
- Smith MT, Zhang L, Wang Y, Hayes RB, Li G, Wiemels J, Dosemeci M, Titenko-Holland N, Xi L, Kolachana P et al. 1998. Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Res.* 58(10):2176-2181. eng.
- Sotnik NV, Osovets SV, Scherthan H, Azizova TV. 2014. mFISH analysis of chromosome aberrations in workers occupationally exposed to mixed radiation. *Radiat Environ Biophys.* 53(2):347-354.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 12(4):368-375. eng.
- Stewart GS, Last JI, Stankovic T, Haites N, Kidd AM, Byrd PJ, Taylor AM. 2001. Residual ataxia telangiectasia mutated protein function in cells from ataxia telangiectasia patients, with 5762ins137 and 7271T-->G mutations, showing a less severe phenotype. *J Biol Chem.* 276(32):30133-30141. eng.
- Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. 2003. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature.* 421(6926):961-966. eng.
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Loblrich M, Jeggo PA. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64(7):2390-2396. eng.
- Stracker TH, Roig I, Knobel PA, Marjanovic M. 2013. The ATM signaling network in development and disease. *Frontiers in genetics.* 4:37. eng.
- Strasser H, Grabenbauer GG, Sprung CN, Sauer R, Distel LV. 2007. DNA double-strand break induction and repair in irradiated lymphoblastoid, fibroblast cell lines and white blood cells from ATM, NBS and radiosensitive patients. *Strahlenther Onkol.* 183(8):447-453. eng.
- Stucki M, Jackson SP. 2004. MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair (Amst).* 3(8-9):953-957. eng.
- Stumm M, Neubauer S, Keindorff S, Wegner RD, Wieacker P, Sauer R. 2001. High frequency of spontaneous translocations revealed by FISH in cells from patients with the cancer-prone

- syndromes ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome. *Cytogenet Cell Genet.* 92(3-4):186-191. eng.
- Sun X, Becker-Catania SG, Chun HH, Hwang MJ, Huo Y, Wang Z, Mitui M, Sanal O, Chessa L, Crandall B et al. 2002. Early diagnosis of ataxia-telangiectasia using radiosensitivity testing. *J Pediatr.* 140(6):724-731. eng.
- 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(5):573-583. eng.
- Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL. 1991. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med.* 325(26):1831-1836. eng.
- Swift M, Sholman L, Perry M, Chase C. 1976. Malignant neoplasms in the families of patients with ataxia-telangiectasia. *Cancer Res.* 36(1):209-215. eng.
- Syed A, Tainer JA. 2018. The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu Rev Biochem.* 87:263-294. eng.
- Tawn EJ, Whitehouse CA, Tarone RE. 2004. FISH Chromosome Aberration Analysis on Retired Radiation Workers from the Sellafield Nuclear Facility. *Radiat Res.* 162(3):249-256.
- Taylor AM, Flude E, Laher B, Stacey M, McKay E, Watt J, Green SH, Harding AE. 1987. Variant forms of ataxia telangiectasia. *J Med Genet.* 24(11):669-677. eng.
- Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA. 1975. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature.* 258(5534):427-429. eng.
- Taylor AM, Metcalfe JA, Oxford JM, Harnden DG. 1976. Is chromatid-type damage in ataxia telangiectasia after irradiation at G<sub>0</sub> a consequence of defective repair? *Nature.* 260(5550):441-443. eng.
- Taylor AMR, Byrd PJ. 2005. Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J Clin Pathol.* 58(10):1009-1015.
- Taylor AMR, Rothblum-Oviatt C, Ellis NA, Hickson ID, Meyer S, Crawford TO, Smogorzewska A, Pietrucha B, Weemaes C, Stewart GS. 2019. Chromosome instability syndromes. *Nature Reviews Disease Primers.* 5(1):64.
- Thompson LH, Schild D. 2001. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res.* 477(1-2):131-153. eng.
- Tomkins DJ, Scheid EE. 1986. Effect of sample holding, cryopreservation, and storage on the human lymphocyte cytogenetic test. *Am J Ind Med.* 9(4):385-390. eng.
- Trinkl S, Bucher M, de las Heras Gala H, Endesfelder D, Gomolka M, Lechel U, Moertl S, Pätzold J, Rößler U, Weiss T et al. 2020. Dose uncertainties and field inhomogeneity by usage of a compact x-ray cabinet for biological experiments. *in preparation.*
- Trugenberger-Schnabel A, Merchel D, Löbke-Reinl A, Peter J. 2020. Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung: Jahresbericht 2017. Bonn.
- Tureson I, Carlsson J, Brahme A, Glimelius B, Zackrisson B, Stenerlöw B. 2003. Biological response to radiation therapy. *Acta Oncol.* 42(2):92-106. eng.
- Turner HC, Sharma P, Perrier JR, Bertucci A, Smilenov L, Johnson G, Taveras M, Brenner DJ, Garty G. 2014. The RABiT: high-throughput technology for assessing global DSB repair. *Radiat Environ Biophys.* 53(2):265-272. eng.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. 2003. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* 22(20):5612-5621. eng.
- Uziel T, Savitsky K, Platzer M, Ziv Y, Helbitz T, Nehls M, Boehm T, Rosenthal A, Shiloh Y, Rotman G. 1996. Genomic Organization of the ATM gene. *Genomics.* 33(2):317-320. eng.
- Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, Neri M, Bonassi S. 2013. gammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res.* 753(1):24-40.

- van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet.* 2(3):196-206. eng.
- Vandevoorde C, Gomolka M, Roessler U, Samaga D, Lindholm C, Fernet M, Hall J, Pernot E, El-Saghire H, Baatout S et al. 2015. EPI-CT: in vitro assessment of the applicability of the gamma-H2AX-foci assay as cellular biomarker for exposure in a multicentre study of children in diagnostic radiology. *Int J Radiat Biol.* 1-11.
- Venkateswarlu R, Tamizh SG, Bhavani M, Kumar A, Alok A, Karthik K, Kalra N, Vijayalakshmi J, Paul SFD, Chaudhury NK et al. 2015. Mean frequency and relative fluorescence intensity measurement of  $\gamma$ -H2AX foci dose response in PBL exposed to  $\gamma$ -irradiation: An inter- and intra-laboratory comparison and its relevance for radiation triage. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology.* 87(12):1138-1146. eng.
- Verhagen MM, Last JI, Hogervorst FB, Smeets DF, Roeleveld N, Verheijen F, Catsman-Berrevoets CE, Wulffraat NM, Cobben JM, Hiel J et al. 2012. Presence of ATM protein and residual kinase activity correlates with the phenotype in ataxia-telangiectasia: a genotype-phenotype study. *Hum Mutat.* 33(3):561-571. Eng.
- Viau M, Testard I, Shim G, Morat L, Normil MD, Hempel WM, Sabatier L. 2015. Global quantification of gammaH2AX as a triage tool for the rapid estimation of received dose in the event of accidental radiation exposure. *Mutation research Genetic toxicology and environmental mutagenesis.* 793:123-131. eng.
- Vilasová Z, Rezáčová M, Vávrová J, Tichý A, Vokurková D, Zoelzer F, Reháková Z, Osterreicher J, Lukášová E. 2008. Changes in phosphorylation of histone H2A.X and p53 in response of peripheral blood lymphocytes to gamma irradiation. *Acta Biochim Pol.* 55(2):381-390. eng.
- Vingerhoets J, Vanham G, Kestens L, Gigase P. 1995. A convenient and economical freezing procedure for mononuclear cells. *Cryobiology.* 32(1):105-108. eng.
- Visvardis EE, Tassiou AM, Piperakis SM. 1997. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H2O2 and gamma-irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat Res.* 383(1):71-80. eng.
- Vozilova AV, Shagina NB, Degteva MO, Akleyev AV. 2013. Chronic radioisotope effects on residents of the Techa River (Russia) region: cytogenetic analysis more than 50 years after onset of exposure. *Mutat Res.* 756(1-2):115-118.
- Vozilova AV, Shagina NB, Degteva MO, Moquet J, Ainsbury EA, Darroudi F. 2014. FISH analysis of translocations induced by chronic exposure to Sr radioisotopes: second set of analysis of the Techa River Cohort. *Radiation protection dosimetry.* 159(1-4):34-37.
- Walsh L, Grosche B, Schnelzer M, Tschense A, Sogl M, Kreuzer M. 2015. A review of the results from the German Wismut uranium miners cohort. *Radiation protection dosimetry.* 164(1-2):147-153.
- Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ. 2002. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science.* 298(5597):1435-1438. eng.
- Wang J, He L, Fan D, Ding D, Wang X, Gao Y, Zhang X, Li Q, Chen H. 2016. Establishment of a  $\gamma$ -H2AX foci-based assay to determine biological dose of radon to red bone marrow in rats. *Sci Rep.* 6(1):30018.
- Watters D, Khanna KK, Beamish H, Birrell G, Spring K, Kedar P, Gatei M, Stenzel D, Hobson K, Kozlov S et al. 1997. Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene.* 14(16):1911-1921. eng.
- Wei Q, Cheng L, Hong WK, Spitz MR. 1996. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. *Cancer Res.* 56(18):4103-4107. eng.
- White D, Rafalska-Metcalf IU, Ivanov AV, Corsinotti A, Peng H, Lee SC, Trono D, Janicki SM, Rauscher FJ, 3rd. 2012. The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: regulation by HP1 proteins and serine 473/824 phosphorylation. *Mol Cancer Res.* 10(3):401-414. eng.

- White DE, Negorev D, Peng H, Ivanov AV, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd. 2006. KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions. *Cancer Res.* 66(24):11594-11599. eng.
- Whitehouse CA, Edwards AA, Tawn EJ, Stephan G, Oestreicher U, Moquet JE, Lloyd DC, Roy L, Voisin P, Lindholm C et al. 2005. Translocation yields in peripheral blood lymphocytes from control populations. *Int J Radiat Biol.* 81(2):139-145. eng.
- Wojewodzka M, Sommer S, Kruszewski M, Sikorska K, Lewicki M, Lisowska H, Wegierek-Ciuk A, Kowalska M, Lankoff A. 2015. Defining Blood Processing Parameters for Optimal Detection of gamma-H2AX Foci: A Small Blood Volume Method. *Radiat Res.* 184(1):95-104. eng.
- Wolf G, Arndt D, Kotschy-Lang N, Obe G. 2004. Chromosomal aberrations in uranium and coal miners. *Int J Radiat Biol.* 80(2):147-153. eng.
- Woods CG, Taylor AM. 1992. Ataxia telangiectasia in the British Isles: the clinical and laboratory features of 70 affected individuals. *Q J Med.* 82(298):169-179. eng.
- Yamamoto K, Nagata K, Yagasaki F, Tsurukubo Y, Tamura A, Taniwaki M, Hamaguchi H. 2000. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 12 during clonal evolution in myelodysplastic syndrome with t(5;12)(q13;p13) involving the ETV6 gene. *Cancer Genet Cytogenet.* 119(2):113-117. eng.
- Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R et al. 2019. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res.* 48(D1):D682-D688.
- Zahnreich S, Ebersberger A, Kaina B, Schmidberger H. 2015. Biodosimetry Based on  $\gamma$ -H2AX Quantification and Cytogenetics after Partial- and Total-Body Irradiation during Fractionated Radiotherapy. *Radiat Res.* 183(4):432-446. eng.
- Zhou BB, Elledge SJ. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 408(6811):433-439. eng.
- Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, Lukas J, Bekker-Jensen S, Bartek J, Shiloh Y. 2006. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol.* 8(8):870-876. eng.
- Zölzer F, Hon Z, Freitinger Skalická Z, Havránková R, Navrátil L, Rosina J, Skopek J. 2012. Persistence of genetic damage in lymphocytes from former uranium miners. *Cytogenet Genome Res.* 136(4):288-294. eng.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b>	Strahlenbelastung der Bevölkerung durch ionisierende Strahlung in Deutschland. ....	10
<b>Abbildung 2.</b>	Signalisierung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB). ....	13
<b>Abbildung 3.</b>	Visualisierung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB) und Chromosomenschäden. ....	16
<b>Abbildung 4.</b>	Merkmale von Ataxia teleangiectatica (AT). ....	21
<b>Abbildung 5.</b>	Die deutsche Uranbergarbeiter Biobank (GUMB) mit Expositionsdaten der Bergarbeiter. ....	23
<b>Abbildung 6.</b>	Lokalisation von $\gamma$ H2A.X in AT Patienten und in Kontrollen. ....	56
<b>Abbildung 7.</b>	Semi-automatische Analyse der Induktion von $\gamma$ H2A.X Foci nach Bestrahlung. ....	58
<b>Abbildung 8.</b>	Semi-automatische Analyse der Zeitkinetik von $\gamma$ H2A.X Foci nach Bestrahlung. ....	58
<b>Abbildung 9.</b>	Manuelle Analyse der Induktion und Zeitkinetik von $\gamma$ H2A.X Foci nach Bestrahlung. ....	59
<b>Abbildung 10.</b>	mFISH Analyse geschädigter Zellen und Brüche pro Zelle von AT Patienten. ....	63
<b>Abbildung 11.</b>	mFISH Analyse verschiedener Aberrationsarten von AT Patienten. ....	65
<b>Abbildung 12.</b>	mFISH Analyse verschiedener Translokationsarten von AT Patienten. ....	66
<b>Abbildung 13.</b>	Analyse der Schäden pro Chromosom und Chromosomenübergänge. ....	68
<b>Abbildung 14.</b>	Detektion von ATM, pATM und ATR in lymphoblastoiden Zelllinien von AT Patienten. ....	71
<b>Abbildung 15.</b>	Detektion von pKAP1 in lymphoblastoiden Zelllinien von AT Patienten. ....	72
<b>Abbildung 16.</b>	Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von $\gamma$ H2A.X Foci (AlexaFluor® 555). ....	77
<b>Abbildung 17.</b>	Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von $\gamma$ H2A.X Foci (AlexaFluor® 488). ....	78
<b>Abbildung 18.</b>	Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von 53BP1 Foci. ....	79
<b>Abbildung 19.</b>	Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von MDC1 Foci. ....	80
<b>Abbildung 20.</b>	Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von pKAP1 Signalen. ....	81
<b>Abbildung 21.</b>	Doppelfärbungen von $\gamma$ H2A.X mit 53BP1, $\gamma$ H2A.X mit pKAP1 und 53BP1 mit MDC1. ....	82
<b>Abbildung 22.</b>	Dosis-Effekt-Kurve von $\gamma$ H2A.X Foci in kryokonservierten und frischen Lymphozyten. ....	85
<b>Abbildung 23.</b>	Dosis-Effekt-Kurve von 53BP1 Foci in kryokonservierten und frischen Lymphozyten. ....	85
<b>Abbildung 24.</b>	Dosis-Effekt-Kurve von pKAP1 Signalen in kryokonservierten und frischen Lymphozyten. ....	86
<b>Abbildung 25.</b>	Semi-automatisch Analyse von $\gamma$ H2A.X Foci auf Objektträgern von ungeübten Kursteilnehmern und Experten. ....	88
<b>Abbildung 26.</b>	Semi-automatische Quantifizierung von $\gamma$ H2A.X und 53BP1 Foci für manuelle Auswertung. ....	89
<b>Abbildung 27.</b>	Manuelle Quantifizierung von $\gamma$ H2A.X, 53BP1 und kolokalisierten $\gamma$ H2A.X/53BP1 Foci durch ungeübte Kursteilnehmer. ....	91
<b>Abbildung 28.</b>	Interexperimentelle Variation in der semi-automatischen RIF Quantifizierung. ...	95
<b>Abbildung 29.</b>	Dosis-Effekt in der Induktion von RIF bei ehemaligen Wismut Bergarbeitern. ....	97
<b>Abbildung 30.</b>	Reparatureffekt in der Zeitkinetik von RIF bei ehemaligen Wismut Bergarbeitern. ....	97
<b>Abbildung 31.</b>	Korrelation der semi-automatischen Quantifizierung von RIF mit Höhe der absorbierten Gesamtorgandosis von Wismut Bergarbeitern. ....	99
<b>Abbildung 32.</b>	Korrelation der semi-automatischen Quantifizierung von RIF mit Höhe der kumulativen Radonexposition von Wismut Bergarbeitern. ....	101
<b>Abbildung 33.</b>	Unterschiede in der Anzahl von RIF bei Wismut Bergarbeitern mit niedriger und hoher absorbiertes Gesamtorgandosis. ....	102
<b>Abbildung 34.</b>	Unterschiede in der Anzahl von RIF bei Wismut Bergarbeitern mit niedriger und hoher kumulativer Radonexposition. ....	103
<b>Abbildung 35.</b>	Stimulierung von kryokonservierten Lymphozyten für die Chromosomenpräparation. ....	105

<b>Abbildung 36.</b> mFISH Färbung von Lymphozyten aus Vollblut oder nach Kryokonservierung. ....	106
<b>Abbildung 37.</b> Korrelation geschädigter Zellen und Brüche pro Zelle mit Höhe der Strahlenexposition von Wismut Bergarbeitern. ....	109
<b>Abbildung 38.</b> Unterschiede in der Anzahl geschädigter Zellen und Brüche pro Zelle bei Wismut Bergarbeitern mit niedriger und hoher Strahlenexposition. ....	110
<b>Abbildung 39.</b> Korrelation verschiedener Aberrationsklassen mit Höhe der Strahlenexposition von Wismut Bergarbeitern. ....	111
<b>Abbildung 40.</b> Unterschiede in der Anzahl von Aberrationsklassen bei Wismut Bergarbeitern mit niedriger und hoher Strahlenexposition. ....	112

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Übersicht der klassifizierten Chromosomenschäden mittels mFISH-Analyse. ....	42
<b>Tabelle 2.</b> Übersicht der untersuchten Untersuchungskollektive. ....	53
<b>Tabelle 3.</b> Übersicht von Chromosomenschäden bei genetisch-bedingter Strahlenempfindlichkeit. ....	62
<b>Tabelle 4.</b> Übersicht der lymphoblastoiden Zelllinien von AT Patienten. ....	69
<b>Tabelle 5.</b> Übersicht der etablierten Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung von RIF. ....	76
<b>Tabelle 6.</b> Übersicht der Klassifikatoren-Parameter für die semi-automatische Analyse von RIF. ....	76
<b>Tabelle 7.</b> Übersicht des untersuchten Untersuchungskollektives der Wismut Bergarbeiter. ....	93
<b>Tabelle 8.</b> Korrelation der semi-automatischen Quantifizierung von RIF mit Höhe der absorbierten Gesamtdosis von Wismut Bergarbeitern. ....	98
<b>Tabelle 9.</b> Korrelation der semi-automatischen Quantifizierung von RIF mit Höhe der kumulativen Radonexposition von Wismut Bergarbeitern. ....	100
<b>Tabelle 10.</b> Übersicht von Chromosomenschäden der Wismut Bergarbeiter. ....	108

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
53BB1	<i>p53-binding protein 1</i>
A	Adenin (Nukleinbase)
AF	AlexaFluor® Farbstoff
Arg	Arginin (R; Aminosäure)
Asp	Asparaginsäure (D; Aminosäure)
AT	Ataxia teleangiectatica/ Proband mit Ataxia teleangiectatica
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BRCA1	<i>Breast-cancer-associated 1</i>
Brdu	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	<i>Charged coupled device</i> (Bauteil in einer Kamera)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Computertomographie
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat
ClinVar	<i>Clinically Relevant Sequence Variations</i> (Datenbank für genetische Variationen mit klinischer Relevanz)
Cys	Cystein (C; Aminosäure)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIGE	<i>Difference Gel Electrophoresis</i> (Differenz-Gelelektrophorese)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DSB	DNA Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EBV	Eppstein-Barr-Virus
FBS	Fetales Rinderserum
(m)FISH	(multiplex) Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FPG	Fluoreszenz-plus Giemsa Färbung
G	Guanin (Nukleinbase)
Glu	Glutaminsäure (E; Aminosäure)
Gly	Glycin (G; Aminosäure)
GUMB	<i>German Uranium Miners Biobank</i> (Deutsche Uranbergarbeiter Biobank)
Gy	Gray
h	Stunde
H2A.X	Histonvariante X des Histons 2A
HR	Homologe Rekombination
HWM-D-2000	Cäsium 137 Quelle von Hans Wälischmiller
IF	Immunfluoreszenz
IQA	Interquartilsabstand
K	Kontrolle (gesunder Proband für Vergleichsuntersuchungen)
KAP1	<i>KRAB-associated protein 1</i>
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LLAF	<i>Lone linear acentric fragment</i> (azentrisches Fragment ohne verkürztes Chromosom)
LOVD	<i>Leiden Open Variation Database</i> (Datenbank für Varianten in der DNA)
LRN	langlebigen Radionukliden
LTD	<i>Lone truncated chromosome</i> (verkürztes Chromosom ohne begleitendes azentrisches Fragment)
Lys	Lysin (K; Aminosäure)
mA	Milliamper

MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MELODI	<i>Multidisciplinary European Low Dose Initiative</i>
MEM NEAA	Eagle's Minimum Essential Medium mit nicht essentielle Aminosäuren
mg	Milligramm
MIM	Identifikationsnummer in der Datenbank <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
min	Minute
mL	Milliliter
MRE11	<i>Meiotic recombination protein 11</i>
MRN	Protein Komplex aus MRE11, Rad50, NBS1
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome protein 1</i>
NHEJ	Nicht-homologes Endjoining
P	P-Wert
P mit Zahl	Probandennummer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin L
PIKKs	Phosphatidyl-inositol-3 Kinase-ähnliche Kinasen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rap80	Untereinheit des BRCA1-A Komplex
RBM	<i>Red bone marrow</i> (rotes Knochenmark)
RIF	<i>Radiation induced foci</i> (strahlen-induzierte Foci)
RNA	Ribonukleinsäure
RnFP	Radon und dessen Zerfallsprodukten
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDAG	Sowjetisch-Deutsche Aktien Gesellschaft
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin (S; Aminosäure)
SMG1	Serin/Threonin Proteinkinase
SSC	Saline sodium citrate (Salzlösung Natriumcitrat)
Sv	Sievert
T	Thymidin (Nukleinbase)
TBS(T)	Tris-gepuffert Salzlösung (mit Tween20)
Thr	Threonin (T; Aminosäure)
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
TTD	<i>True terminal deletion</i> (verkürztes Chromosom mit dem dazugehörigen azentrischen Fragment)
w	weiblich
m	männlich
TUR	<i>Turkey</i> (Türkei)
MAR	<i>Morocco</i> (Marokko)
GER	<i>Germany</i> (Deutschland)
SEE	<i>Southeast Europe</i> (Südosteuropa)
HOM	homozygote Mutation
HET	kombiniert heterozygote Mutation;
WB	Westernblot
WLM	<i>Working Level Month</i> (Maßeinheit für die Arbeitszeit unter Exposition von Radon)
x g	Faktor X der durchschnittlichen Fallbeschleunigung auf der Erde

## 7. Publikationen

### Veröffentlichungen in referierten und nicht-referierten Zeitschriften

Gomolka M & **Bucher M**. Die Deutsche Uranbergarbeiter Biobank. *Management & Krankenhaus* 2019, Ausgabe 11, Seite 34.

**Bucher M**, Duchrow L, Endesfelder D, Rößler U, Gomolka M. Comparison of inexperienced operators and experts in  $\gamma$ H2A.X and 53BP1 foci assay for high-throughput biodosimetry approaches in a mass casualty incident. *Int J Radiat Biol* 2020. doi: 10.1080/09553002.2020.1793024.

**Bucher M**, Endesfelder D, Rößler U, Borkhardt A, Dückers G, Kirlum HJ, Lankisch P, Oommen PT, Niehus T, Rübe CE, Baumgartner I, Bunk F, Moertl S, Hornhardt S and Gomolka M. Analysis of chromosomal aberrations and  $\gamma$ H2A.X foci to identify radiation-sensitive ataxia-telangiectasia patients. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2020, eingereicht

Trinkl S & **Bucher M**, de las Heras Gala H, Endesfelder D, Gomolka M, Lechel U, Moertl S, Pätzold J, Rößler U, Weiss T and Giussani A. Dose uncertainties and field inhomogeneity by usage of a compact x-ray cabinet for biological experiments. *in Vorbereitung*

**Bucher M**, Endesfelder D, Durchow L, Rößler U, Pätzold J. and Gomolka M. Semi-automatic radiation-induced foci assay and analysis of chromosomal aberrations in cryopreserved lymphocytes: methods to analyse the DNA damage response in biobank material. *in Vorbereitung*

### Vorträge

**Bucher M**, Endesfelder D, Rößler U, Borkhardt A, Dückers G, Kirlum HJ, Lankisch P, Oommen PT, Niehus T, Rübe CE, Moertl S, Hornhardt S and Gomolka M. Chromosomal aberrations versus gammaH2AX to identify radiation sensitive Ataxia telangiectasia patients. *Workshop Molecular and Clinical Aspects of Individual Radiosensitivity* im Rahmen des *International Congress on Radiation Research (ICRR)*, 25.-29.08.2019; Manchester/UK

**Bucher M**. Genomische Stabilität und DNA-Reparatur bei strahlenempfindlichen Kindern. 3. *Tag der Forschung am Bundesamt für Strahlenschutz*, 27.-28.11.2017, Berlin

**Bucher M**, Rößler U, Oestreicher U, Kulka U, Samaga D, Endesfelder D, Dückers G, Lankisch P, Borkhardt A, Kirlum H.J., Rübe C.E, Meese E, Hornhardt S and Gomolka M. Genome instability and DNA repair capacity in radiation sensitive children. *5th International Workshop on the Causes of Childhood Leukemia*, 14.-16.11.2016, München

Posterbeiträge (Auswahl)

**Bucher M**, Rößler U, Endesfelder D, Kulka U, Dückers G, Borkhardt A, Rube CE, Meese E, Hornhardt S, Gomolka M. Chromosomal aberrations versus gammaH2AX to identify radiation sensitive Ataxia telangectasia patients. *International Congress of Radiation Research (ICRR)*, 25.-29.08.2019 Manchester/UK

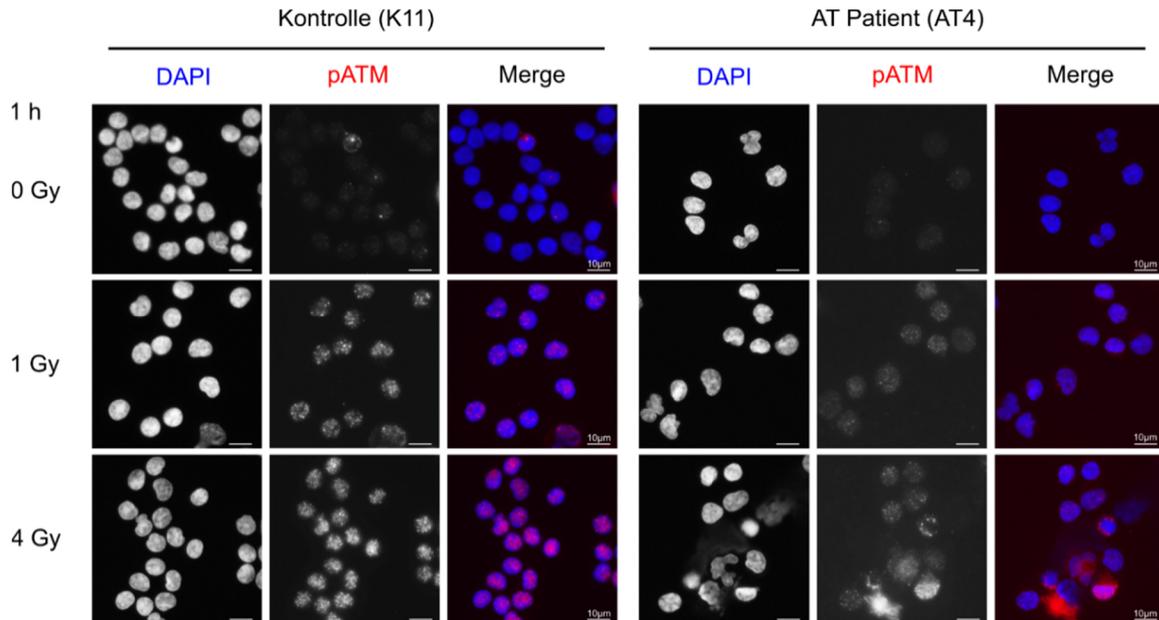
**Bucher M**, Rößler U, Pätzold J, Werner J, Kulka U, Meese E, Rube C.E, Hornhardt S, Gomolka M. Systematic screening of radiation induced foci formation and automatic scoring of DNA damage response proteins. *21. Tagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung*, 17.-19.09.2018, Frankfurt a.M.

**Bucher M**, Mangold T, Endesfelder D, Gomolka M, Hornhardt S, Kulka U, Rößler U. Limits and possibilities of the automated detection and scoring of  $\gamma$ -H2A.X foci. *21. Tagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung*, 17.-19.09.2018, Frankfurt a.M.

**Bucher M**, Rößler U, Samaga D, Hornhardt S, Kulka U, Dückers G, Lankisch P, Borkhardt A, Kirlum H.J., Rube C.E, Meese E, Kesminiene A and Gomolka M. Genome stability and DNA repair capacity after in vitro irradiation in young Ataxia telangiectasia patients. *20. Tagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung*, 17.-21.09.2017 Essen & *ATW2017 - Ataxia-Telangiectasia Workshop*, 20.-23.03.2017, Mailand & *14th Biennial Meeting of the DGDR „DNA Repair“*, 12.-16.9.2016, Essen & *19. Tagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung*, 26.-28.9.2016, Erlangen

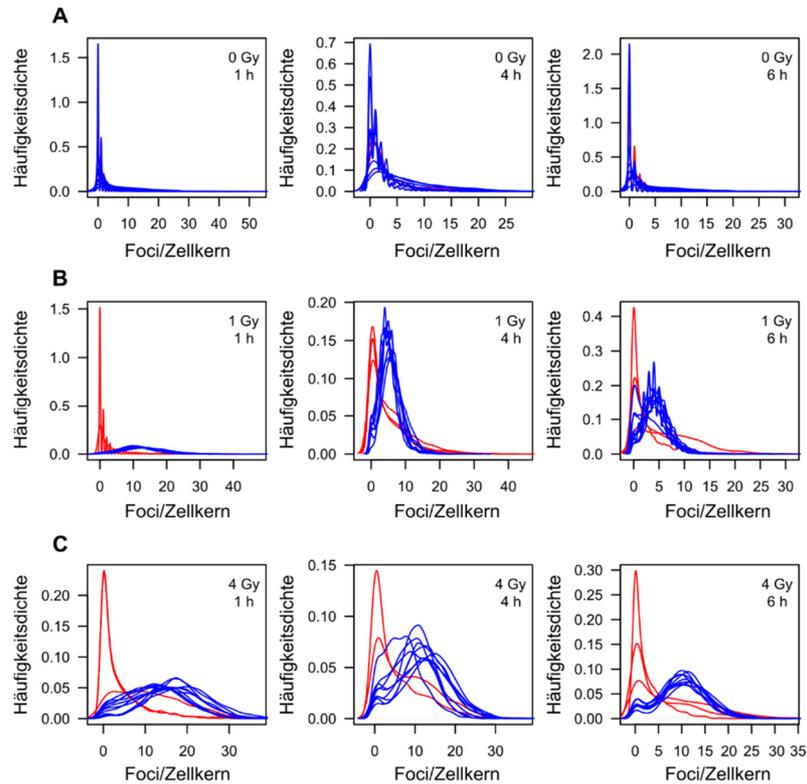
**Bucher M**, Rößler U, Kulka U, Hornhardt S, Gomolka M. DNA damage as a marker for chronic exposure of ionizing radiation. *18. Tagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung*. 05.-07.10.2015, Dresden.

## 8. Anhang



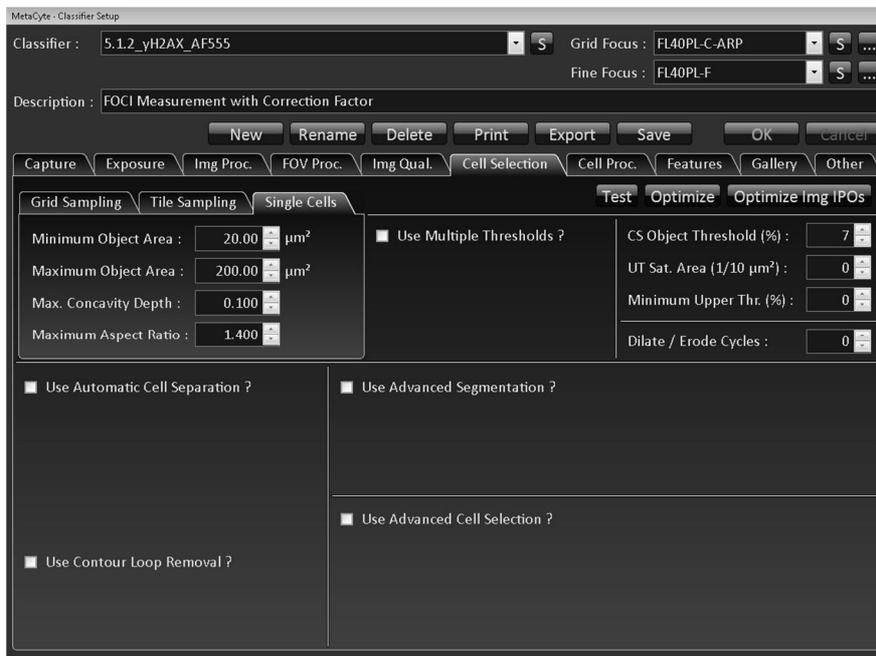
**Abbildung Anhang 1.** Lokalisation von phosphoryliertem ATM (Ser1981, pATM) in einem AT Patient und einer Kontrolle.

Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von pATM Foci (rot) in Zellkernen (blau) in bestrahlten Lymphozyten (0, 1 und 4 Gy) von AT Patient (AT4) und einer Kontrolle (K10). Nach Bestrahlung wurde in den Kontrollen die Bildung von zahlreichen pATM Foci beobachtet, die über den gesamten Zellkern verteilt sind. Mit steigender Dosis wurde eine Zunahme in der Foci Anzahl festgestellt. In den AT Patienten wurde keine Bildung von pATM Foci festgestellt. Die Zellen wurden nach Bestrahlung fixiert, auf Objektträger aufgebracht und pATM Foci mit Maus anti-phospho-ATM (Ser1981) (1:1000) und AlexaFluor555-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:1000) detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Fluoreszenzaufnahmen und Reparaturfoci-Analyse wurde mit einem Metafer Scanning System bestehend aus dem Epifluoreszenzmikroskop Zeiss AxioImager.Z2 und der Metafer4 Software durchgeführt. Die Maßstabsskala entspricht 10 µm bei 40x Vergrößerung.



**Abbildung Anhang 2.** Verteilung der Anzahl von pATM Foci/Zellkern in semi-automatisch analysierten Zellkernen.

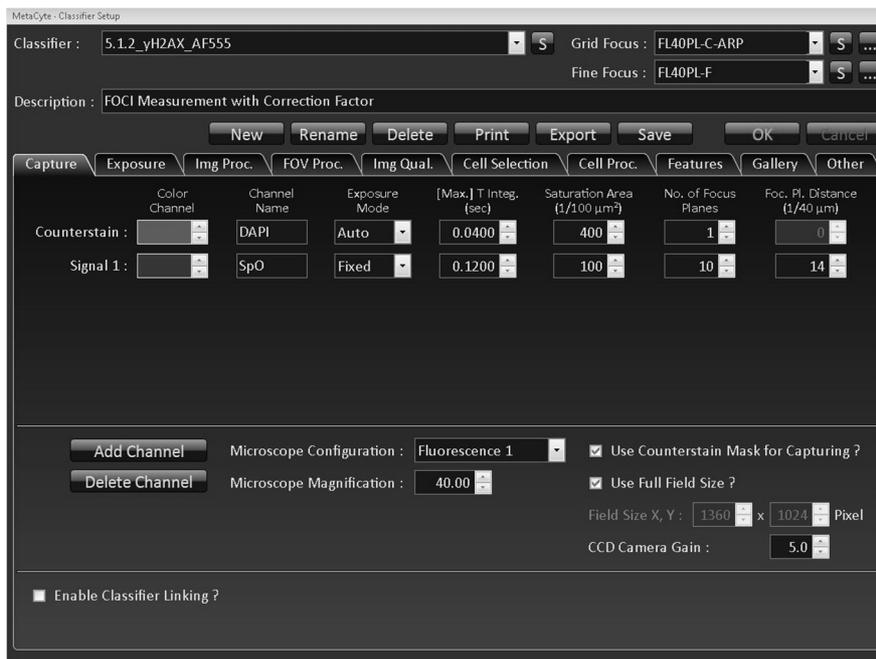
Die Häufigkeitsdichte der Zellkerne mit der gleichen Anzahl pATM Foci wurde ermittelt und als Histogramm dargestellt. Während die Mehrheit der Zellkerne von drei AT Patienten (rot) vor und nach einer Bestrahlung keine oder nur vereinzelte pATM Foci zeigen, kommt es in den zehn Kontrollen (blau) zu einer dosisabhängigen Zunahme ( **A** 0, **B** 1, **C** 4 Gy) und mit andauernder Reparaturzeit zu einer Abnahme (1, 4, 6 h) der Foci pro Zellkern.



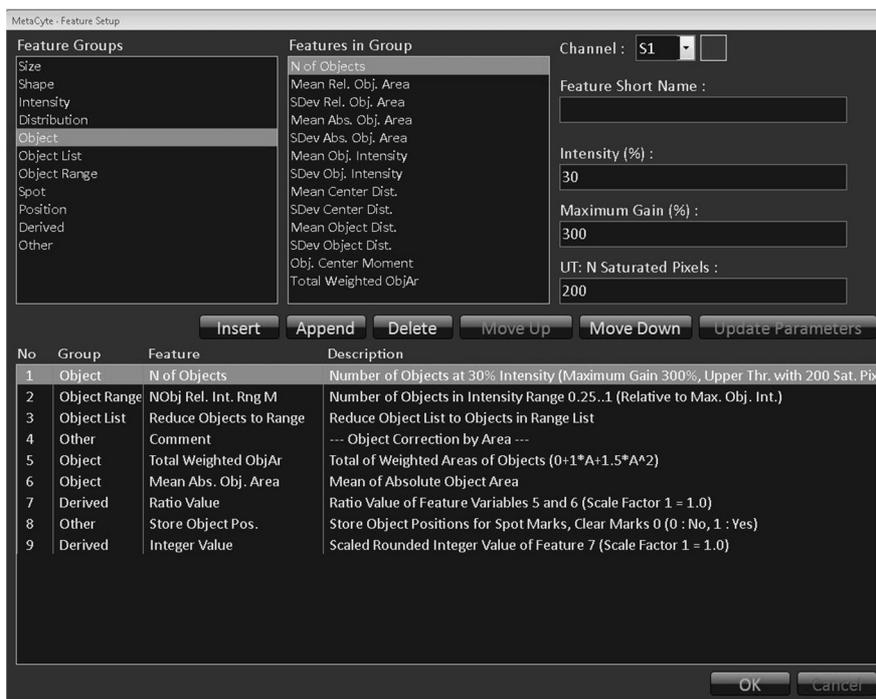
**Abbildung Anhang 3.** Einstellungen des Klassifikators für die Zellerkennung.

Die Einstellungen zur Zellerkennung wurden für alle Klassifikatoren gleich gewählt. Es wurden nur Objekte mit einer Fläche von 20 bis 200  $\mu\text{m}^2$  und mit einer runden bis ovalen Grundform in die Analyse einbezogen. Die Erkennung der Zellen erfolgte im DAPI-Filter. Die Auswertung erfolgte mit Metafer4 (MetaSystems Hard & Software GmbH).

A



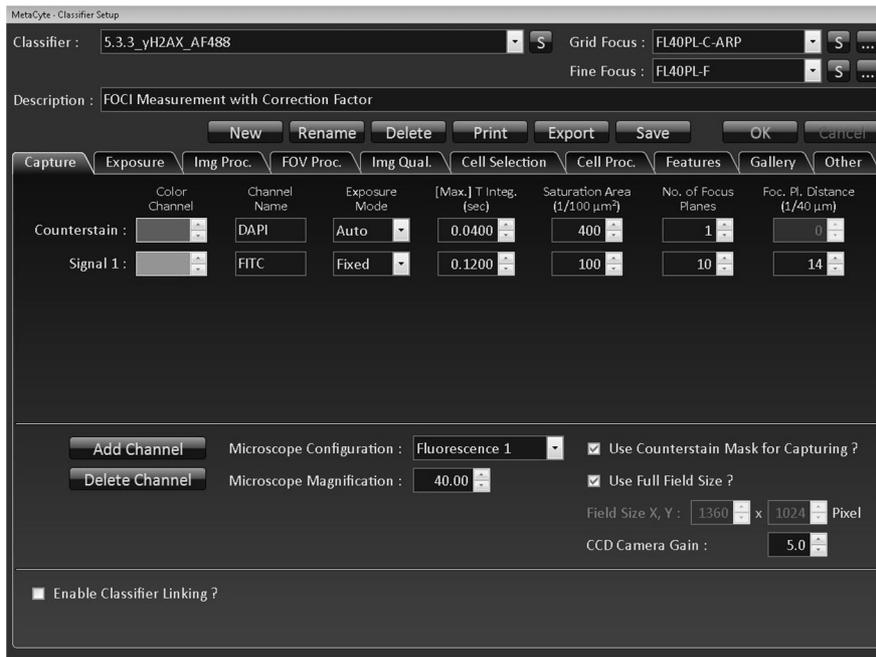
B



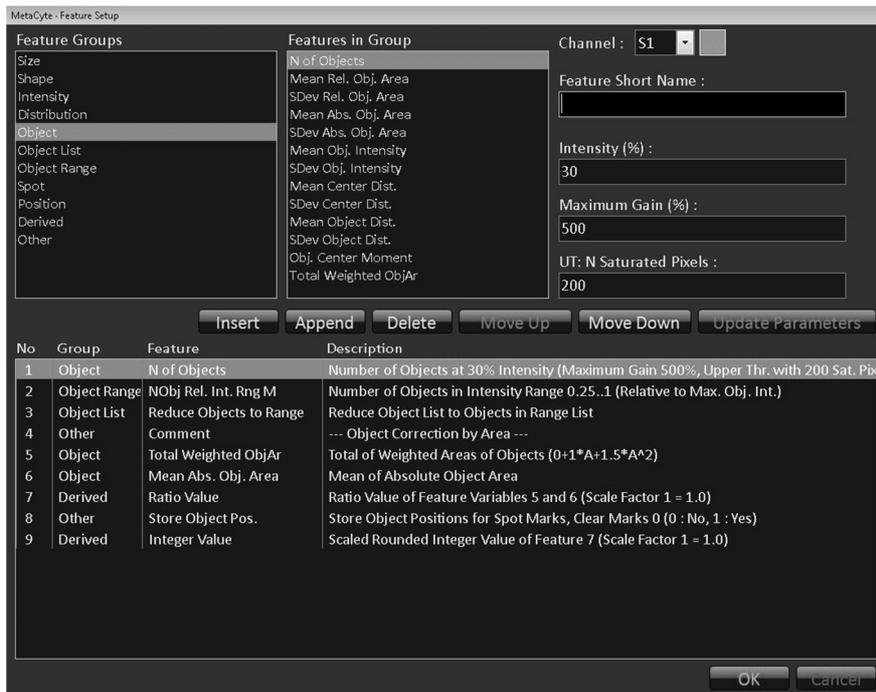
**Abbildung Anhang 4.** Einstellung des Klassifikators für die Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Foci mit AlexaFluor® 555.

**A)** Die Integrationszeit im *Spectrum-Orange* Filter wurde auf 0,12 Sekunden fixiert. **B)** Signale mit einer relativen Signalintensität von 30% und einem Signalbereich von 0,25-1 wurden als Foci gewertet. Die Auswertung erfolgte mit Metafer4 (MetaSystems Hard & Software GmbH).

A



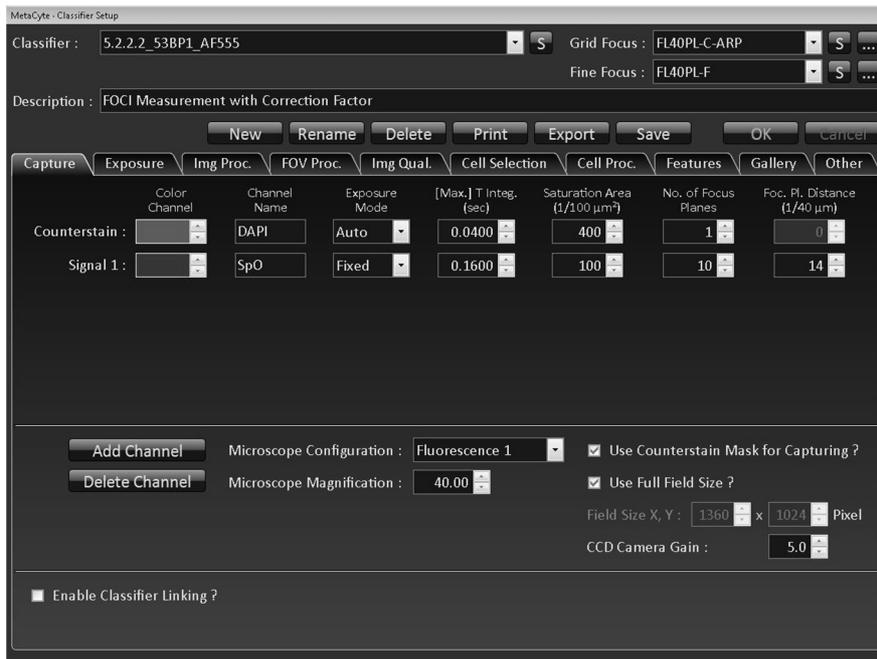
B



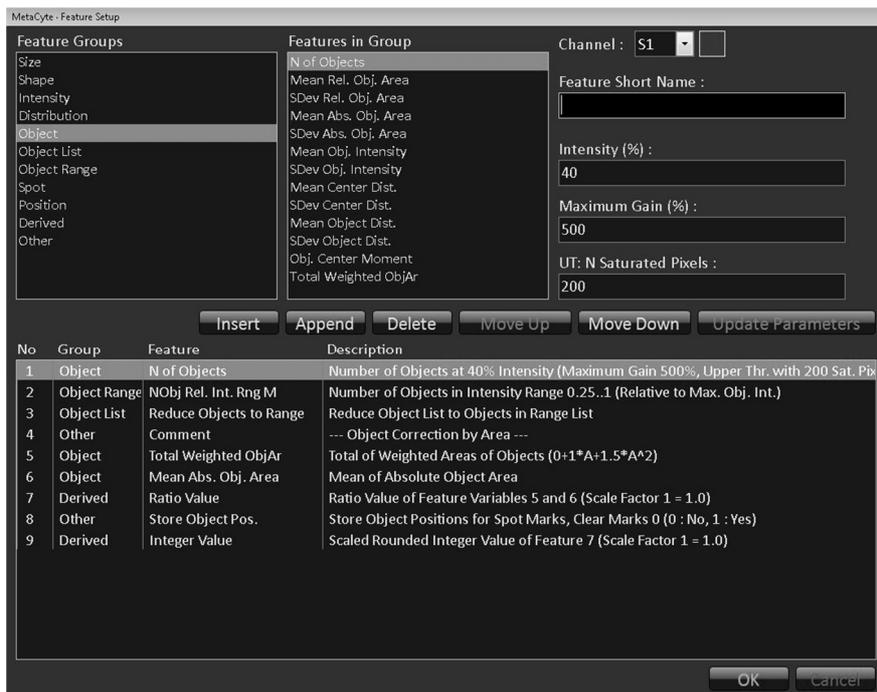
**Abbildung Anhang 5.** Einstellung des Klassifikators für die Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Foci mit AlexaFluor® 488.

**A)** Die Integrationszeit im FITC Filter wurde auf 0,12 Sekunden fixiert. **B)** Signale mit einer relativen Signalintensität von 30% und einem Signalbereich von 0,25-1 wurden als Foci gewertet. Die Auswertung erfolgte mit Metafer4 (MetaSystems Hard & Software GmbH).

A



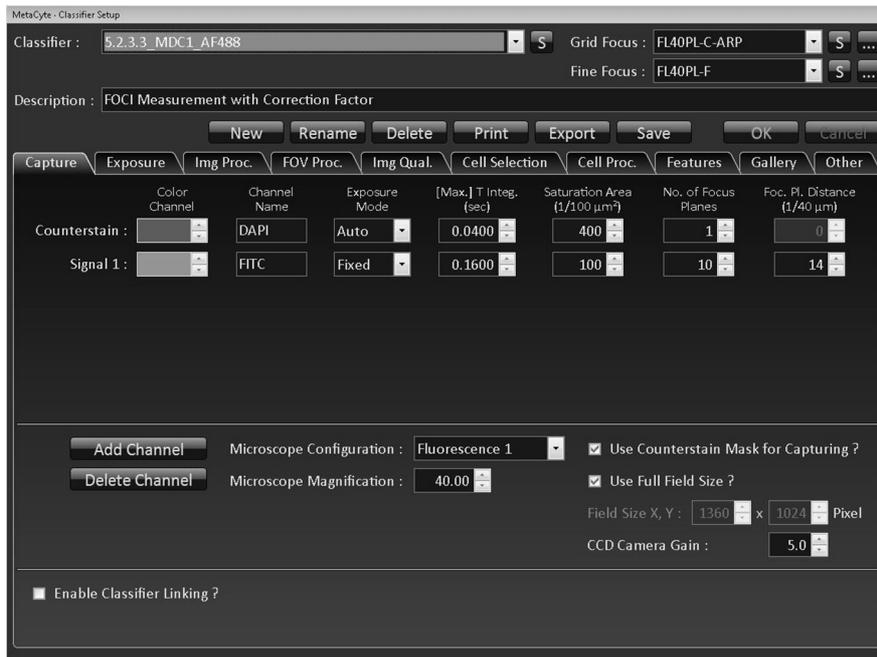
B



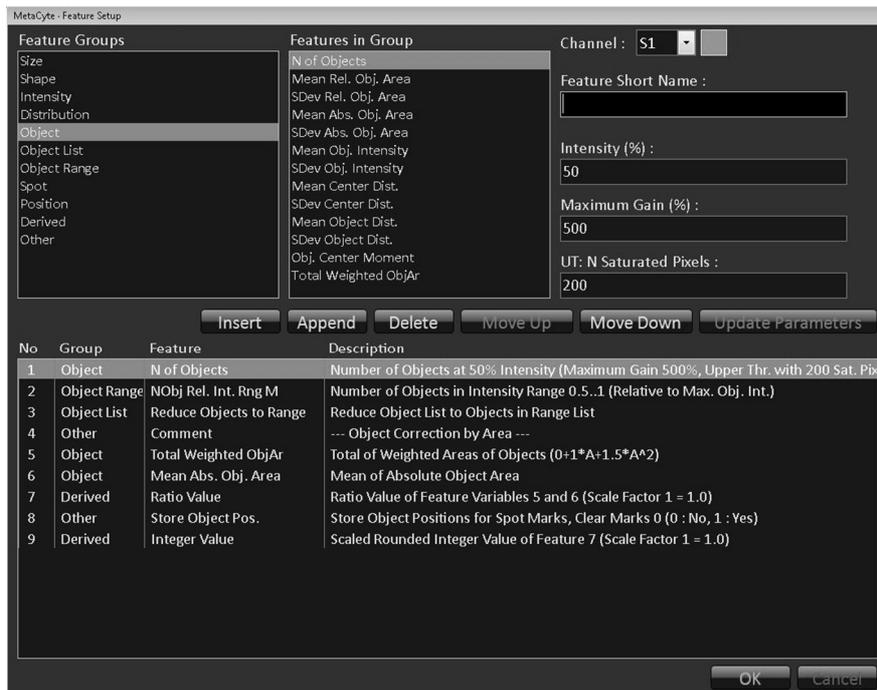
**Abbildung Anhang 6.** Einstellung des Klassifikators für die Quantifizierung von 53BP1 Foci mit AlexaFluor® 555.

**A)** Die Integrationszeit im *Spectrum-Orange* Filter wurde auf 0,16 Sekunden fixiert. **B)** Signale mit einer relativen Signalintensität von 40% und einem Signalbereich von 0,25-1 wurden als Foci gewertet. Die Auswertung erfolgte mit Metafer4 (MetaSystems Hard & Software GmbH).

A



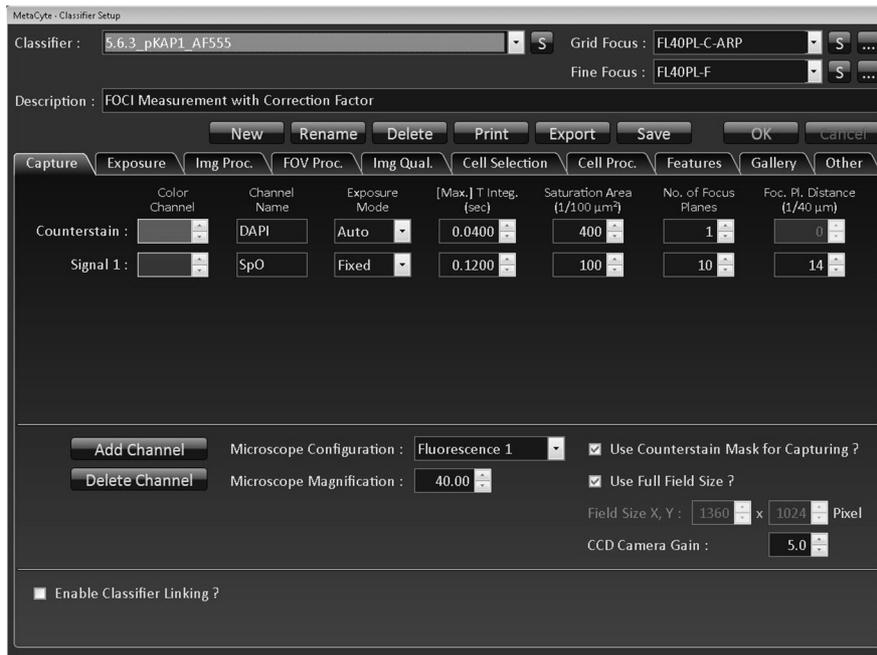
B



**Abbildung Anhang 7.** Einstellung des Klassifikators für die Quantifizierung von MDC1 Foci mit AlexaFluor® 488.

**A)** Die Integrationszeit im FITC Filter wurde auf 0,16 Sekunden fixiert. **B)** Signale mit einer relativen Signalintensität von 50% und einem Signalbereich von 0,5-1 wurden als Foci gewertet. Die Auswertung erfolgte mit Metafer4 (MetaSystems Hard & Software GmbH).

A



B



**Abbildung Anhang 8.** Einstellung des Klassifikators für die Quantifizierung von pKAP1 Foci mit AlexaFluor® 555.

**A)** Die Integrationszeit im *Spectrum-Orange* Filter wurde auf 0,12 Sekunden fixiert. **B)** Signale mit einer relativen Signalintensität von 30% und einem Signalbereich von 0,25-1 wurden als Foci gewertet. Die Auswertung erfolgte mit Metafer4 (MetaSystems Hard & Software GmbH).

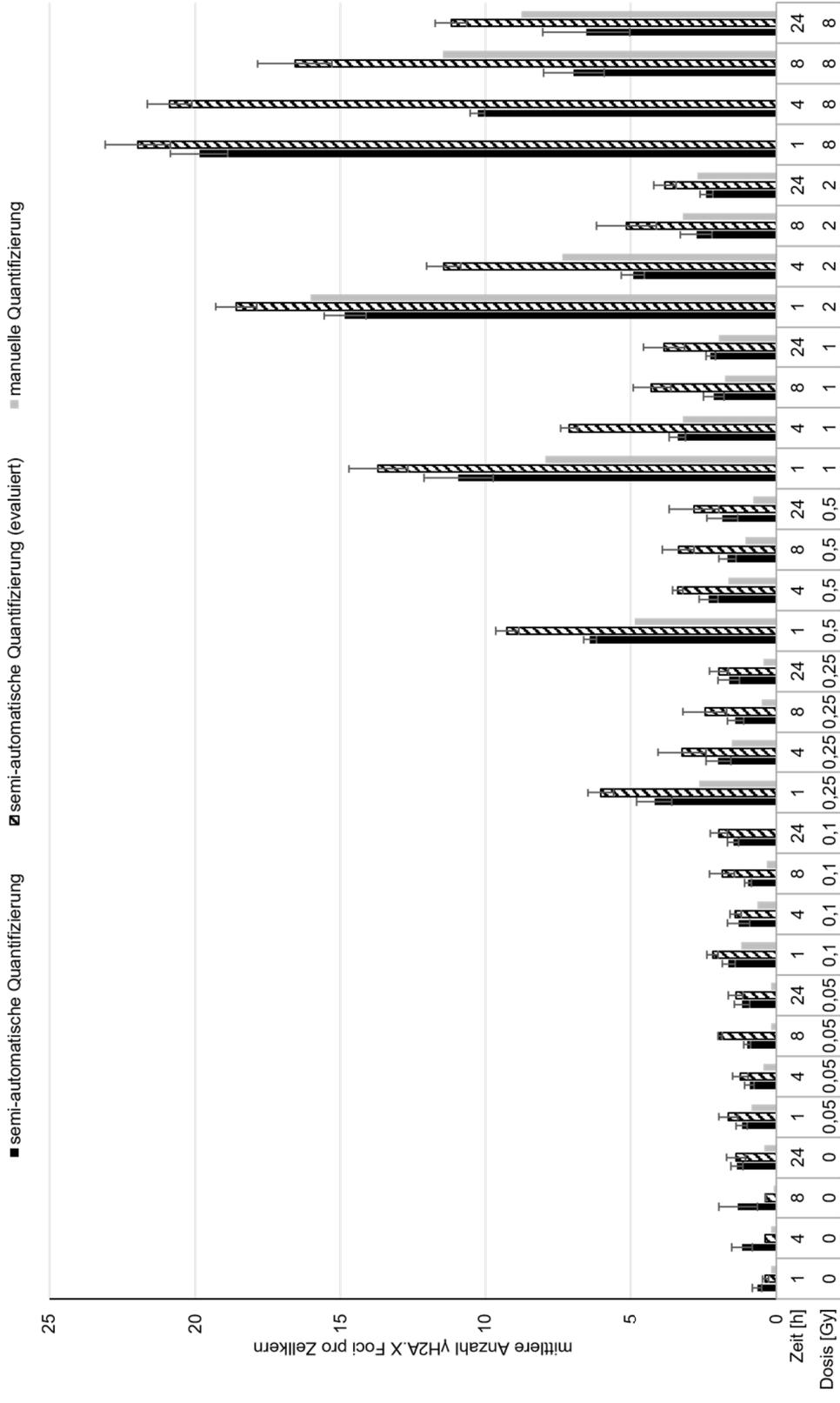


**Tabelle Anhang 1. Semi-automatische und manuelle Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Foci mit AlexaFluor® 555 pro Zellkern.**

Dargestellt ist der Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus sechs unabhängigen Replikaten für die Rohdaten der semi-automatischen Analyse und nach Qualitätskontrolle und Evaluierung durch den Experimentator. Für die manuelle Quantifizierung wurde der Mittelwert von Foci pro Zellkern aus jeweils mindestens 100 gezählten Zellen aus einem Versuch aufgeführt.

Dosis [Gy]	Zeit [h]	semi-automatische Quantifizierung [Foci/Zellkern]		semi-automatische Quantifizierung (evaluiert) [Foci/Zellkern]		manuelle Quantifizierung [Foci/Zellkern]
		Mittelwert	±SEM	Mittelwert	±SEM	Mittelwert
0	1	0,37	0,20	0,52	0,41	0
	4	0,68	0,14	0,25	0,11	0
	8	0,65	0,13	0,76	0,18	0,05
	24	0,28	0,07	0,33	0,09	0,01
0,05	1	0,54	0,10	0,71	0,18	0,48
	4	1,44	0,76	0,34	0,19	0,05
	8	0,79	0,21	0,72	0,29	0,05
	24	0,54	0,22	0,63	0,33	0
0,1	1	1,00	0,27	1,61	0,31	0,64
	4	0,99	0,19	1,26	0,62	0,05
	8	0,75	0,17	1,04	0,43	0,17
	24	0,45	0,21	0,70	0,44	0,02
0,25	1	2,20	0,67	4,02	1,23	1,98
	4	1,13	0,29	1,45	0,34	1,30
	8	0,99	0,13	1,26	0,21	0,77
	24	0,55	0,08	0,77	0,26	0,04
0,5	1	3,70	1,08	6,50	1,56	4,47
	4	1,46	0,46	1,94	0,87	0,62
	8	0,97	0,18	1,00	0,39	0,46
	24	0,80	0,31	0,67	0,30	0,28
1	1	6,93	2,07	12,79	1,04	10,58
	4	2,04	0,62	3,77	1,63	1,15
	8	1,13	0,24	1,42	0,56	0,86
	24	0,47	0,09	0,69	0,19	0,37
2	1	11,87	1,70	16,24	2,03	15,48
	4	3,38	0,47	6,77	1,93	2,86
	8	1,68	0,17	2,50	0,22	2,54
	24	1,11	0,34	1,83	0,42	0,71
8	1	18,16	3,24	22,65	1,65	--
	4	10,20	1,86	18,48	0,89	13,54
	8	3,63	0,61	8,76	2,76	7,23
	24	2,53	1,14	5,52	3,53	2,81

Abkürzungen: SEM, Standardfehler des Mittelwertes;



**Abbildung Anhang 10. Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von  $\gamma$ H2A.X Foci (AlexaFluor® 488).**

Es wurde die Bildung von  $\gamma$ H2A.X Foci mit einer dosisabhängigen Zunahme nach Bestrahlung und zeitabhängigen Abnahme in der Foci Anzahl beobachtet. Dargestellt sind die mittleren Anzahl der Foci mit dem Standardfehler des Mittelwertes der semi-automatischen Analyse vor und nach Qualitätskontrolle der Objektträger und die Werte der manuellen Quantifizierung. Reparaturfoci-Analyse wurde mit einem Metafer Scanning System durchgeführt.

**Tabelle Anhang 2. Semi-automatische und manuelle Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Foci mit AlexaFluor® 488 pro Zellkern.**

Dargestellt ist der Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus vier unabhängigen Replikaten für die Rohdaten der semi-automatischen Analyse und nach Qualitätskontrolle und Evaluierung durch den Experimentator. Für die manuelle Quantifizierung wurde der Mittelwert von Foci pro Zellkern aus jeweils mindestens 100 gezählten Zellen aus einem Versuch aufgeführt.

Dosis [Gy]	Zeit [h]	semi-automatische Quantifizierung [Foci/Zellkern]		semi-automatische Quantifizierung (evaluiert) [Foci/Zellkern]		manuelle Quantifizierung [Foci/Zellkern]
		Mittelwert	±SEM	Mittelwert	±SEM	Mittelwert
0	1	0,66	0,16	0,37	0,10	0,18
	4	1,18	0,34	0,40	--	0,19
	8	1,32	0,66	0,38	0,01	0,10
	24	1,35	0,21	1,38	0,33	0,43
0,05	1	1,19	0,20	1,64	0,31	0,85
	4	0,92	0,15	1,23	0,26	0,45
	8	1,01	0,12	1,93	0,07	0,18
	24	1,17	0,26	1,38	0,25	0,17
0,1	1	1,64	0,22	2,18	0,18	1,21
	4	1,30	0,38	1,40	0,19	0,64
	8	0,97	0,13	1,85	0,42	0,33
	24	1,47	0,19	1,97	0,30	--
0,25	1	4,17	0,59	6,05	0,43	2,64
	4	1,99	0,42	3,24	0,82	1,54
	8	1,40	0,28	2,44	0,74	0,51
	24	1,62	0,37	1,97	0,32	0,43
0,5	1	6,40	0,21	9,25	0,39	4,88
	4	2,31	0,32	3,37	0,18	1,63
	8	1,69	0,29	3,36	0,54	1,07
	24	1,85	0,53	2,82	0,86	0,80
1	1	10,92	1,20	13,70	1,01	7,95
	4	3,39	0,27	7,13	0,28	3,20
	8	2,14	0,34	4,27	0,66	1,77
	24	2,26	0,16	3,85	0,70	1,98
2	1	14,85	0,72	18,57	0,70	16,02
	4	4,92	0,41	11,42	0,59	7,35
	8	2,74	0,53	5,15	1,03	3,19
	24	2,39	0,22	3,82	0,38	2,69
8	1	19,86	0,99	21,97	1,12	--
	4	10,27	0,25	20,89	0,76	--
	8	6,97	1,04	16,57	1,28	11,45
	24	6,54	1,50	11,18	0,53	8,77

Abkürzungen: SEM, Standardfehler des Mittelwertes;



**Tabelle Anhang 3. Semi-automatische und manuelle Quantifizierung von 53BP1 Foci mit AlexaFluor® 555 pro Zellkern.**

Dargestellt ist der Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus fünf unabhängigen Replikaten für die Rohdaten der semi-automatischen Analyse und nach Qualitätskontrolle und Evaluierung durch den Experimentator. Für die manuelle Quantifizierung wurde der Mittelwert von Foci pro Zellkern aus jeweils mindestens 100 gezählten Zellen aus einem Versuch aufgeführt.

Dosis [Gy]	Zeit [h]	semi-automatische Quantifizierung [Foci/Zellkern]		semi-automatische Quantifizierung (evaluiert) [Foci/Zellkern]		manuelle Quantifizierung [Foci/Zellkern]
		Mittelwert	±SEM	Mittelwert	±SEM	Mittelwert
0	1	4,43	0,41	3,81	0,69	0,55
	4	3,37	0,64	3,28	0,77	0,62
	8	3,40	0,76	3,24	0,86	0,69
	24	2,65	0,19	2,41	0,19	1,06
0,05	1	1,99	0,12	2,00	0,15	1,38
	4	1,60	0,08	1,53	0,13	0,81
	8	1,77	0,16	1,72	0,16	0,36
	24	2,27	0,04	2,20	0,11	1,04
0,1	1	2,50	0,13	2,56	0,12	1,88
	4	1,63	0,05	1,61	0,08	0,59
	8	2,10	0,06	2,09	0,08	0,96
	24	1,95	0,09	1,91	0,12	0,88
0,25	1	4,69	0,17	4,85	0,05	3,59
	4	2,46	0,11	2,54	0,08	1,55
	8	2,75	0,18	2,79	0,16	1,39
	24	2,11	0,11	2,09	0,12	0,89
0,5	1	6,83	0,20	6,81	0,25	4,79
	4	3,27	0,15	3,35	0,10	2,36
	8	3,33	0,15	3,41	0,11	1,91
	24	2,56	0,17	2,56	0,17	0,92
1	1	10,18	0,22	10,27	0,26	10,85
	4	4,89	0,20	4,97	0,10	4,56
	8	4,09	0,20	4,21	0,18	2,18
	24	3,34	0,14	3,40	0,10	1,47
2	1	11,96	0,83	11,72	1,43	12,94
	4	7,75	0,11	7,83	0,12	7,55
	8	5,61	0,26	5,73	0,24	3,51
	24	4,06	0,35	4,30	0,30	3,42
8	1	10,52	1,14	10,33	1,78	8,51
	4	11,88	1,05	12,99	1,48	15,83
	8	11,91	0,67	11,89	0,90	12,82
	24	9,06	0,71	9,14	0,69	11,21

Abkürzungen: SEM, Standardfehler des Mittelwertes;

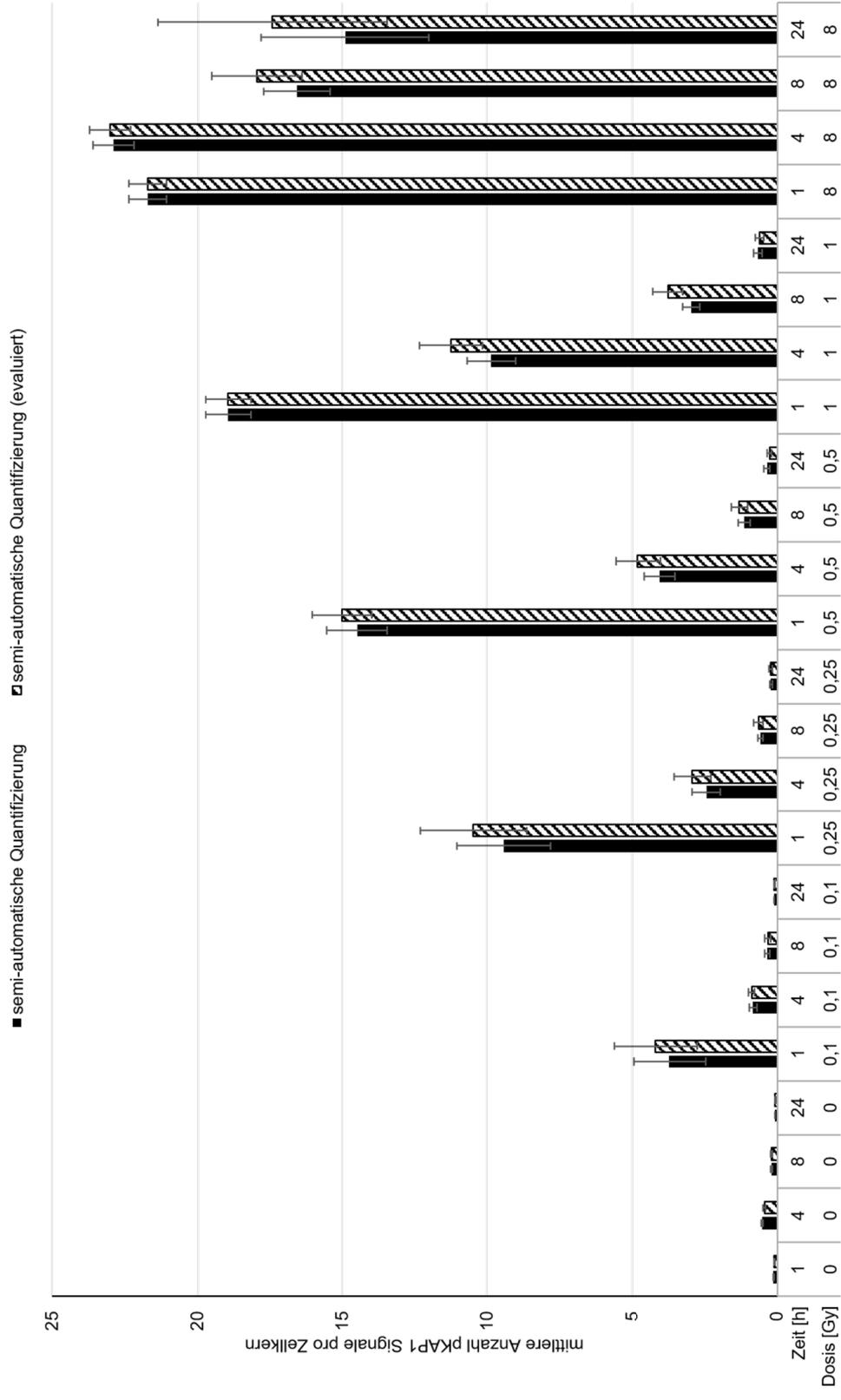


**Tabelle Anhang 4. Semi-automatische und manuelle Quantifizierung von MDC1 Foci mit AlexaFluor® 488 pro Zellkern.**

Dargestellt ist der Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus sechs unabhängigen Replikaten für die Rohdaten der semi-automatischen Analyse und nach Qualitätskontrolle und Evaluierung durch den Experimentator. Für die manuelle Quantifizierung wurde der Mittelwert von Foci pro Zellkern aus jeweils mindestens 100 gezählten Zellen aus einem Versuch aufgeführt.

Dosis [Gy]	Zeit [h]	semi-automatische Quantifizierung [Foci/Zellkern]		semi-automatische Quantifizierung (evaluiert) [Foci/Zellkern]		manuelle Quantifizierung [Foci/Zellkern]
		Mittelwert	±SEM	Mittelwert	±SEM	Mittelwert
0	1	0,44	0,06	0,57	0,12	0,16
	4	0,62	0,15	0,62	0,15	0,13
	8	0,64	0,07	0,69	0,06	0,16
	24	0,79	0,17	0,82	0,17	0,15
0,05	1	1,31	0,09	1,33	0,09	1,34
	4	0,94	0,10	0,96	0,10	0,62
	8	0,86	0,15	0,86	0,15	0,54
	24	0,73	0,08	0,74	0,08	0,25
0,1	1	1,88	0,20	1,91	0,20	1,92
	4	1,12	0,12	1,28	0,18	0,78
	8	0,92	0,05	0,95	0,05	0,99
	24	0,81	0,17	0,91	0,20	0,60
0,25	1	4,11	0,26	4,19	0,25	4,11
	4	1,97	0,32	2,17	0,33	1,86
	8	1,39	0,18	1,43	0,17	1,11
	24	1,05	0,18	1,11	0,18	0,78
0,5	1	4,33	0,55	4,39	0,56	5,18
	4	2,67	0,19	2,72	0,19	2,12
	8	1,83	0,18	1,85	0,19	2,36
	24	1,29	0,19	1,32	0,19	0,90
1	1	3,99	0,87	4,17	0,90	4,23
	4	3,44	0,44	3,78	0,46	4,86
	8	2,88	0,21	2,91	0,21	4,15
	24	1,88	0,18	1,92	0,18	2,29
2	1	1,55	0,53	1,59	0,51	1,24
	4	4,14	0,61	4,22	0,62	5,56
	8	4,10	0,30	4,43	0,23	6,03
	24	3,15	0,30	3,21	0,29	5,09
8	1	0,79	0,15	0,69	0,12	0,67
	4	1,46	0,39	1,50	0,39	2,45
	8	3,51	0,88	3,52	0,89	8,29
	24	3,96	0,90	5,05	0,64	9,53

Abkürzungen: SEM, Standardfehler des Mittelwertes;



**Abbildung Anhang 13. Dosis-Effekt-Kurve und Zeitkinetik von pKAP1 Signalen (AlexaFluor® 555).**

Es wurde die Bildung von pKAP1 Signalen mit einer dosisabhängigen Zunahme nach Bestrahlung und zeitabhängigen Abnahme in der Signalanzahl beobachtet. Dargestellt ist die mittlere Anzahl der Signale mit dem Standardfehler des Mittelwertes der semi-automatischen Analyse vor und nach Qualitätskontrolle der Objektträger. Reparaturfoci-Analyse wurde mit einem Metafer Scanning System durchgeführt.

**Tabelle Anhang 5.** Semi-automatische und manuelle Quantifizierung von pKAP1 Signalen mit Intensitätsmaxima mit AlexaFluor® 555 pro Zellkern.

Dargestellt ist der Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus vier unabhängigen Replikaten für die Rohdaten der semi-automatischen Analyse und nach Qualitätskontrolle und Evaluierung durch den Experimentator.

Dosis [Gy]	Zeit [h]	semi-automatische Quantifizierung [Foci/Zellkern]		semi-automatische Quantifizierung (evaluiert) [Foci/Zellkern]	
		Mittelwert	±SEM	Mittelwert	±SEM
0	1	0,13	0,02	0,10	0,01
	4	0,51	0,03	0,44	0,05
	8	0,19	0,04	0,19	0,03
	24	0,07	0,01	0,06	0,01
0,1	1	3,69	1,24	4,18	1,43
	4	0,82	0,12	0,87	0,11
	8	0,33	0,09	0,32	0,09
	24	0,11	0,01	0,09	0,01
0,25	1	9,42	1,61	10,47	1,84
	4	2,43	0,49	2,90	0,64
	8	0,56	0,09	0,64	0,16
	24	0,21	0,05	0,22	0,06
0,5	1	14,50	1,03	15,00	1,02
	4	4,03	0,54	4,78	0,78
	8	1,13	0,20	1,29	0,28
	24	0,34	0,10	0,26	0,08
1	1	18,93	0,79	18,94	0,79
	4	9,84	0,83	11,23	1,10
	8	2,93	0,29	3,74	0,51
	24	0,66	0,14	0,61	0,14
8	1	21,71	0,65	21,72	0,66
	4	22,90	0,70	23,01	0,70
	8	16,57	1,14	17,95	1,55
	24	14,89	2,90	17,42	3,96

Abkürzungen: SEM, Standardfehler des Mittelwertes;

**Tabelle Anhang 6.** Semi-automatische Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern in kryokonservierten Lymphozyten und frisch isolierten Lymphozyten aus Vollblut.

Die Anzahl der Foci pro Zellkern wurde in mindestens 500 Zellen in vier unabhängigen Versuchen bestimmt. Der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurde ermittelt und der P-Wert des Unterschiedes zwischen 0 Gy und den Bestrahlungsdosen mit dem Welch T-Test bestimmt. Zusätzlich wurde der P-Wert des Unterschiedes zwischen kryokonservierten Lymphozyten und frisch isolierten Lymphozyten für jeden Dosis berechnet.

Dosis [Gy]	kryokonservierte Lymphozyten [Foci/Zellkern]			frisch isolierte Lymphozyten [Foci/Zellkern]			Kryokonservierte vs. frisch isolierte Lymphozyten P-Wert
	Mittelwert	±SEM	Dosis vs. 0 Gy P-Wert	Mittelwert	±SEM	Dosis vs. 0 Gy P-Wert	
0	1,42	0,42	1,000	0,40	0,09	1,000	0,129
0,05	1,64	0,08	0,646	1,29	0,25	0,030	0,261
0,1	2,53	0,19	0,097	2,06	0,09	<0,001	0,082
0,25	4,92	0,72	0,022	3,90	0,33	0,001	0,292
0,5	7,19	0,32	0,001	6,35	0,14	<0,001	0,104
1	10,63	0,20	<0,001	9,56	0,41	<0,001	0,073
2	13,14	0,35	<0,001	13,12	1,21	0,009	0,985
8	16,77	0,41	<0,001	22,33	2,17	0,002	0,081

Abkürzungen: SEM, Standardfehler des Mittelwertes;

**Tabelle Anhang 7.** Semi-automatische Quantifizierung von 53BP1 Foci pro Zellkern in kryokonservierten Lymphozyten und frisch isolierten Lymphozyten aus Vollblut.

Die Anzahl der Foci pro Zellkern wurde in mindestens 500 Zellen in vier unabhängigen Versuchen bestimmt. Der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurde ermittelt und der P-Wert des Unterschiedes zwischen 0 Gy und den Bestrahlungsdosen mit dem Welch T-Test bestimmt. Zusätzlich wurde der P-Wert des Unterschiedes zwischen kryokonservierten Lymphozyten und frisch isolierten Lymphozyten für jeden Dosis berechnet.

Dosis [Gy]	kryokonservierte Lymphozyten [Foci/Zellkern]			frisch isolierte Lymphozyten [Foci/Zellkern]			Kryokonservierte vs. frisch isolierte Lymphozyten P-Wert
	Mittelwert	±SEM	Dosis vs. 0 Gy P-Wert	Mittelwert	±SEM	Dosis vs. 0 Gy P-Wert	
0	2,58	0,38	1,000	2,91	0,89	1,000	0,755
0,05	1,76	0,14	0,119	1,94	0,07	0,387	0,308
0,1	2,28	0,14	0,505	2,39	0,17	0,615	0,639
0,25	4,14	0,10	0,023	3,79	0,21	0,429	0,198
0,5	6,23	0,31	<0,001	5,37	0,16	0,105	0,062
1	8,86	0,41	<0,001	7,34	0,37	0,024	0,034
2	11,61	0,57	<0,001	9,81	0,97	0,003	0,173
8	11,94	2,38	0,028	11,07	2,58	0,045	0,813

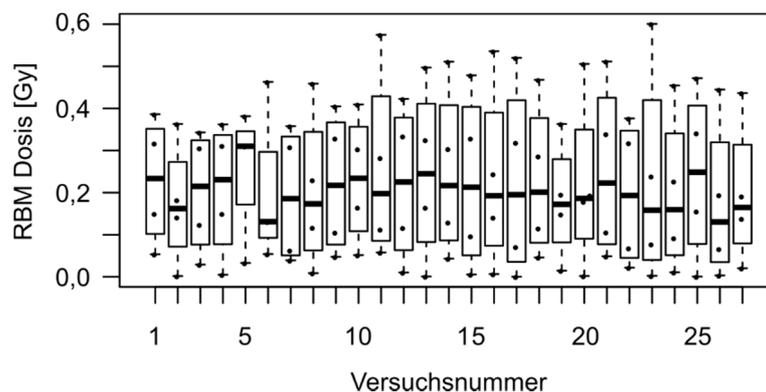
Abkürzungen: SEM, Standardfehler des Mittelwertes;

**Tabelle Anhang 8.** Semi-automatische Quantifizierung von pKAP1 Signale pro Zellkern in kryokonservierten Lymphozyten und frisch isolierten Lymphozyten aus Vollblut.

Die Anzahl der Foci pro Zellkern wurde in mindestens 500 Zellen in vier unabhängigen Versuchen bestimmt. Der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurde ermittelt und der P-Wert des Unterschiedes zwischen 0 Gy und den Bestrahlungsdosen mit dem Welch T-Test bestimmt. Zusätzlich wurde der P-Wert des Unterschiedes zwischen kryokonservierten Lymphozyten und frisch isolierten Lymphozyten für jeden Dosis berechnet.

Dosis [Gy]	kryokonservierte Lymphozyten [Signale/Zellkern]			frisch isolierte Lymphozyten [Signale/Zellkern]			Kryokonservierte vs. frisch isolierte Lymphozyten P-Wert
	Mittelwert	±SEM	Dosis vs. 0 Gy P-Wert	Mittelwert	±SEM	Dosis vs. 0 Gy P-Wert	
0	3,69	1,75	1,000	0,13	0,06	1,000	0,135
0,05	11,74	0,47	0,016	1,10	0,55	0,174	<0,001
0,1	14,63	2,55	0,015	2,37	0,66	0,043	0,014
0,25	17,92	2,84	0,008	5,08	1,68	0,060	0,012
0,5	17,16	0,15	0,004	7,90	2,53	0,054	0,035
1	19,91	1,05	0,001	12,60	4,01	0,053	0,165
2	20,10	1,04	0,001	19,87	3,86	0,036	0,959
8	19,51	0,75	0,001	23,50	2,42	0,066	0,329

Abkürzungen: SEM, Standardfehler des Mittelwertes;



**Abbildung Anhang 14.** Aufteilung der Probanden im Versuchsdesign der semi-automatischen RIF Analyse.

Die ehemaligen Wismut Bergarbeiter wurden auf Grundlage der absorbierten Gesamtdosis in vier Gruppen eingeteilt. Aus jeder dieser Gruppen wurde für die Versuche jeweils ein Proband zufällig ausgewählt. Effekte aufgrund der Expositionshöhe von einzelnen Probanden wurden damit ausgeschlossen.

**Tabelle Anhang 9. Semi-automatische Quantifizierung von  $\gamma$ H2A.X Foci pro Zellkern.**

Unbestrahlte und mit 0,1 und 1 Gy bestrahlte Zellen wurden 1 h nach Bestrahlung fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2A.X durch 2 Experten und 10 ungeübten Kursteilnehmern durchgeführt. Die Anzahl der  $\gamma$ H2A.X Foci für technische Replikate der Objektträger und die einzelnen Kursteilnehmer wurde mittels semi-automatischer Auswertung bestimmt und der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ermittelt.

Dosis	Mittlere Anzahl $\gamma$ H2A.X Foci/Zellkern ( $\pm$ SEM)								
	0 Gy			0,1 Gy			1 Gy		
Technisches Replikat des Objektträgers	Objektträger 1	Objektträger 2	Objektträger 3	Objektträger 1	Objektträger 2	Objektträger 3	Objektträger 1	Objektträger 2	Objektträger 3
Experte 1	0,16 ( $\pm$ 0,01)	0,26 ( $\pm$ 0,02)	0,15 ( $\pm$ 0,02)	1,60 ( $\pm$ 0,04)	1,53 ( $\pm$ 0,04)	1,82 ( $\pm$ 0,05)	7,01 ( $\pm$ 0,08)	7,24 ( $\pm$ 0,07)	7,23 ( $\pm$ 0,07)
Experte 2	0,28 ( $\pm$ 0,02)	0,30 ( $\pm$ 0,03)		2,60 ( $\pm$ 0,06)	2,27 ( $\pm$ 0,05)		7,71 ( $\pm$ 0,08)	7,30 ( $\pm$ 0,07)	
<b><math>\mu</math> Experten</b>		<b>0,23 (<math>\pm</math>0,01)</b>			<b>1,96 (<math>\pm</math>0,08)</b>			<b>7,30 (<math>\pm</math>0,05)</b>	
Kursteilnehmer 1	0,04 ( $\pm$ 0,01)	0,03 ( $\pm$ 0,01)		0,89 ( $\pm$ 0,03)			7,29 ( $\pm$ 0,08)	7,82 ( $\pm$ 0,08)	
Kursteilnehmer 2	0,24 ( $\pm$ 0,02)			1,67 ( $\pm$ 0,04)	2,06 ( $\pm$ 0,04)		7,38 ( $\pm$ 0,07)	7,51 ( $\pm$ 0,07)	
Kursteilnehmer 3	0,61 ( $\pm$ 0,03)	0,67 ( $\pm$ 0,03)		2,01 ( $\pm$ 0,04)			6,93 ( $\pm$ 0,07)		
Kursteilnehmer 4	0,20 ( $\pm$ 0,02)	0,48 ( $\pm$ 0,03)		2,36 ( $\pm$ 0,05)	2,02 ( $\pm$ 0,04)		7,00 ( $\pm$ 0,07)	6,92 ( $\pm$ 0,06)	
Kursteilnehmer 5	0,37 ( $\pm$ 0,02)	0,82 ( $\pm$ 0,04)		2,21 ( $\pm$ 0,05)	1,59 ( $\pm$ 0,07)		6,89 ( $\pm$ 0,06)	6,74 ( $\pm$ 0,08)	
Kursteilnehmer 6	0,65 ( $\pm$ 0,04)	0,58 ( $\pm$ 0,03)		2,23 ( $\pm$ 0,04)	2,01 ( $\pm$ 0,05)		7,94 ( $\pm$ 0,08)	7,23 ( $\pm$ 0,06)	
Kursteilnehmer 7	0,10 ( $\pm$ 0,01)			1,57 ( $\pm$ 0,04)	1,77 ( $\pm$ 0,04)		6,86 ( $\pm$ 0,06)	7,17 ( $\pm$ 0,07)	
Kursteilnehmer 8	0,37 ( $\pm$ 0,02)			2,06 ( $\pm$ 0,04)	1,97 ( $\pm$ 0,05)		7,28 ( $\pm$ 0,09)	7,39 ( $\pm$ 0,07)	
Kursteilnehmer 9	0,05 ( $\pm$ 0,01)	0,08 ( $\pm$ 0,01)		1,20 ( $\pm$ 0,03)	1,07 ( $\pm$ 0,03)		7,55 ( $\pm$ 0,08)	6,93 ( $\pm$ 0,08)	
Kursteilnehmer 10	0,08 ( $\pm$ 0,01)	0,17 ( $\pm$ 0,02)		2,62 ( $\pm$ 0,06)	2,12 ( $\pm$ 0,05)		6,44 ( $\pm$ 0,07)	6,95 ( $\pm$ 0,09)	
<b><math>\mu</math> Kursteilnehmer</b>		<b>0,33 (<math>\pm</math>0,01)</b>			<b>1,86 (<math>\pm</math>0,02)</b>			<b>7,17 (<math>\pm</math>0,02)</b>	

**Tabelle Anhang 10. Manuelle Quantifizierung von RIF pro Zellkern von einem Experten und 16 ungeübten Kursteilnehmern.**

Die Anzahl der induzierten Foci wurde 1 h nach Bestrahlung in mindestens 100 Zellkernen bestimmt und der Mittelwert der Foci mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) bestimmt. Jeder Kursteilnehmer bestimmte die Foci Anzahl von zwei verblindeten Objektträgern, sodass jeder Dosispunkt viermal durch Kursteilnehmer ausgezählt wurde.

Foci Quantifizierung		Dosis [Gy]									
		0	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1	1,5		
Mittlere Anzahl (± SEM) YH2A.X Foci/Zellkern	Zählung Experte	0,19 (±0,05)	0,74 (±0,08)	3,41 (±0,16)	6,01 (±0,13)	8,16 (±0,22)	10,20 (±0,26)	12,18 (±0,26)	15,17 (±0,42)		
	Zählung Kursteilnehmer 1	0,20 (±0,05)	1,68 (±0,18)	1,69 (±0,16)	4,51 (±0,24)	5,70 (±0,23)	7,68 (±0,27)	7,87 (±0,23)	16,01 (±0,41)		
	Zählung Kursteilnehmer 2	0,17 (±0,06)	0,65 (±0,07)	2,72 (±0,15)	3,43 (±0,17)	5,89 (±0,22)	7,94 (±0,25)	8,41 (±0,24)	9,51 (±0,24)		
	Zählung Kursteilnehmer 3	0,53 (±0,09)	0,93 (±0,11)	1,61 (±0,11)	5,10 (±0,18)	6,22 (±0,24)	5,91 (±0,26)	8,67 (±0,31)	14,64 (±0,31)		
Mittlere Anzahl (± SEM) 53BP1 Foci/Zellkern	Zählung Kursteilnehmer 4	0,16 (±0,04)	0,79 (±0,10)	1,67 (±0,12)	3,46 (±0,18)	4,95 (±0,17)	8,79 (±0,25)	7,19 (±0,21)	8,78 (±0,23)		
	Zählung Experte	1,48 (±0,14)	1,96 (±0,10)	3,12 (±0,13)	4,93 (±0,13)	6,60 (±0,21)	8,82 (±0,22)	9,76 (±0,21)	12,39 (±0,31)		
	Zählung Kursteilnehmer 1	1,45 (±0,13)	2,72 (±0,29)	2,44 (±0,13)	4,71 (±0,24)	5,12 (±0,21)	8,43 (±0,26)	7,68 (±0,24)	15,54 (±0,34)		
	Zählung Kursteilnehmer 2	1,04 (±0,11)	1,10 (±0,07)	3,22 (±0,15)	3,39 (±0,14)	5,73 (±0,21)	8,82 (±0,26)	8,32 (±0,23)	8,63 (±0,23)		
Mittlere Anzahl (± SEM) Focalisierter YH2A.X/53BP1 Foci/Zellkern	Zählung Kursteilnehmer 3	1,49 (±0,15)	1,52 (±0,11)	2,22 (±0,11)	5,53 (±0,19)	6,35 (±0,24)	8,60 (±0,24)	8,91 (±0,27)	14,47 (±0,35)		
	Zählung Kursteilnehmer 4	0,89 (±0,09)	1,48 (±0,12)	2,04 (±0,11)	3,86 (±0,17)	5,04 (±0,18)	6,65 (±0,21)	6,41 (±0,20)	8,73 (±0,26)		
	Zählung Experte	0,14 (±0,04)	0,63 (±0,09)	2,80 (±0,13)	4,84 (±0,12)	6,05 (±0,19)	7,94 (±0,20)	9,30 (±0,18)	11,57 (±0,26)		
	Zählung Kursteilnehmer 1	0,11 (±0,04)	1,52 (±0,16)	1,53 (±0,12)	4,05 (±0,22)	4,53 (±0,22)	6,38 (±0,23)	6,28 (±0,20)	13,14 (±0,30)		
Mittlere Anzahl (± SEM) Kolokalisierte YH2A.X/53BP1 Foci/Zellkern	Zählung Kursteilnehmer 2	0,14 (±0,05)	0,65 (±0,07)	2,47 (±0,13)	2,76 (±0,16)	5,24 (±0,19)	6,89 (±0,23)	7,06 (±0,21)	6,78 (±0,19)		
	Zählung Kursteilnehmer 3	0,42 (±0,08)	0,81 (±0,09)	1,60 (±0,11)	4,45 (±0,17)	5,56 (±0,22)	4,93 (±0,23)	7,55 (±0,27)	12,67 (±0,27)		
	Zählung Kursteilnehmer 4	0,14 (±0,03)	0,70 (±0,09)	1,54 (±0,11)	3,07 (±0,17)	3,97 (±0,15)	6,61 (±0,19)	5,78 (±0,18)	7,71 (±0,21)		

Abkürzungen: SEM, Standardfehler des Mittelwertes;

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in meiner Promotionsphase fachlich und persönlich unterstützt haben.

Die vorliegende Forschungsarbeit wurde am Bundesamt für Strahlenschutz angefertigt. Das Promotionsverfahren erfolgte an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes.

Für die Übernahme der Betreuung und der Begutachtung meiner Promotionsarbeit danke ich sehr Herrn Prof. Meese und Frau Prof. Rübe. Im Rahmen eines Verbundprojektes hat mir Frau Prof. Rübe als Projektkoordinatorin die Möglichkeit gegeben das Promotionsverfahren an der Universität des Saarlandes durchzuführen und mich in meinem Vorhaben unterstützt.

In besonderer Weise möchte ich mich bei Maria Gomolka, Ute Rößler und Sabine Hornhardt für die intensive Betreuung, hingebungsvolle Unterstützung, konstruktiven Diskussionen, offenen Ohren, und zahlreichen Ratschläge bedanken. Die Betreuung war zu jeder Zeit außerordentlich.

Darüber gilt mein außerordentlicher Dank Juliane, David, Cedric, Jessi, Ingrid, Frank, Martina, Claudia, Elisa, Uschi, Teresa, Uli, Simone, Paco, Leonard, Felix, Saskia, Sabine und Sven für ihre tolle Unterstützung im Labor, bei statistischen Fragestellungen, bei der Lösung von Problemen und der Einführung in die praktischen Methoden. Ich danke allen für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die gute Arbeitsatmosphäre während der Promotionszeit.

Meinen Eltern und meiner Lebenspartnerin danke ich für die fortwährende und liebevolle Unterstützung auf meinem Weg.