

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Christian Rube

**Untersuchung der DNA-Reparaturkapazität
strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche
in Blut-Lymphozyten von Kindern
mit malignen Erkrankungen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Julia Feldle
geboren am 23.05.1988 in Ulm

Tag der Promotion:	09.06.2021
Dekan:	Prof. Dr. med. M. D. Menger
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. med. Stephan Stilgenbauer
Prüfer:	Prof. Dr. med. Claudia Rube Prof. Dr. med. Norbert Graf

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1. Zusammenfassung/Summary	4
2. Einleitung	6
2.1. Maligne Erkrankungen im Kindesalter	6
2.1.1. Epidemiologie maligner Erkrankungen im Kindesalter.....	6
2.1.2. Tumorgenese im Kindesalter.....	7
2.2. Strahlenbiologie	9
2.2.1. Ionisierende Strahlung.....	9
2.2.2. Zelluläre Strahlenschäden.....	10
2.2.3. DSB-Reparaturwege.....	11
2.3. DSB-Reparaturproteine und Immunfluoreszenzmikroskopie	13
2.3.1. Phosphorylierung der Histonvariante H2AX.....	13
2.3.2. Ataxia-Teleangiectasia-mutated Proteinkinase.....	14
2.3.3. p53-bindendes Protein 1.....	15
2.3.4. Nachweis von Reparaturproteinen als Foci mittels Immunfluoreszenzmikroskopie..	16
2.4. Zellsedimentationsverfahren	17
2.4.1. Schwerkraftsedimentation.....	18
2.4.2. Zytozentrifugation.....	18
2.5. Fragestellungen	21
3. Material und Methodik	22
3.1. Geräte und Material	22
3.1.1. Geräte.....	22
3.1.2. Materialien.....	22
3.2. Chemikalien und deren Zusammensetzung	23
3.2.1. Chemikalien.....	23
3.2.2. Lösungen.....	24
3.3. Probanden	24
3.4. Methodik	25
3.4.1. Blutentnahme.....	25
3.4.2. Isolierung und Kryokonservierung von Lymphozyten.....	25
3.4.3. Zellkultivierung.....	26
3.4.4. Bestrahlung.....	26
3.4.5. Immunfluoreszenzmarkierung.....	28
3.4.6. Immunfluoreszenzmikroskopie.....	30

4. Ergebnisse	31
4.1. Epidemiologie der eingeschlossenen Kinder	31
4.2. Auswertung der DSB-Reparaturkinetik in isolierten Lymphozyten	32
4.2.1. DSB-Reparaturkinetik von Kindern mit Malignom und gesunden Kindern	33
4.2.2. DSB-Reparaturkinetik der angefärbten Reparaturproteine	37
5. Diskussion	39
5.1. Betrachtung der Versuchsmethodik	39
5.1.1. Auswahl des Patientenkollektives	39
5.1.2. Untersuchung der DSB-Reparaturkapazität mittels IFM	42
5.1.3. Cytospin als Zellsedimentationsverfahren	44
5.2. Betrachtung der Versuchsergebnisse mit Vorarbeiten	45
5.2.1. Vergleich der DSB-Reparaturkinetik von Kindern mit maligner Erkrankung und gesunden Kontrollkindern	45
5.2.2. Vergleich der Reparaturkinetiken für γH2AX, 53BP1 und ATM	47
5.3. Schlussfolgerung	49
6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen	51
6.1. Abbildungsverzeichnis	51
6.2. Tabellenverzeichnis	53
6.3. Literaturverzeichnis	54
6.4. Abkürzungsverzeichnis	62
7. Danksagung	65
8. Lebenslauf	66

1. Zusammenfassung/Summary

Fragestellung: Als Ursachen maligner Tumore bei Kindern spielen steigendes Lebensalter und Exposition gegenüber mutagener Noxen eine untergeordnete Rolle. Genetische Veränderungen der Erbsubstanz erscheinen als Auslöser wahrscheinlicher. Eine verminderte oder fehlerhafte Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSBs) der Desoxyribonukleinsäure (DNA) kann, wie Studien bereits gezeigt haben, zu einer erhöhten Tumorwahrscheinlichkeit führen. DNA-Reparaturproteine, die im Umfeld eines DSBs akkumulieren, können bei der Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) mittels Antikörperbasierter Markierung als punktförmige Lichtsignale, sogenannte Foci, lichtmikroskopisch in den Zellkernen der Lymphozyten visualisiert werden. Ziel war es durch die quantitative Analyse vorhandener Foci an definierten Zeitpunkten nach der Bestrahlung Patienten mit eingeschränkter DNA-Reparaturkapazität zu identifizieren.

Material und Methoden: Lymphozyten wurden aus dem Blut von Kindern mit Malignomen (n = 24) sowie aus gesunden Kontrollkindern (n = 18) isoliert und kryokonserviert. Nach späterer Kultivierung der Lymphozyten wurden diese ex vivo bestrahlt, drei unterschiedliche DNA-Reparaturfaktoren (γ H2AX-, pATM- und 53BP1) markiert und zu definierten Zeitpunkten (30 Minuten, 8 und 24 Stunden) nach Bestrahlung die Foci quantitativ erfasst. Im Laufe des Projektes waren Proben (n = 16) wegen der geringen Anzahl an sedimentierten Zellen aufgrund kleiner Blutvolumina und Zellverlust während der IFM-Markierung nicht auswertbar. Auf Basis einer Literaturrecherche wurde die Methode zum Aufbringen der Zellen auf die Objektträger modifiziert. Hierdurch war es möglich eine ausreichende Menge an Lymphozyten mittels IFM zu analysieren (Malignome n = 14; Kontrollen n = 12). Darüber hinaus wurde der Therapieverlauf der Kinder mit Malignom anhand deren Akten über 6 Jahre ausgewertet um mögliche Parallelen zwischen ausgeprägten Tumorthherapie-assoziierten Nebenwirkungen und einer eventuell vorhandenen verminderten DNA-Reparaturkapazität zu detektieren.

Ergebnisse: Durch den Vergleich quantifizierter γ H2AX, pATM und 53BP1-Foci konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kindern mit Malignomen und gesunden Kindern nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Die Hypothese, dass eine verminderte DNA-Reparaturkapazität eine mögliche Ursache für die Entstehung maligner Erkrankungen im Kindesalter darstellt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Einflussfaktoren wie die Kryokonservierung der Lymphozyten, die maschinelle Zellzentrifugation als Sedimentationsverfahren, die kleine Fallzahl oder der Studieneinschluss von Leukämiepatienten könnten dazu geführt haben, dass eine verminderte DSB-Reparaturkapazität nicht mehr detektierbar war. Zur Validierung des Ergebnisses sollten die Experimente an Lymphozyten ohne vorangegangener Kryokonservierung und einer deutlich höheren Anzahl an Patienten erneut erfolgen.

1. Zusammenfassung/Summary

Purpose: As the causes of malignant tumors in children, increasing age and exposure to mutagenic noxae play a subordinate role. Genetic changes in the genetic material appear to be a more likely trigger. A reduced or faulty repair of double-strand breaks (DSBs) in deoxyribonucleic acid (DNA) can, as studies have already shown, lead to an increased likelihood of tumors. DNA repair proteins that accumulate in the vicinity of a DSB can be visualized in the cell nuclei of the lymphocytes as punctiform light signals, so-called foci, using antibody-based marking in immunofluorescence microscopy (IFM). The aim was to identify patients with limited DNA repair capacity through the quantitative analysis of existing foci at defined times after irradiation.

Material and Methods: Lymphocytes were isolated from the blood of children with malignancies (n = 24) and from healthy control children (n = 18) and cryopreserved. After later cultivation of the lymphocytes, they were irradiated ex vivo, three different DNA repair factors (γ H2AX-, pATM- and 53BP1) were marked and the foci were quantitatively recorded at defined times (30 minutes, 8 and 24 hours) after irradiation. In the course of the project, samples (n = 16) could not be evaluated due to the small number of sedimented cells, due to small blood volumes and cell loss during IFM labeling. On the basis of a literature search, the method for applying the cells to the slide was modified. This made it possible to analyze a sufficient amount of lymphocytes using IFM (malignancies n = 14; controls n = 12). In addition, the course of therapy of the children with malignancy was evaluated on the basis of their files over a period of 6 years in order to detect possible parallels between pronounced tumor therapy-associated side effects and a possibly existing reduced DNA repair capacity.

Results: By comparing quantified γ H2AX, pATM and 53BP1 foci, no significant difference between children with malignancies and healthy children could be demonstrated.

Conclusion: The hypothesis that a reduced DNA repair capacity is a possible cause for the development of malignant diseases in childhood could not be confirmed in this study. Influencing factors such as the cryopreservation of the lymphocytes, machine cell centrifugation as a sedimentation method, the small number of cases or the study inclusion of leukemia patients could have led to a reduced DSB repair capacity no longer being detectable. To validate the result, the experiments on lymphocytes without prior cryopreservation and a significantly higher number of patients should be carried out again.

2. Einleitung

2.1. Maligne Erkrankungen im Kindesalter

2.1.1. Epidemiologie maligner Erkrankungen im Kindesalter

Erkrankt ein Kind an Krebs, verändert sich im Augenblick der Diagnose das Leben der gesamten Familie. Nicht nur für die Kinder ist dies eine Belastung, auch für die Eltern ist es schwierig sich mit den Unsicherheiten und Verlustängsten zurechtzufinden (Gutjahr 2004). Im Jahr 2017 gab es 2.216 neu aufgetretene Fälle von maligner Erkrankung bei unter 18-Jährigen. Hierbei werden jedoch Erkrankungen der 15- bis 18-Jährigen zum Teil außerhalb der Kinder- und Jugendonkologie behandelt, weshalb die Meldung an das Deutsche Kinderkrebsregister (DKKR) nicht verpflichtend ist und somit die Inzidenz nicht vollständig erhoben wird. 1.839 der neuerkrankten Kinder waren unter 15 Jahre alt. Eine Häufung gibt es insbesondere bei den unter 5-Jährigen (n = 795) sowie männlichen Geschlechts (Jungen n = 979, Mädchen n = 796). 82 % der unter 15-Jährigen überleben derzeit eine Krebserkrankung mindestens 15 Jahre. 410 Todesfälle pro Jahr ereignen sich innerhalb von 15 Jahren nach Diagnosestellung. 7,3% der unter 15-Jährigen entwickeln innerhalb von 30 Jahren nach Erstdiagnose eine Zweitneoplasie. Die hämatologischen Erkrankungen sind die häufigsten bösartigen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Jungen sind auch hier mit etwa 20% öfter betroffen als Mädchen. Bei Kindern überwiegen im Vergleich zu den Erwachsenen die akuten Formen der Leukämie. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist mit ungefähr 25% aller Neuerkrankungen hierunter die Häufigste. Im Vergleich zu den Erwachsenen treten bei Kindern öfter embryonale Tumore und seltener Karzinome auf (Kinderkrebsregister 2018).

Tumore bei Kindern und Jugendlichen frühzeitig zu erkennen ist aufgrund meist unspezifischer oder primär harmlos wirkender Symptome schwierig. Bestehen bestimmte Krankheitssymptome fort, dauern länger an oder nehmen zu, muss eine maligne Erkrankung als mögliche Diagnose in Erwägung gezogen werden. Die Symptome bestehen aus allgemeinen Krankheits- und tumorspezifischen Zeichen. Eine Früherkennung wie bei Krebserkrankungen im Erwachsenenalter spielt bei Kindern und Jugendlichen nur eine untergeordnete Rolle, da die Inzidenz niedrig ist und es meist zu einem raschen Fortschreiten der Erkrankung kommt. Betroffene Patienten und deren Familien fragen sich meist, wer Schuld an der Erkrankung trägt, ob man hätte dem vorbeugen oder dies verhindern können. Doch trotz intensiver Forschung ist nicht eindeutig geklärt, warum Kinder und Jugendliche an malignen Tumoren erkranken (Gutjahr 2004).

2. Einleitung

2.1.2. Tumorgenese im Kindesalter

Gesunde Zellen passen ihr Verhalten und ihre Funktion an die Bedürfnisse des Körpers an. Sie teilen sich, reifen, erlernen Funktionen, altern und sterben. Dieser Ablauf wird streng reguliert und koordiniert (Roessner et al. 2008). Tumorzellen hingegen weisen zahlreiche genomische Veränderungen auf, welche die Regulation der normalen zellulären Proliferation und Homöostase betreffen (Alberts et al. 2005).

Die Tumorentstehung ist ein langwieriger Prozess und erfolgt in mehreren Schritten. Initial entsteht ein Schaden in der DNA. Entfernen körpereigene Reparaturmechanismen diesen Defekt nicht oder unzureichend, wird dieser an die Tochterzelle weitervererbt. Befindet sich ein solcher Defekt in einem Regulationsgen (Protoonkogen, Tumorsuppressorgen oder DNA-Reparaturgen), kann dies eine maligne Transformation initiieren und durch Proliferation der neoplastischen Zellreihe zur Progression führen (Roessner et al. 2008).

Protoonkogene kodieren Faktoren und Rezeptoren des Zellwachstums. Ihre Funktion besteht somit in der Proliferationssteigerung oder antiapoptischen Funktion. Erfolgt durch Mutation die Aktivierung eines Protoonkogens zum Onkogen, fördert dies den Übergang von normalen Wachstumsverhalten zum ungebremsten Tumorwachstum. Tumorsuppressorgene hemmen die Zellproliferation, kontrollieren den Zellzyklus und lösen die Apoptose aus. Am Bekanntesten ist die Mutation des Tumorsuppressorgens Protein 53 (p53), da diese die häufigste genetische Veränderung in menschlichen Tumoren darstellt. Nach dem Funktionsverlust von p53 werden Zellen ohne Kontrolle mitotisch vervielfältigt. DNA-Reparaturgene kodieren Proteine, welche spontan oder Mutagen-bedingt entstandene Fehler bei der DNA-Replikation korrigieren. Geschieht dies nicht, werden Mutationen an die Tochterzelle weitergegeben. Den DNA-Reparaturgenen kommt bei der Erhaltung genomischer Integrität also eine große Bedeutung zu (Roessner et al. 2008).

Es gibt zwei Optionen für die Entstehung von Mutationen: spontan oder durch exogene Faktoren. Spontane Mutationen treten ohne äußere Einflüsse beispielsweise durch Replikationsfehler bei der DNA-Verdopplung auf. Somit sind Zellen, selbst in einer Umgebung die frei von exogenen Noxen ist, aufgrund spontaner Mutationen auf die Genauigkeit der DNA-Replikation oder deren Reparatur im Schadensfall angewiesen. Im Laufe des Lebens und durch eine Reihe exogener Mutagene wie beispielsweise Toxine aus Zigarettenrauch oder Nahrungsmitteln aber auch durch Infektionen oder die natürliche Strahlenbelastung akkumulieren DNA-Schäden, welche zur Entstehung von Malignomen führen können. Krebs ist daher typischerweise eine Krankheit des Alters (Alberts et al. 2005). Auch eine Untersuchung von Rube CE. et al. 2011 bestätigte den Einfluss des Lebensalters und zeigte bei CD34+ Stammzellen aus dem Knochenmark 50-jähriger Probanden im Vergleich zu den CD34+ Stammzellen aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen nach Bestrahlung ein erhöhtes Auftreten von DSBs sowie einer verminderten DSB-Reparaturkapazität im Alter.

2. Einleitung

Die Akkumulation von DNA-Schäden durch voranschreitendes Lebensalter kann bei der Entstehung maligner Tumore im Kindesalter allerdings nur begrenzt eine Rolle spielen. Die Ätiologie maligner Erkrankungen bei Kindern im Vergleich zum Erwachsenen scheint genetisch bedingt (Robert-Koch Institut 2008).

Ferner gibt es mehrere seltene genetisch bedingte familiäre Tumorsyndrome, welche mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für maligne Erkrankungen in niedrigem Lebensalter assoziiert sind. Hierzu zählen unter anderen bestimmte monogen-vererbte Formen des familiären Brustkrebses mit Mutationen des Tumorsuppressorgens Breast Cancer Gene 1 (BRCA1) und Breast Cancer Gene 2 (BRCA2). Eine andere Erkrankung mit genetischer Prädisposition für erhöhte Tumorstärke ist die Ataxia teleangiectasia (AT). Bei dieser Erkrankung besteht eine Mutation in dem Gen, welches das Ataxia teleangiectasia mutated-Protein (ATM) codiert. Dies führt zu einer Verminderung der Aktivität oder zum kompletten Verlust der Funktion des Proteins. ATM ist zuständig für die Aktivierung von weiteren Proteinen der DNA-Reparaturkaskade und reguliert bei Bedarf p53 hoch. Geschieht dies im Schadensfall nicht, führt dies zur Einschränkung in der DSB-Reparatur und einer gestörten Zellzykluskontrolle (Roessner et al. 2008).

In einer Pilotstudie von Rube CE. et al. 2010 wurde die DSB-Reparaturkapazität von Kindern mit soliden Malignomen im Vergleich zu altersangepassten gesunden Kontrollkindern analysiert. Die Reparatur von DSBs wurde untersucht, indem in Blut-Lymphozyten die Ansammlungen von phosphoryliertem H2AX (γ H2AX) im Umfeld der DSBs zu definierten Zeitpunkten nach ex vivo Bestrahlung von Blutproben gezählt wurden. Die Ergebnisse wurden mit behandlungsbedingten Reaktionen auf normales Gewebe (Normalgewebstoxizitäten) korreliert um hierdurch mögliche Überreaktionen auf die DNA-schädigende Tumorthherapie zu detektieren. Während alle gesunden Kontrollkinder eine kompetente DSB-Reparatur aufwiesen, zeigten drei der untersuchten Kinder mit Tumoren deutlich beeinträchtigte DSB-Reparaturkapazitäten. Zwei dieser drei Kinder entwickelten lebensbedrohliche oder sogar letale Normalgewebstoxizitäten. Die zugrundeliegenden Mutationen, welche Proteine betreffen die an DNA-Reparaturwegen beteiligt sind, konnten identifiziert werden. Darüber hinaus wurden signifikante Unterschiede in der mittleren DSB-Reparaturkapazität zwischen Kindern mit Tumoren und Kontrollkindern beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass maligne Erkrankungen im Kindesalter auf genetischen Veränderungen beruhen, welche die DSB-Reparaturfunktion beeinflussen. Bei Patienten mit einer defizienten DNA-Reparatur ist eine gesteigerte Strahlensensibilität und ein erhöhtes Malignomrisiko möglich, was sich im Rahmen einer Strahlentherapie mit verstärkten Nebenwirkungen und einer erhöhten Anzahl von Zweitmalignomen präsentiert. Die ausgeprägte Variabilität strahlenbedingter Nebenwirkungen unter den Patienten kann deshalb nicht nur ausschließlich durch die DNA-schädigende Therapie selbst erklärt werden, sondern sie wird ebenfalls durch die individuelle DNA-Reparaturkapazität des Patienten mitbestimmt. Eine genetische Prädisposition, die beispielsweise zu einer Veränderung von Proteinen der DNA-

2. Einleitung

Schadensantwort führt, ist an der individuellen Tumorwahrscheinlichkeit und dem Risiko von therapieassoziierten Nebenwirkungen beteiligt (Chistiakov et al. 2008; Rube CE. et al. 2010).

In einer Folgearbeit von Schuler et al. 2014 wurde die DSB-Reparaturkinetik von Kindern mit soliden Malignomen sowie Leukämien und gesunden Kontrollkindern auf die gleiche Weise untersucht. Bei Schuler et al. 2014 wurden neben γ H2AX-Foci zwei weitere DSB-Reparaturproteine, phosphorylierte Ataxia-Teleangiectasia-mutated Proteinkinase (pATM) und p53 bindendes Protein 1 (53BP1), visualisiert und analysiert. Ebenfalls wurden die DSB-Reparaturkapazitäten mit den aufgetretenen Normalgewebstoxizitäten korreliert. Zwischen den Tumorkindern und den gesunden Kontrollen wurden erneut Unterschiede in der mittleren DSB-Reparaturkapazität detektiert und so die Hypothese untermauert, dass genetische Veränderungen der DSB-Reparatur für die Tumorentstehung in jüngeren Jahren prädisponieren und die Anfälligkeit für ausgeprägte Normalgewebetoxizitäten beeinflussen. Vier Kinder mit maligner Erkrankung zeigten deutlich ausgeprägte Normalgewebetoxizitäten. Jedoch nur eines davon wies eine beeinträchtigte DSB-Reparaturkapazität auf. Dies wiederum zeigt, dass nicht alle behandlungsbedingten Toxizitäten des normalen Gewebes durch eine eingeschränkte DSB-Reparaturkapazität erklärt werden können.

2.2. Strahlenbiologie

2.2.1. Ionisierende Strahlung

Durch das Herauslösen von Elektronen aus ursprünglich elektrisch neutralen Atomen oder Molekülen mittels Energieübertragung entstehen geladene Ionen oder Moleküle. Dieser Vorgang wird als Ionisation bezeichnet und ist namensgebend für diese Form der Strahlung: ionisierende Strahlung (Gerthsen und Vogel 1995). Durch ionisierende Strahlung werden im Erbgut vielfältige DNA-Schäden induziert und Moleküle verändert (Sutherland et al. 2000). Erfolgt eine Zellteilung mit unreparierten DNA-Schäden können insbesondere DSBs durch die nun fehlende Kontinuität der Chromosomen zum Verlust genetischer Information und zum Zelltod führen (Gruppen 2008; Kauffmann et al. 2011). In der Strahlentherapie wird zur perkutanen Behandlung ionisierende Strahlung durch Linearbeschleuniger erzeugt. Ihr Einsatz dient dazu benigne und maligne Tumore zu heilen oder deren Progress zu verhindern. Die durch ionisierende Strahlung absorbierte Energie pro Masse wird als Energiedosis bezeichnet. Der Quotient aus der aufgenommenen Energie in Joule (J) und der Masse des Körpers in Kilogramm (kg) wird in der Einheit Gray (Gy) angegeben: $1\text{Gy} = 1\text{ J/kg}$ (Streffler C. 1969).

2. Einleitung

2.2.2. Zelluläre Strahlenschäden

Die durch ionisierende Strahlung auf Zellen übertragene Energie induziert Schäden in allen intrazellulären Molekülen innerhalb der im Strahlenfeld befindlichen Zellen (Sutherland et al. 2000). Schäden an Polysacchariden und Lipiden haben jedoch keinen Einfluss auf das Überleben einer Zelle. Proteine, die durch strahleninduzierte Schäden ihre Funktionsfähigkeit verlieren, werden im Rahmen des Zellmetabolismus resynthetisiert. Auch dies hat keinen Einfluss auf das Zellüberleben. Die DNA hingegen reagiert empfindlich auf Strahlung, wobei Schäden direkt oder indirekt entstehen können (Goodhead 1994; Nikjoo et al. 1997). Direkte Schäden an der DNA werden durch Photonen oder sekundäre Elektronen an Basen oder Zuckerphosphaten induziert (Ward 1988), wodurch kovalente Bindungen zerstört werden und Strangbrüche entstehen (Jeggo und Löbrich 2006). Indirekte Schäden werden durch die Radiolyse von Wasser verursacht. Hierbei entstehen Radikale, welche mit der DNA in Wechselwirkung treten und diese dann schädigen können. Insgesamt werden durch ionisierende Strahlung DSBs, Einzelstrangbrüche (ESBs) oder Basenschäden (Friedberg et al. 2006), Schäden an Zuckerphosphaten, Quervernetzung der komplementären DNA-Stränge und DNA-Protein-Quervernetzungen (Abbildung 1) induziert (Powell und McMillan 1990). Durch die Unterbrechung des Zucker-Phosphat-Rückgrates an einem der beiden komplementären DNA-Stränge entsteht ein ESB. Dieser ist ein häufig auftretender strahleninduzierter Schaden (Powell und McMillan, 1990), welcher für die Zelle leicht reparabel ist. Bei einem DSB wird hingegen die Kontinuität des Zucker-Phosphat-Rückgrates auf gleicher Höhe (glatter Bruch) oder um ein bis mehrere Basenpaare versetzt (überlappender Bruch) unterbrochen. Bereits ein falsch oder nicht reparierter DSB kann den Zelltod verursachen (Khanna und Jackson 2001).

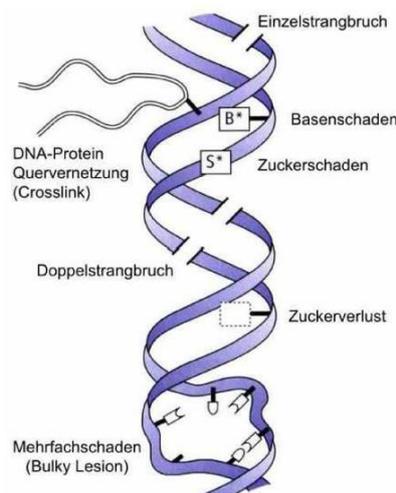


Abbildung 1: Schematische Darstellung möglicher DNA-Schäden (aus Kauffmann S., Sauer R., Weber W.: Bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklear-medicin und Strahlenschutz. Urban und Fischer Verlag. 2011)

2. Einleitung

2.2.3. DSB-Reparaturwege

Für das Überleben einer Zelle und das Vererben fehlerfreier Informationen ist ein intaktes Erbgut essentiell. DSBs werden durch die zelluläre Schadensantwort repariert, wodurch die genomische Integrität bewahrt wird. Die zelluläre Schadensantwort beinhaltet ein komplexes Netzwerk aus Proteinen, welches zur Erkennung und Reparatur der DSBs dient, den Zellzyklus koordiniert und im Falle einer inadäquaten oder unmöglichen Reparatur die Apoptose einleitet. Die DSBs werden durch Sensor-Proteine detektiert, welche eine Signalkaskade aktivieren. Darauffolgend verstärken Transduktor-Proteine das Signal und leiten dieses an Effektor-Proteine weiter. Diese regulieren den Zellzyklus und beteiligen sich an der DNA-Reparatur. Das Fortschreiten im Zellzyklus kann an speziellen Kontrollpunkten, den Checkpoints, verhindert werden, wenn bestimmte Bedingungen für die Zelle nicht erfüllt sind. Die Effektoren sorgen somit für den Zellzyklusarrest, die Reparatur der DNA-Läsion oder bei irreparabilem Schaden für die Einleitung der Apoptose. DSBs können über zwei Reparaturwege, das Non-homologe End-Joining (NHEJ) oder die homologe Rekombination (HR), repariert werden.

Nicht-homologes End-Joining

Das NHEJ erfolgt bevorzugt in der G₀- und G₁-Phase des Zellzyklus (Lieber 2010). Die Bruchenden eines DSB sind überwiegend nicht glatt sondern um ein oder mehrere Basenpaare versetzt. Deshalb sind vor der Verknüpfung gebrochener Enden, dem „End-Joining“, weitere Modifikationsschritte nötig. Ein homologer DNA-Strang wird für den Ersatz der fehlenden Basensequenz nicht benötigt, weshalb die Reparatur „nicht-homolog“ erfolgt (Critchlow und Jackson 1998). Dies führt zu Basen-Verlusten oder fehlerhaften DNA-Bereichen und kann somit Mutationen hervorrufen (Mladenov und Iliakis 2011). Doch nicht jede Mutation hat Auswirkungen auf die Zelle, da nur ein kleiner Teil des Säugetiergenomes kodierende DNA-Sequenzen enthält. Trotz fehlerhafter Reparatur ist das NHEJ der bevorzugte DSB-Reparaturweg, da er in jeder Zellzyklusphase und schnell erfolgen kann (Abbildung 2). Nach der Entstehung eines DSB erkennt das Ku70/Ku80-Heterodimer binnen weniger Sekunden (Lieber 2010; Jackson 2002) die freien Bruchenden und bindet an diese. Hierdurch werden die DSB-Enden stabilisiert und vor einem Abbau durch Exonukleasen geschützt. Es folgt eine Konformationsänderung, die am Carboxy-Terminus (C-Terminus) beider Untereinheiten induziert wird. Hierdurch formt sich eine Bindungsstelle für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs), die durch Autophosphorylierung aktiviert wird (Merkle et al. 2002). Es entsteht das DNA-Proteinkinase-Holoenzym, bestehend aus dem Ku70/Ku80-Heterodimer und DNA-PKcs. Dann erfolgt die Rekrutierung verschiedener Reparaturproteine, wie die Histonvariante H2AX (Burma et al. 2001), Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1), BRCA1 (Cortez et al. 1999), p53 (Banin et al. 1998), Artemis (Czornak et al. 2008), X-ray repair cross-complementing protein 4 (XRCC4), DNA-Ligase IV-Komplex und XRCC4-like factor (XLF), welche ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert werden. Für die Modifikation der DSB-Bruchenden werden Nukleasen und Polymerasen benötigt,

2. Einleitung

welche durch Phosphorylierung von DNA-PKcs aktiviert werden. Anschließend entsteht ein Komplex aus XRCC4, XLF und DNA-Ligase IV, welcher die prozessierten, kompatiblen DSB-Endstücke verknüpft (Weterings und Chen 2008; Chen und Davis 2013).

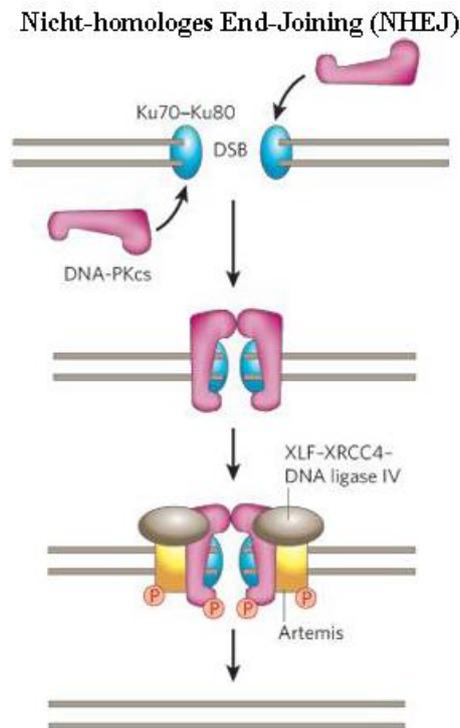


Abbildung 2: NHEJ (modifizierte Darstellung. Ursprüngliche Abbildung von Dueva R., Iliakis G.: *Alternative pathways of non-homologous end joining in genomic instability and cancer. Translational Cancer Research 2013; Vol. 2, No. 3.*)

Homologe Rekombination

Die HR kann in der späten S- oder G2-Phase des Zellzyklus erfolgen, da hier ein homologes Schwesterchromatid vorliegt. Dieses wird bei der Reparatur als Kopiervorlage für eine „homologe“ Ergänzung fehlender Basen verwendet, wodurch der DSB fehlerfrei repariert wird (Abbildung 3). An den 5'-Enden des Bruches werden durch trennen der Basenpaare einzelsträngige 3'-DNA-Überhänge hergestellt (Li und Heyer 2008). Das Öffnen der DNA erfolgt durch zwei Helikasen, die als Komplex zusammenarbeiten. Anschließend erfolgt die Abtrennung des Komplementärstranges in 5'-3'-Richtung mittels 5'-3'-Exonuklease Exo1 (Li und Heyer 2008) und die Bindung des MRN-Komplexes, der sich aus den Nukleasen Mre11, Rad50 und NBS1 zusammensetzt (Jackson 2002). Durch das Replikationsprotein A (RPA), welches aufgrund hoher Affinität zur DNA an das 3'-Ende bindet, wird der DNA-Überhang zunächst vor Nukleasen geschützt. RPA wird durch einen Komplex aus Rad52, Rad55 und Rad57 katalysiert, abgelöst und durch Rad51 ersetzt (Li und Heyer 2008). Die Bindung von Rad51 induziert eine Konformationsänderung der DNA-Helix (San Filippo et al. 2008) um die

2. Einleitung

Anlagerung an die homologe Sequenz zu vereinfachen. Das Rad51-DNA-Nucleoproteinfilament lagert sich an die DNA-Matrize an und die homologe Sequenz wird aufgesucht. Hierbei stabilisiert Rad54 das Nucleo-Proteinfilament (Mazin et al. 2003) und katalysiert die Anlagerung an die DNA-Vorlage (Li und Heyer 2008). Anschließend erfolgt die Basenpaarung zwischen dem defekten und intakten DNA-Strang. Mit einer DNA-Polymerase wird die homologe DNA-Sequenz am 3'-Ende verlängert und durch die DNA-Ligase 1 verknüpft. Abschließend sorgt Rad54 für die Ablösung von Rad51 von dem reparierten DNA-Ende (Li und Heyer 2008). Die Reparatur beider DNA-Einzelstränge findet hierbei zeitgleich statt, wobei die Ausrichtung der Reparatur am jeweiligen 3'-Ende antiparallel abläuft.

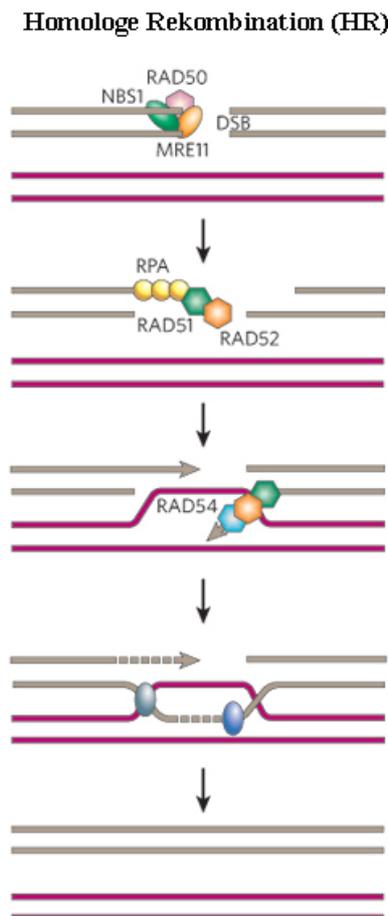


Abbildung 3: Homologe Rekombination (modifizierte Darstellung. Ursprüngliche Abbildung aus <http://docplayer.org/30789841-Klinische-strahlenbiologie.html>)

2.3. DSB-Reparaturproteine und Immunfluoreszenzmikroskopie

2.3.1. Phosphorylierung der Histonvariante H2AX

Die DNA wird mit Hilfe von Histonoktameren als Nucleosome verpackt um die genetische Information platzsparend zu strukturieren. Hierbei winden sich 147 Basenpaare um je 2 Histone H2A, H2B, H3 und

2. Einleitung

H4. Das Protein H2AX ist eine Variante des Histons H2A. 25% der H2A bestehen aus der Variante H2AX, wobei dessen Funktionen vielfältig sind (Rogakou et al. 1998).

Nach dem Erkennen eines DSB erfolgt die Phosphorylierung von H2AX am Serinrest 139 (Shroff et al. 2004) und Tyrosinrest 142 durch ATM, Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) oder DNA-PKcs. Die DNA-PKcs ist aber auch in der Lage bei Abwesenheit von ATM H2AX zu phosphorylieren (Shrivastav et al. 2008). Phosphoryliertes H2AX wird als γ H2AX (gammaH2AX) bezeichnet. γ H2AX sorgt für die Dekondensierung der DNA rund um den DSB um den Zugang zum Bruch für andere Reparaturproteine zu ermöglichen (Turinetto und Giachino 2015). Durch das Binden von MDC1 an γ H2AX wird 53BP1 und der MRN-Komplex rekrutiert (Lukas et al. 2004). Durch deren Interaktion mit MDC1 wird ATM an das Reparaturgerüst gebunden, wodurch weitere ATM-Proteine an der Bruchstelle akkumulieren (Lee et al. 2010). ATM phosphoryliert weitere H2AX, wodurch eine Verstärkung des Signals erfolgt. Im Umfeld eines DSBs wird über mehrere Mega-Basenpaare (MBp) H2AX zu γ H2AX phosphoryliert (Cleaver 2011; Rogakou et al. 1991). Neben der Dekondensierung der DNA sorgt γ H2AX für die Rekrutierung weiterer Reparaturproteine an die Bruchstelle (Cleaver 2011). Zusätzlich akkumuliert 53BP1 und BRCA1 am DSB durch die Ubiquitinierung von H2AX durch die RING-finger ubiquitin Ligase 8 (RNF8) (Mailand et al. 2007). γ H2AX dient dem Erhalt von Reparaturfaktoren an den Bruchenden eines DSB, wodurch das Auseinanderdriften der DSB-Enden verhindert wird und die Reparatur effizient ablaufen kann (Celeste et al. 2003). Somit ist γ H2AX nicht zwingend für die DSB-Reparatur erforderlich, aber für deren Effizienz nötig. In Tierexperimenten zeigten H2AX-defiziente Mäuse eine deutlich erhöhte Tumorneigung (Downey und Durocher 2006).

2.3.2. Ataxia-Teleangiectasia-mutated Proteinkinase

Die ATM ist eine Serin-Threonin-Kinase mit einem C-Terminus, welche eine Domäne einer Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) besitzt. Sie gehört also zu der Familie der Phosphatidylinositol-Kinase-ähnlichen-Kinasen (PIKK), weshalb sie auch als PI3K-like Kinase bezeichnet wird. Einen ähnlichen Aufbau haben ebenfalls die verwandten Kinasen ATR und DNA-PKcs (McKinnon 2012). Mittels ihrer Kinaseaktivität kann ATM sich selbst und andere Proteine phosphorylieren. Der Name ATM bezieht sich auf die, bei Defizit des entsprechenden Gens, entstehenden Symptome der Erkrankung Ataxia teleangiectasia. AT zeichnet sich durch progressive neuromotorische Dysfunktion, Immundefekte, genomische Instabilität, Prädisposition für Krebserkrankungen sowie deutlich erhöhte Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung aus (Lavin et al. 2008; Ball und Xiao 2005).

ATM ist ein wichtiger Sensor und Transduktor bei der zellulären Schadensantwort (Canman und Lim 1998). Inaktiv liegt ATM als Dimer oder Multimer im Zellkern vor (Prokopcova et al. 2007) und wird nach der Induktion eines DSB durch Erhöhung der Kinaseaktivität mittels Autophosphorylierung aktiviert. Hierdurch dissoziieren die ATM-Dimere durch Konformationsänderung zu Monomeren, wodurch die Kinase-Domäne zur Phosphorylierung anderer Schadensproteine freiliegt (Bakkenist und

2. Einleitung

Kastan 2003). Neben der Autophosphorylierung kann ATM auch über den MRN-Komplex aktiviert werden (Lee und Paull 2005). Anschließend aktiviert ATM viele verschiedene Substrate im Rahmen der DSB-Reparatur wie zum Beispiel H2AX, MDC1, 53BP1, BRCA1 und Artemis (Löbrich und Jeggo 2005) sowie Regulatorproteine des Zellzyklus um den Zellzyklusarrest in der G1- und G2-Phase einzuleiten (Weterings und Chen 2008; Wang et al. 2002). ATM kann hierdurch den Übertritt in die nächste Phase des Zellzyklus verhindern oder den Ablauf der DNA-Reparatur verlangsamen, wodurch die Replikation fehlerhafter DNA verhindert wird. Auch an der Einleitung der Apoptose bei irreparablen DNA-Schaden ist ATM beteiligt. Zusammenfassend spielt ATM eine Rolle bei der DSB-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Einleitung der Apoptose (Lavin 2008).

2.3.3. p53-bindendes Protein 1

Den Namen 53BP1 erhielt das Molekül aufgrund seiner Bindefähigkeit für p53 (Iwabuchi et al. 2003). 53BP1 ist ähnlich wie BRCA1 aufgebaut; beide besitzen die gleiche Anordnung ihres C-Terminus mit 2 BRCA1 Domänen (BRCT) und sind Tumorsuppressorproteine. Darüber hinaus besitzt 53BP1 zwei Tudor-Domänen, die sich mehrere Basenpaare vom C-Terminus entfernt befinden, sowie eine Glycin/Arginin-reiche Region (GAR).

Die Tudor-Domänen interagieren mit methylierten Histonen und stimulieren den Ligase IV-Komplex (FitzGerald et al. 2009). Die GAR sorgt nach Methylierung für die Bindung von 53BP1 an einen DSB. 53BP1 dient als Plattform für die Rekrutierung von DSB-Reparaturproteinen in der zellulären Schadensantwort und enthält beim Menschen PIKK-Bereiche (Li und Zou 2005; Lukas et al. 2004). 53BP1 hat sowohl gleiche als auch überlappende Aufgaben im Vergleich zu MDC1 und BRCA1, aber es vermittelt als einziges Protein die ATM-Autophosphorylierung nach ionisierender Strahlung. 53BP1 selbst wird durch ATM und DNA-PKcs phosphoryliert (Harding und Bristow 2012). Dies geschieht im Sinne einer Rückkopplung, da 53BP1 wiederum die Autophosphorylierung von ATM unterstützt (Zgheib et al. 2005). Die Rekrutierung von 53BP1 ist von verschiedenen Faktoren abhängig: der Phosphorylierung von H2AX, der Rekrutierung von MDC1 und RNF8 sowie der Methylierung verschiedener Substrate beispielsweise bestimmter Histone. Nach Induktion eines DSB wird H2AX phosphoryliert. Anschließend bindet MDC1 mit Hilfe seiner BRCT-Domäne an γ H2AX. Nach der ATM-abhängigen Phosphorylierung von MDC1 rekrutiert dieses RNF8 an den DSB (FitzGerald et al. 2009). Dies führt zur Ubiquitinisierung mehrerer Substrate unter anderem auch von H2AX. Dies sorgt für die Rekrutierung von 53BP1 an den DSB, welches an methylierten Histonresiduen (Dimitrova et al. 2008), MDC1 (Eliezer et al. 2009) oder H2AX (Ward et al. 2003) bindet. Die Bindung an Histonresiduen hat Einfluss auf die Chromatinmobilität beim NHEJ in der Region des DNA-Schadens (Dimitrova et al. 2008). Die Bindung an MDC1 ist wichtig für die Bildung von 53BP1-Foci (Eliezer et al. 2009).

2. Einleitung

53BP1 hat einen Einfluss auf die DSB-Schadensdetektion und -reparatur sowie beim Zellzyklusarrest. In 53BP1-defizienten Zellen konnte eine genomische Instabilität und hierdurch verursachte unterschiedlichen Formen von DNA-Schäden nachgewiesen werden (FitzGerald et al. 2009).

2.3.4. Nachweis von Reparaturproteinen als Foci mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit der IFM können DNA-Reparaturproteine und Histonmodifikationen mit Hilfe von Antikörpern visualisiert und quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode zur Detektion von DSBs gewählt. Bei der IFM werden verschiedene Schritte nacheinander durchgeführt. Zunächst bindet in einer Antigen-Antikörper-Reaktion ein primärer Antikörper spezifisch an sein Epitop. Anschließend folgt die Bindung eines sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers an den primären Antikörper. Wird das Fluorochrom mit Hilfe einer Lichtquelle geeigneter Wellenlänge angeregt, kann der Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden. Hierdurch wird das gewünschte Epitop, beispielsweise im Umfeld eines DSBs akkumulierende Reparaturfaktoren, markiert und mikroskopisch als sogenannte „Foci“ darstellbar (Rogakou et al. 1998). Werden DSBs durch ionisierende Strahlung induziert und durch akkumulierende Reparaturfaktoren detektiert, so werden diese auch „ionising radiation induced foci“ (= IRIF) genannt. Vorteil der IFM gegenüber anderen Methoden zum Nachweis von DSBs wie der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) oder dem neutralen Comet-Assay ist die geringe notwendige Strahlendosis von bis zu 2 Gy.

Das Detektieren und Quantifizieren von Foci eröffnet die Möglichkeit das Ausmaß eines DNA-Schadens im Zellkern zu erfassen und die Reparaturkapazität von Zellen zu untersuchen. Der zeitliche Verlauf der Foci-Bildung ermöglicht Einblicke in die Abläufe der Schadenserkenung und die Reparatur der induzierten DSBs.

In dieser Arbeit wurden die oben beschriebenen beiden DSB-Reparaturfaktoren 53BP1, pATM und die Histonmodifikation γ H2AX markiert und mittels IFM analysiert.

Bereits 1998 konnten Rogakou et al. zeigen, dass mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern γ H2AX als spezifischer Marker zum Nachweis von DSBs verwendet und mittels IFM visualisiert werden kann. Aufgrund der schnellen Akkumulation von γ H2AX im Umfeld eines DSB kann dieser bereits Minuten nach Bestrahlung nachgewiesen werden (Rogakou et al. 1998; Sedelnikova et al. 2002; Rothkamm und Löbrich 2003). Die Foci-Anzahl korreliert mit der applizierten Strahlendosis und der Reparaturkapazität: Je höher die Strahlendosis ist, desto mehr Foci sind detektierbar und je weiter die DSB-Reparaturzeit voranschreitet, desto mehr nimmt die Foci-Anzahl ab (Sedelnikova et al. 2002; Rothkamm und Löbrich 2003). Die Kinetik des Foci-Verlustes korreliert also nachweislich mit der Kinetik der DSB-Reparatur (Rothkamm und Löbrich 2003; Rube CE. et al. 2010). Deshalb wurde angenommen, dass jeder DSB durch einen γ H2AX-Fokus dargestellt werden kann (Sedelnikova et al. 2002; Rothkamm und Löbrich 2003). Bei der γ H2AX-Foci-Methode handelt es sich um ein sehr sensitives Verfahren, welches den Nachweis bereits bei sehr niedrigen Strahlendosen erlaubt. Ein

2. Einleitung

weiterer Vorteil ist, dass erst bei DSB-Induktion die Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX erfolgt, dieses somit nicht kontinuierlich im Zellkern vorhanden ist, was die Sensitivität der Methode erhöht. Der Ablauf der Reparaturkaskade an einem induzierten DSB impliziert neben γ H2AX auch die Akkumulation von weiteren Checkpoint- bzw. Reparaturproteinen wie beispielsweise pATM und 53BP1.

Nach der Induktion eines DSB wird ATM durch Autophosphorylierung aktiviert. Dieses pATM kann ebenfalls als Fokus mittels IFM visualisiert werden. Da jeder Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper eine unterschiedliche Emissionswellenlänge besitzt, ist der gleichzeitige Nachweis mehrerer Proteine in einer Probe möglich. Nach der Induktion strahleninduzierter Schäden konnte so in Säugetierzellen während der verschiedenen Zellzyklusphasen eine Kollokalisierung (räumliche Überlappung) von γ H2AX- und pATM-Foci nachgewiesen werden (Beucher et al. 2009). Außerdem zeigte sich im zeitlichen Verlauf ein zu γ H2AX fast identischer Fociverlust, was auf eine vergleichbare Reparaturkinetik hinweist (Beucher et al. 2009). pATM kann somit neben γ H2AX ebenfalls als sensitiver Biomarker für strahleninduzierte DSBs verwendet werden.

Auch 53BP1 kann als Fokus in der IFM visualisiert werden (Schultz et al. 2000; Adams und Carpenter 2006). Diese 53BP1-Foci kollokalisieren nach Induktion wie auch die pATM-Foci strahleninduzierter DSBs mit γ H2AX-Foci (Harding und Bristow 2012). Wie auch schon bei den pATM-Foci wurde eine ähnliche Kinetik für die Induktion und Reparatur von 53BP1- und γ H2AX-Foci nachgewiesen (Rappold et al. 2001). 53BP1 stellt somit neben γ H2AX und pATM einen weiteren Biomarker zur Detektion von DSBs für die IFM dar (Bekker-Jensen et al. 2006; Schlegel et al. 2006).

Die Quantifizierung der Foci kann dabei auf unterschiedliche Arten erfolgen. In dieser Arbeit erfolgt die Zählung „per Auge“ direkt am Fluoreszenzmikroskop. Diese Art der Analyse erfordert ein hohes Maß an Routine und Erfahrung um konstante Ergebnisse zu liefern.

2.4. Zellsedimentationsverfahren

Als Untersuchungsmaterial für die DSB-Reparaturkapazität der Probanden mittels IFM wurden Blut-Lymphozyten verwendet. Nach deren Isolierung aus dem Vollblut der Patienten und einer Kryokonservierung wurden diese in Kultur genommen. Die Bestrahlung erfolgte als Zellsuspension in Kulturflaschen. Zur Untersuchung und Auswertung ist es notwendig die Zellen aus ihrem Kulturmedium auf einen Objektträger aufzubringen.

Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung um Zellen aus einer Suspension auf einen Objektträger zu sedimentieren. Die bisher in Studien der Arbeitsgruppe (AG) Rube CE. und hier initial durchgeführte, einfachste und günstigste Methode ist das Auftropfen der Zellsuspension mittels einer Pipette auf einen Objektträger. Anschließend wird abgewartet bis sich die Zellen durch Sedimentation aus der Suspension abgesetzt haben (Tsang et al. 2017). Aufgrund zu geringer Zellzahlen im Verlauf der Arbeit, am ehesten verursacht durch geringe Blutvolumina und zusätzlich Lymphozytenverluste im Rahmen

2. Einleitung

der Fluoreszenzfärbung, erfolgte eine Recherche der bestehenden Literatur über verschiedene Zellsedimentationsverfahren. Neben dem Verfahren der Schwerkraftsedimentation existieren noch weitere Optionen um Zellen auf einem Objektträger zu fixieren und sogar die Zellzahl zusätzlich anzureichern. Eine Zellanreicherung ist von Vorteil, da sie das benötigte Probenvolumen verringert. Im Unterschied zu einer alleinigen Zentrifugation der Zellsuspension ermöglichen so weiterführende Techniken die Zellen auf einer relativ kleinen Fläche des Objektträgers zu konzentrieren. Zu diesen Techniken zählt die Direktzentrifugation, diverse Membranfiltertechniken, Sedimentierkammerverfahren, Kapillarfilter-Saug-Technik und die Zytozentrifugation (Rathert und Roth 2007). Nach Klärung der in den Laboratorien an der Universitätsklinik des Saarlandes verfügbaren Optionen zur Zellsedimentation wurde vom Verfahren der Schwerkraftsedimentation auf die Zytozentrifugation umgestellt.

2.4.1. Schwerkraftsedimentation

Die zu untersuchenden Lymphozyten liegen zunächst als Zellkultur in Suspension vor. Bei der Schwerkraftsedimentation handelt es sich per definitionem um das Ablagern von Teilchen aus Flüssigkeiten oder Gasen unter dem Einfluss der Gewichtskraft oder der Zentrifugalkraft. Bei der Sedimentation setzen sich Teilchen aufgrund ihrer unterschiedlichen Absinkgeschwindigkeiten, anhand ihrer Dichte und ihrer Größe auf einer Oberfläche übereinander ab. Je höher die Viskosität der Flüssigkeit ist, desto langsamer sedimentieren die Feststoffe in ihr. In vergleichbaren Studien, wie auch in dieser Arbeit, wird bei Lymphozyten eine Sedimentationsdauer von 30 Minuten angenommen. Die Schwerkraftsedimentation ist ein Verfahren ohne Einwirkung grober Kräfte, sodass ein Einfluss auf die Morphologie und Funktionalität der Zellen ausgeschlossen werden kann (Robb et al. 1996; Rathert und Roth 2007).

2.4.2. Zytozentrifugation

Bei der Zytozentrifugation werden die zellulären Bestandteile direkt auf einen Objektträger zentrifugiert. Dieses Aufbringen der Zellen auf eine Oberfläche erfolgt mittels der Zentrifugalkraft, einer Trägheitskraft, welche bei Dreh- und Kreisbewegungen auftritt. Die Zentrifugalkraft ist radial von der Rotationsachse nach außen gerichtet und wird durch die Trägheit des Körpers, in diesem Fall der Zellen, verursacht. Die Stärke der Zentrifugalkraft setzt sich aus der Masse des Körpers, dem Radius und der Winkelgeschwindigkeit zusammen. Letztere spielt bei Rotationen wie der Zentrifugation eine wichtige Rolle. Eine Zentrifuge nutzt als technisches Gerät nun die Massenträgheit und ihre Funktionsweise beruhend auf der Zentrifugalkraft. Dies wird zur Stofftrennung verwendet, sodass mittels einer Zentrifuge Suspensionen, Emulsionen und Gasmische aufgetrennt werden können. Partikel oder

2. Einleitung

Medien mit höherer Dichte dringen hierbei aufgrund ihrer größeren Trägheit nach außen und verdrängen dabei Stoffe mit niedrigerer Dichte. So können auch Gegenkräfte wie Adhäsion, thermische Molekularbewegung oder Viskosität überwunden werden. Durch die höhere Kraftereinwirkung bei der Zentrifugation im Vergleich zur Sedimentation durch die Schwerkraft ist der Auftrennungsprozess deutlich beschleunigt. Doch aufgrund dieser größeren Kraftereinwirkung können morphologische und funktionelle Veränderungen an den Zellen nicht ausgeschlossen werden. Zentrifugen zur Sedimentation von Zellen werden Zytozentrifugen genannt. Diese werden von verschiedenen Herstellern angeboten. Neben ausschließlich für die Zytozentrifugation nutzbare, jedoch relativ teure und nur bei intensivem Gebrauch amortisierbare Geräte (hier der Cytospin; Abbildung 4) werden von anderen Herstellern multifunktional umrüstbare Zentrifugen angeboten.



Abbildung 4: Cytospin
(<http://www.labotec.co.za/product/cytospin-cytozentrifuge>)

Für die Zytozentrifugation werden in den Zentrifugationsrotor hierfür passende Container eingehängt (hier Cytofunnels; Abbildung 5). Ein solcher Zytozentrifugationscontainer besteht aus einem Einsatz mit Clip zur Fixierung eines Objektträgers und einem Filterpapier. Der Container besitzt einen Einlass durch welchen die Lymphozytensuspension einpipettiert werden kann sowie eine kleine runde Öffnung in Richtung Objektträger, durch welche die Zellen hindurchzentrifugiert und so auf den Objektträger aufgebracht werden. Aufgrund der geringen Durchtrittsfläche konzentrieren sich die aufgebrauchten Zellen auf eine sehr kleine Fläche und liegen dicht beieinander. Das übriggebliebene Medium der Zellkultur wird vom eingebrachten Filterpapier in der Vorrichtung aufgesogen. Der Vorgang der Zytozentrifugation dauert bei den unterschiedlichen Modellen wenige Sekunden bis Minuten und ist somit ein sehr schnelles Verfahren zur Auftragung von Zellen auf eine Oberfläche (Robb et al. 1996; Rathert und Roth 2007).

2. Einleitung

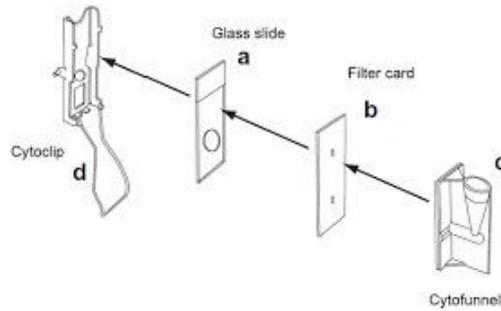


Abbildung 5: Zentrifugationscontainer, sogenannte Cytofunnels.
(a) Objektträger, (b) Filterpapier, (c) Cytofunnel, (d) Cytoclip zur Fixierung des Objektträgers
(http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_24579.pdf)

Nach Klärung der an der Universitätsklinik des Saarlandes bestehenden Optionen zur Zellsedimentation wurde vom Verfahren der Schwerkraftsedimentation auf die Zytozentrifugation umgestellt. Vor der Verfahrensänderung der Zellsedimentation erfolgte ein einfacher optischer Effizienzvergleich beider Verfahren vor und nach der Fluoreszenzfärbung (Abbildung 6). Dieser suggerierte, dass Zellen, welche sich lediglich aus der Zellsuspension absetzen, schlechter auf dem Objektträger fixiert waren als Zellen, welche mittels Zellzentrifugation auf den Objektträger aufgebracht wurden. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich vor allem nach der Markierung der unterschiedlichen Reparaturproteine, was einige Waschschrte beinhaltet und bei dem insuffizient fixierte Zellen verloren gingen (Abbildung 6).

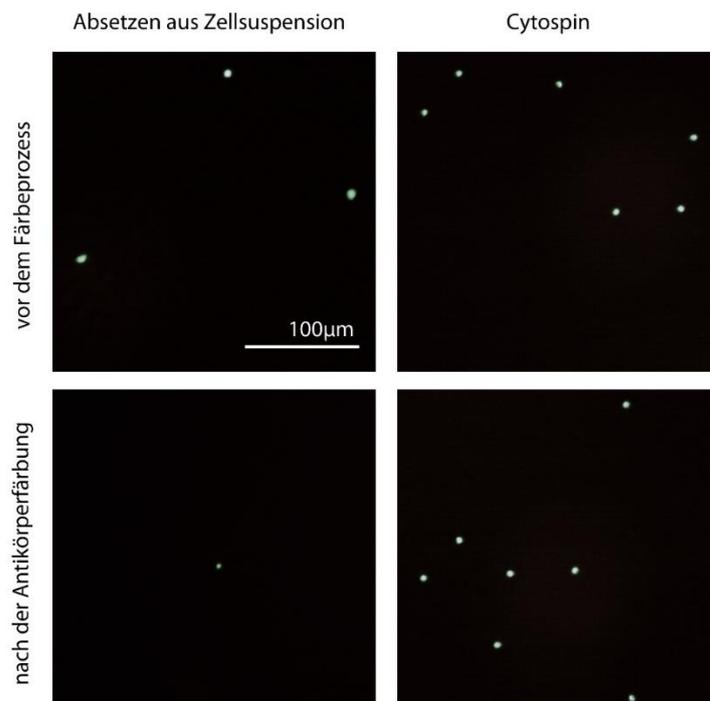


Abbildung 6: Effizienzvergleich nach Sedimentation isolierten Lymphozyten.
Gegenüberstellung der beiden Auftragungsmethoden vor und nach dem Färbeprozess

2.5. Fragestellungen

Die Ursachen der Entstehung von malignen Tumoren im Kindesalter sind bis heute nicht vollständig geklärt. Studien in der AG Rube CE. (Rube CE. et al. 2010 und Schuler et al. 2014) haben gezeigt, dass bei Kindern mit maligner Erkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern eine verminderte DSB-Reparaturkapazität nachgewiesen werden kann. Genetische Veränderungen, die zu einer Defizienz in der DNA-Reparatur führen können, scheinen also für eine Tumorentstehung im Kindesalter zu prädisponieren und auch die Ausprägung von therapieassoziierten Nebenwirkungen zu beeinflussen. Ziel dieser Arbeit war es, analog zu der Vorgehensweise der bereits durchgeführten Studien, durch Erweiterung der Zahl untersuchter Probanden eine verminderte DSB-Reparaturkapazität bei Kindern mit malignen Tumoren im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern zu bestätigen und so die Hypothese weiter zu validieren. Zugleich sollten die Antikörpermarkierungen von γ H2AX, pATM und 53BP1 hinsichtlich ihrer Sensitivität und Praktikabilität bei der Markierung und Detektion verglichen werden. Langfristig könnte so möglicherweise ein prädiktiver Test zur Früherkennung von DNA-Reparaturdefekten etabliert werden um im Rahmen DNA-schädigender Tumortherapie das Risiko von Nebenwirkungen besser prognostizieren zu können.

Die konkreten Fragestellungen dieser Arbeit lauten daher:

Haben die hier untersuchten Kinder mit malignen Tumorerkrankungen eine verminderte DSB-Reparaturkapazität im Vergleich zu den gesunden Kontrollkindern?

Ist einer der drei untersuchten DNA-Reparaturfaktoren vorteilhafter zum Nachweis von DSBs in diesem Verfahren?

3. Material und Methodik

3.1. Geräte und Material

3.1.1. Geräte

Aspirationssystem pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Biofuge 13	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Cryo Freezing Container	Fisher Scientific, Schwerte
Cytospin 4 Thermo Shandon	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Fluoreszenzmikroskop Eclipse E600	Nikon, Tokio, Japan
Gefrierschrank -20°C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
Gefrierschrank -80°C Hera Freeze Basic	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kamerasystem	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kühlschrank +4°C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
Lichtmikroskop Eclipse TS100	Nikon, Tokio, Japan
Linearbeschleuniger "Oncor 2"	Siemens AG, Berlin/München
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Schüttler „Shaker S4“	Elmi Ltd., Riga, Lettland
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

3.1.2. Materialien

6-Well-Platten	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ammonium-Heparin-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser 24 x 24 Millimeter (mm)	Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser 24 x 50 mm	Menzel GmbH, Braunschweig

3. Material und Methodik

Deckgläser rund (Durchmesser 12 mm)	Menzel GmbH, Braunschweig
Single Cytofunnel	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Filterpapier Kimtech	Kimberly Clark, Dallas, TX, USA
Kryotubes 1,5 Milliliter (ml)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Objektträger Super Frost	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Objektträgerfärbekammer	Engelbrecht GmbH, Ebermünde
Objektträgergestell	Engelbrecht GmbH, Ebermünde
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Pipettenspitzen Cell Saver	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zellkulturflaschen 25 Quadratcentimeter (cm ²)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Zellkulturschalen 145/20	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.2. Chemikalien und deren Zusammensetzung

3.2.1. Chemikalien

Methanol 100%	Merck, Darmstadt
Mounting Medium mit und ohne	
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Normalserum Ziege (NS)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	Biochrom AG, Berlin
Phosphate-buffered Saline (PBS)	Apotheke der Universitätsklinik Homburg

3. Material und Methodik

3.2.2. Lösungen

Blocking Reagenz:	PBS 1% NS
Einfrierlösung:	Nährmedium 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)
Nährmedium:	Medium RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 10% FCS (Fetales Kalbserum) + 1% PenStrep

3.2.3. Antikörper

Primärantikörper:

Produktname	Antigene Determinante	Verdünnung
Anti-phospho-Histon H2A.X (Serin 139), Klon JBW301, Maus monoklonaler IgG1/ Upstate/ Millipore, Billerica, MA, USA	γ H2AX (Serin 139)	1:800 in Blocking Reagenz
Maus monoklonaler Antikörper ATM (10H 11.E12) phospho Ser1981, Abcam plc, Cambridge, UK	pATM (phospho S1981)	1:800 in Blocking Reagenz
53BP1 IHC-00001 Ab, Hase polyklonal, Bethyl Lab.Inc., Monthomery, TX, USA	53BP1	1:800 in Blocking Reagenz

Sekundärantikörper:

Produktname	Antigene Determinante	Verdünnung
Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus IgG (H+L), Invitrogen, Carlsbad, CA USA	Maus Immunglobulin G (IgG)	1:1000 in Blocking Reagenz
Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Hase IgG (H+L), Invitrogen, Carlsbad, CA USA	Hase IgG	1:1000 in Blocking Reagenz

3.3. Probanden

Untersucht wurden die aus dem Blut isolierten Lymphozyten von 42 Kindern, die im Zeitraum von Mai 2011 bis September 2012 im Universitätsklinikum des Saarlandes ambulant oder stationär behandelt wurden. Die von mir gesammelten Proben wurden in Patienten mit malignen Tumorerkrankungen (=

3. Material und Methodik

Malignome; n = 24) sowie gesunde Kontrollpatienten (= Gesunde Kontrollen; n = 18) unterteilt. Die Patienten mit Malignomen wurden wiederum in zwei Kollektive anhand solider (= Solide Malignome) und nicht-solider (Patienten mit Leukämie) Tumorerkrankungen differenziert. Aufgrund unzureichender Zellzahlen durch Verluste im Rahmen der Immunfluoreszenzmarkierung und kleiner Blutvolumina konnten nicht alle Proben eingeschlossen werden. 16 Proben waren nicht auswertbar. 26 Patienten konnten erfolgreich untersucht und eingeschlossen werden. Hiervon waren 14 Patienten mit malignen Tumorerkrankungen (n = 14) sowie 12 gesunde Kontrollpatienten (n = 12).

3.4. Methodik

3.4.1. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte entweder vor Beginn einer DNA-schädigenden Chemo- oder Strahlentherapie oder nach der Therapie (Mindestabstand 1 Monat). Das Blut wurde aus einer peripheren Vene in Ammonium-Heparin-Monovetten aspiriert. Adaptiert an die Größe, das Gewicht und den Allgemeinzustand des Patienten wurden 4 bis 8 ml Blut entnommen.

3.4.2. Isolierung und Kryokonservierung von Lymphozyten

Als Untersuchungsmaterial wurden Lymphozyten verwendet. Diese lassen sich aus dem Blut von Patienten einfach akquirieren, enthalten einen Zellkern und sind für mehrere Tage in Medium kultivierbar. Hierdurch ist es möglich die kultivierten Zellen am Linearbeschleuniger homogen zu bestrahlen und anschließend die DNA auf Schäden zu untersuchen. Der prozentuale Anteil an Lymphozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten im peripheren Blut beträgt 20-45% und umfasst die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie die B- und T-Lymphozyten.

Die Patientenproben wurden in einem Zeitraum von 15 Monaten von Mai 2011 bis September 2012 gesammelt. Um die Vergleichbarkeit sicherzustellen und zum Ausschluss externer Einflussfaktoren wurden alle Proben zunächst kryokonserviert und später in einem analogen Zeitraum untersucht.

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll. Zunächst wurde das Vollblut in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS verdünnt. Das Blutgemisch wurde anschließend vorsichtig über 8 ml Biocoll in ein vorbereitetes 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 1.200 Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“ = rpm) für 20 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur waren 4 Schichten im Röhrchen zu erkennen. Die unterste Schicht enthielt die Erythrozyten sowie tote Zellen. Darüber verblieb das Biocoll, in welches die Granulozyten

3. Material und Methodik

eindringen. Über dem Biocoll sammelte sich der sogenannte Lymphozytenring mit 80% Lymphozyten, 15% Monozyten und 5% Granulozyten. Die oberste Schicht stellte das Blutserum dar. Der Lymphozytenring wurde vorsichtig entnommen und zweimal mit je 6 ml PBS in einem Zentrifugationsschritt bei 300 rpm über 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

Die Kryokonservierung der Lymphozyten erfolgte in Nährmedium mit 10% DMSO. Das organische Lösungsmittel DMSO wird in der Zellkultur als Gefrierschutzmittel eingesetzt. Durch das Herabsetzen des Gefrierpunktes während des Einfrierprozesses wird die Bildung von Eiskristallen und die damit verbundene Zerstörung der Zellmembranen verhindert. Anschließend wurden die Lymphozyten in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter langsam abgekühlt und kurzfristig bei -80°C gelagert, bevor sie dauerhaft in flüssigem Stickstoff konserviert wurden.

3.4.3. Zellkultivierung

Die kryokonservierten Lymphozyten wurden einen Tag vor der Bestrahlung aufgetaut und in Kultur genommen um ihnen die Möglichkeit zu geben sich über Nacht zu regenerieren und den Stoffwechsel zu stabilisieren. Hierzu wurden sie nach der Entnahme aus dem Stickstofftank in einem Wasserbad langsam auf 37°C erwärmt. Sobald die Einfrierlösung mit den Zellen aufgetaut war, wurde die Lymphozytensuspension in 4 ml 37°C warmen Nährmedium in ein Röhrchen aufgenommen und für 5 Minuten bei 300 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dies diente dem Waschen der Zellen um das in der Einfrierlösung enthaltene zytotoxische Frostschutzmittel DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und die Lymphozyten in 20 ml Nährmedium aufgenommen. Das Nährmedium bestand aus Medium RPMI 1640 mit zusätzlich 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin um die Zellkultur vor dem Einfluss von Bakterien zu schützen. Die Zellsuspension wurde gleichmäßig auf 4 Zellkulturflaschen aufgeteilt. Eine Suspension diente hierbei als unbestrahlte Kontrolle (= unbestrahlt) und die 3 anderen wurden verwendet um an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung die Reparaturkapazität über die Zeit zu bestimmen. Die Kultivierung wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt um eine Kontamination der Zellkultur auszuschließen. Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid (CO_2)-Atmosphäre bis zur Bestrahlung am nächsten Tag.

3.4.4. Bestrahlung

Die Bestrahlung der Lymphozyten erfolgte in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Homburg an einem Linearbeschleuniger der Firma Siemens, Modell Oncor 2. Die Bestrahlungsplanung wurde mit dem Programm Pinnacle Version 9.0 durchgeführt (Abbildung 7).

3. Material und Methodik

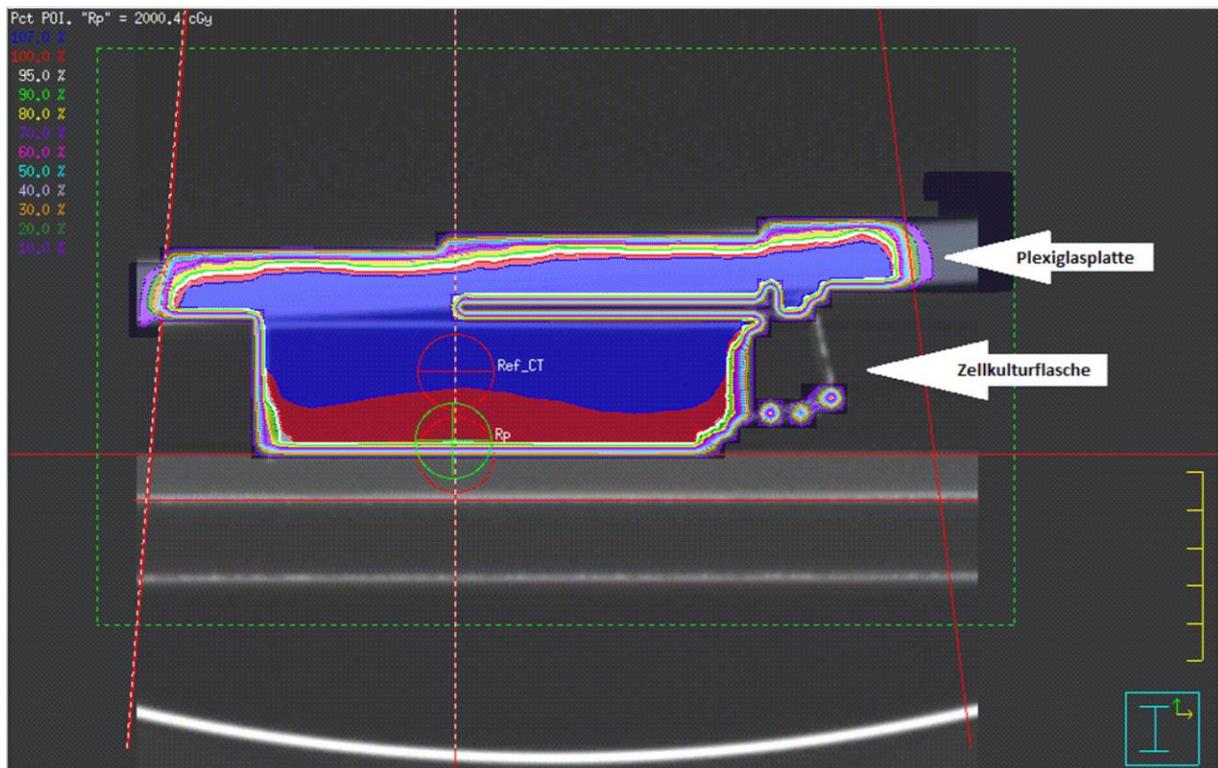


Abbildung 7: Aufnahme einer Schnittebene der Bestrahlungsplanung innerhalb des Planungsprogrammes Pinnacle Version 9.0 mit den farbig dargestellten Isodosen. Die 100%-Isodose (rot) befindet sich oberhalb des Bodens der Zellkulturflasche und umschließt somit die Lymphozyten.

Die Bestrahlung erfolgte mit 6 Megavolt (MV) Photonen und mit einer Dosisleistung von 2 Gy pro Minute bei einer Feldgröße von 40 x 40 Zentimeter (cm). Die Lymphozytensuspension wurden in 4 Zellkulturflaschen aliquotiert um pro Patientenprobe eine unbestrahlte Kontrolle, einen möglichst frühen Zeitpunkt nach der Bestrahlung (= Induktion) sowie Reparaturzeitpunkte jeweils 8 (= 8h) und 24 Stunden (= 24h) nach der Bestrahlung zu untersuchen. Die Induktionsprobe wurde mit 1 Gy bestrahlt und nach 30 Minuten fixiert. Die Lymphozyten der 8 und 24 Stunden Zeitpunkte wurden mit 2 Gy bestrahlt. Die Induktionsprobe erhielt im Vergleich zu den anderen beiden Zeitpunkten nur die halbe Dosis, das heißt 1 Gy, da sich sonst die Fluoreszenzen der vielen und somit räumlich nahen Foci überschneiden, was zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Focianzahl führt. Die Zellkulturflaschen wurden horizontal auf dem Patientenlagerungstisch mittig im Bestrahlungsfeld platziert. Die Ausrichtung erfolgte durch den Raumlaser. Das Isozentrum befand sich in der Mitte des Flaschenbodens. Eine 1 cm dicke Plexiglasplatte wurde auf die Flaschen gelegt. In ihr fand der Dosisaufbaueffekt statt um eine homogene Dosisverteilung in den Lymphozyten zu erreichen. Nach der Bestrahlung verblieben die Zellkulturflaschen im Brutschrank bis zu dem entsprechenden Untersuchungszeitpunkt.

3.4.5. Immunfluoreszenzmarkierung

Die DSB-Reparaturfaktoren γ H2AX, ATM und 53BP1 wurden mittels Antikörper markiert. Dies erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung. Hierbei bindet ein Primärantikörper spezifisch an das nachzuweisende Protein. Anschließend wird der Primärantikörper durch einen zweiten, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper der gegen die Wirtsspezies des ersten Antikörpers gerichtet ist, gebunden. Das Fluorochrom wird durch die Anregung bei geeigneter Wellenlänge lichtmikroskopisch sichtbar.

Die Zellsuspension aus Nährmedium und bestrahlten Lymphozyten wurde zum entsprechenden Zeitpunkt unter der Sterilbank in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 300 rpm und Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 Mikroliter (μ l) Nährlösung resuspendiert. Pro Probe wurden je 100 μ l der Primärantikörperlösungen (γ H2AX, ATM und 53BP1) zur zeitgleichen Durchführung der Markierungen eingesetzt.

Auftragen der Zellen mittels Zellzentrifugation

Die Lymphozyten wurden mittels Cytospin auf einen Objektträger zentrifugiert. Für das Gerät sind bestimmte Einsätze, sogenannte Cytofunnels, nötig. Diese haben in Richtung des Objektträgers eine kleine runde Öffnung, durch welche die Lymphozyten zentral und räumlich nah auf den Objektträger aufgebracht wurden (siehe Abbildung 5 unter 2.4.2.). Das restliche Medium wurde von einem Filterpapier in der Vorrichtung aufgesogen. Die oben beschriebenen 100 μ l Lymphozytensuspension wurden in den dafür vorgesehenen Einlass pipettiert und dann für 5 Minuten bei 600 rpm bei Raumtemperatur auf den Objektträger zentrifugiert. Die Objektträger wurden in Färbeküvetten überführt, die zuvor mit -20°C kaltem 100% Methanol befüllt wurde. Hier erfolgte über 30 Minuten die Fixierung der Zellen. Im Anschluss wurde die Permeabilisierung der Lymphozytenmembranen in einem Glasgefäß mit -20°C kaltem Aceton durchgeführt und die Objektträger anschließend 3 Mal für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Der Waschvorgang wurde durch leichtes Bewegen auf einem Wippeltisch mit einer Frequenz von 15 Neigungen pro Minute unterstützt.

Nach Fixierung und Permeabilisierung der Lymphozyten erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in Blocking-Reagenz (PBS mit 1% Ziegen Serum) mit je 4 ml pro Objektträger um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Nachfolgend wurden die Objektträger in einer Feuchtkammer abgelegt. Diese bestand aus einer Petrischale, die mit befeuchteten Zellpapier ausgelegt und mit Parafilm bedeckt wurde. 200 μ l der jeweiligen Primärantikörperlösung wurden in einer Verdünnung von 1:800 mit PBS/NS auf den Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Objektträger erneut 3 Mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit je 4 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Lymphozyten mit je 200 μ l Fluorochrom-gekoppeltem Sekundärantikörper pro Objektträger inkubiert. Der Spezies des primären Antikörpers entsprechend wurde für die mit γ H2AX und pATM markierten Lymphozyten sekundäre

3. Material und Methodik

Maus Immunglobulin G-Antikörper (IgG-Antikörper) und für die mit 53BP1 sekundärer Hase IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 (PBS:NS) verwendet. Die Inkubation der Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Um die Fluorochrome vor Fluoreszenzverlust zu bewahren wurde darauf geachtet die Proben ab diesem Schritt im Dunkeln zu lagern um unnötige Lichtexposition zu vermeiden. Zur Entfernung ungebundener Sekundärantikörper wurde erneut 3 Mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS unter Bewegung gewaschen um unspezifisches Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren.

Zuletzt wurden die Objektträger vorsichtig mit Filterpapier getrocknet und die Lymphozyten mit 70 µl aushärtendem Mounting Medium konserviert. Das darin enthaltene DAPI interkaliert in die DNA der Lymphozyten, wodurch die Zellkerne bei entsprechender Wellenlänge lichtmikroskopisch sichtbar werden. Das Mounting Medium trocknete über Nacht. Die Lymphozyten wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Auftragen der Zellen mittels Schwerkraftsedimentation

Analog zur Auftragung mittels Zellzentrifugation wurden 100 µl der insgesamt 300 µl Lymphozytensuspension pro Zeitpunkt und Antikörperfärbung benötigt. Diese 100 µl der Zellsuspension wurden auf ein rundes Deckglas pipettiert. Insgesamt wurden 3 Deckgläser pro Zeitpunkt auf diese Weise vorbereitet um die Markierung von γ H2AX, ATM und 53BP1 parallel durchführen zu können. Zum Auftragen der Lymphozyten wurden CellSaver-Pipettenspitzen verwendet, die einen ausreichend großen Durchmesser besitzen, um Scherkräfte an der Pipettenspitze zu verringern, da diese eventuell die Zellen schädigen könnten. In einem Zeitraum von 30 Minuten bei Raumtemperatur hatten die Lymphozyten die Möglichkeit sich auf dem Deckglas abzusetzen. Im Anschluss wurde das verbliebene Nährmedium vorsichtig auf ein Filterpapier abgetropft und das Deckglas in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte übertragen.

Analog zur Vorgehensweise bei der Zellzentrifugation erfolgte anschließend die Fixierung, Permeabilisierung und Färbung der Lymphozyten auf den Deckgläsern in einer Vertiefung einer 6-Well-Platte. Der Ablauf, die Chemikalien und Lösungen entsprachen denen, die bei der Auftragung mittels Zellzentrifugation verwendet wurden. Jedoch gab es beim Ablauf wenige Abweichungen: Es wurden 60 µl der jeweiligen Antikörper-Lösung pro Objektträger und zur Fixierung der Zellen 30 µl Mounting Medium verwendet.

3.4.6. Immunfluoreszenzmikroskopie

Foci-Analyse

Die Auswertung der markierten Reparaturproteine erfolgte mit Hilfe eines Nikon E600 Fluoreszenzmikroskops in 600-facher Vergrößerung. Bei der Mikroskopie wurde Immersionsöl verwendet, welches die erzielbare Auflösung steigert und kontrastsenkende Reflexionen bei Brechungsindexwechseln vermindert. Zunächst wurde der DAPI-Filter am Mikroskop eingeschoben. Dieser hat ein Absorptionsmaximum von $\lambda = 358$ Nanometer (nm) und ein Emissionsmaximum von $\lambda = 461$ nm. Durch das DAPI fluoreszierten die Zellkerne der Lymphozyten blau, wodurch die Unversehrtheit des Zellkerns beurteilt werden konnte. Anschließend wurde der Fluoresceinfilter verwendet. Dieser besitzt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 495$ nm und ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 519$ nm. Hiermit wurde das Fluorochrom des sekundären Antikörpers angeregt und die markierten Reparaturproteine lichtmikroskopisch als Foci sichtbar. Die quantitative Analyse der Foci erfolgte innerhalb intakter Zellkerne.

Gezählt wurden pro Deckglas oder Objektträger mindestens 40 Foci und 40 Zellen. Für die unbestrahlten Kontrollproben bedeutete das eine deutlich höhere Anzahl an Zellen, da diese keine oder nur sehr geringe Zahlen an Foci aufweisen. Für die Induktion hingegen waren 40 Zellen bei der Zählung ausreichend, da diese eine weitaus höhere Anzahl an Foci zeigen. Zudem erfolgte die Auswertung blind, das heißt bei der Zählung war nicht bekannt, welcher Gruppe und welchem Patient die zu untersuchende Probe gehörte, um den Einfluss von Erwartungen an das Ergebnis zu eliminieren.

Die Abbildungen der Lymphozyten wurden mit der Nikon DS Fi1 Kamera aufgenommen. Die Einstellungen der Kamera konnten mit dem Computerprogramm Nikon NIS Elements BR Software vorgenommen werden um für jedes Bild individuelle Belichtungszeiten zu ermöglichen. Bearbeitet wurden die Bilder mit dem Programm Photoshop. Die graphischen Abbildungen wurden mittels Microsoft Excel erstellt.

Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden der Mittelwert und der Standardfehler der Focianzahl pro Probandengruppen und Antikörper berechnet. Mittels des Programms Sigma Stat 3.5 wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt und als Signifikanzniveau $p < 0,05$ ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1. Epidemiologie der eingeschlossenen Kinder

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden isolierte Lymphozyten von insgesamt 26 Probanden eingeschlossen. Zur Gruppe der Malignome zählten 14 Kinder. Als Kontrolle fungierten 12 gesunde Probanden. Die Nachbeobachtung anhand einer Aktendurchsicht der Kinder wurde im Dezember 2017 nach 6 Jahren beendet. Die Tumorentität, das Erkrankungsalter, das Geschlecht, die bis dato durchgeführte potentiell DNA-schädigende Chemo- oder Strahlentherapie, die Nebenwirkungen sowie genetische Prädisposition der untersuchten Probanden mit maligner Erkrankung wurden tabellarisch dargestellt (Tabelle 1). Im Schnitt waren die Kinder mit Malignomen bei der Blutentnahme 9 Jahre alt, davon waren 9 weiblich und 5 männlich. Die gesunden Kontrollen waren durchschnittlich 11 Jahre alt. Davon waren 8 männlich und 4 weiblich.

Patientenverschlüsselung	Alter bei Diagnose (Jahre)	Geschlecht	Histologie	Strahlentherapie	DNA-schädigende Chemotherapie	Akute Nebenwirkungen	Späte Nebenwirkungen	Genetische Prädisposition unterstützende Befunde
ADJK	13	M	Chronisch myeloische Leukämie	Keine	Keine	Keine	Keine	Philadelphia-Chromosom
AODN	4	M	M. Hodgkin	Multiple Lymphknotenregionen 19,8 Gy (11x1,8 Gy)	VCR, VP-16, DOX, DTIC, CPM	Mucositis	Funktionelle Asplenie	Keine
FKMA	7	F	Akute lymphatische Leukämie	Keine	DNR, VCR, MTX (i.v. + intrathekal), CPM, AraC, 6-MP, DOX, 6-TG	Anhaltende Anämie und Thrombozytopenie	Keine	Keine
FRSH	2	F	Akute lymphatische Leukämie	Keine	DNR, VCR, CPM, AraC, 6-MP, MTX (intrathekal), DOX, 6-TG	Fieber während Aplasie, Exanthem, Stomatitis, Anämie	Keine	Keine
HFMN	2	M	Akute lymphatische Leukämie	Hoden 24 Gy (15x1,5 Gy), Ganzkörperbestrahlung 12 Gy mit Boost auf ZNS und Wirbelsäule 6 Gy	MTX (i.v. + intrathekal), VCR, DNR, CPM, 5-MP, AraC (i.v. + intrathekal), VDS, 6-TG, IFO, VP-16	Pneumonie in Aplasie	GvHD	Keine
HNWD	15	M	Glioblastom WHO IV ^o	Rechter Parietallappen 49,5 Gy (25x2 Gy)	TMZ, VP-16, VRL	Keine	Keine	Keine
HSJA	4	F	Nephroblastom	Ganze Lunge 15 Gy (10x1,5 Gy)	DACT, VCR, DOX, CBDCA, VP-16	Anämie, Thrombozytopenie	Anthracyclin-assoziierte Kardiomyopathie	Keine
LHTM	1	M	Neuroblastom	Craniospinale Achse 24 Gy (21x1,6 Gy) mit Boost auf die Metastasenregion 12,6 Gy (7x1,8 Gy)	CPM, TOPO (i.v. + intrathekal), VP-16, CDDP, VDS, VCR, DTIC, IFO, L-PAM, CBDCA, SN-38, TMZ	Prolongierte Panzytopenie, Mucositis, neutropenes Fieber	Keine	Sotos-Syndrom mit heterozygoter Mutation p.Glu724X in Exon 5 des NSD1-Gens
MDSN	14	F	Osteosarkom	Keine	DOX, CDDP, MTX	Keine	Anthracyclin-assoziierte Kardiomyopathie, Platin-induzierte Hochtonschwerhörigkeit	Keine
MNKM	17	F	M. Hodgkin	Multiple Lymphknotenregionen 19,8 Gy (11x1,8 Gy)	VCR, VP-16, DOX	Keine	Keine	Keine
RLMA	7	F	Medulloblastom	Craniospinale Achse 23,4 Gy mit Boost auf die Fossa posterior 30,6 Gy	VCR, CDDP, CCNU, CBDCA, SN-38, TMZ	Anämie, Thrombozytopenie, ausgeprägte	Platin-induzierte Hochtonschwerhörigkeit	Keine

4. Ergebnisse

				(30x1,8 Gy), spinale Abtropfmetastasen L3/4 30 Gy (10x3 Gy) und L4/5 mit angrenzender autochtoner Rückenmuskulatur 30 Gy (10x3 Gy)	VP-16, TOPO (intrathekal), AraC (intrathekal)	Inappetenz mit Notwendigkeit einer parenteralen Ernährung, strahleninduzierte Alopecie		
RLVA	17	F	M. Hodgkin	Keine	VCR, DOX, VP-16	Keine	Keine	Keine
SRAE	0	F	Neuroblastom	Keine	CPM, DOX, VCR	Tumorlysesyndrom, disseminierte intravasale Gerinnung	Keine	Keine
SRIE	13	F	M. Hodgkin, reifes zystisches Teratom	Multiple Lymphknotenregionen 19,8 Gy (14x1,5 Gy), ganze Lunge 15 Gy (15x1 Gy)	VCR, DOX, VP-16, DTIC, CPM	Keine	Vincristin-assoziierte Neuropathie, funktionelle Asplenie	Keine

Tabelle 1: Tabelle der Charakteristika der Probanden mit malignen Tumoren

4.2. Auswertung der DSB-Reparaturkinetik in isolierten Lymphozyten

Die Lymphozytenanalyse der Kinder mit malignen Tumoren und der gesunden Kontrollkinder wurde mittels Zellzentrifugation analog durchgeführt. Die Zellen wurden pro Patient in 4 Gruppen unterteilt. Eine Gruppe wurde ohne Bestrahlung direkt untersucht (= unbestrahlt). Zur Induktion von DSBs wurden die isolierten Lymphozyten der anderen 3 Gruppen mit einer Dosis von 1 bzw. 2 Gy bestrahlt. Die Markierung der Reparaturproteine erfolgte zu spezifischen Zeitpunkten (sofort, 30 Minuten, 8 und 24 Stunden). Tabelle 2 zeigt den Zusammenhang der Untersuchungszeitpunkte nach der Bestrahlung der Lymphozyten mit der verwendeten Strahlendosis.

Probe	Spezifischer Untersuchungszeitpunkt nach Bestrahlung	Verwendete Strahlendosis
1 (= unbestrahlt)	sofort	0 Gy
2 (= Induktion)	30 Minuten	1 Gy
3	8 Stunden	2 Gy
4	24 Stunden	2 Gy

Tabelle 2: Zusammenhang des spezifischen Untersuchungszeitpunktes nach der Bestrahlung der Lymphozyten mit der verwendeten Strahlendosis der Proben

Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen für γ H2AX, 53BP1 und pATM wurden in Abbildung 8 nebeneinander dargestellt. Untereinander wurden die unbestrahlten Proben und die Proben an den unterschiedlichen Reparaturzeitpunkten gezeigt.

4. Ergebnisse

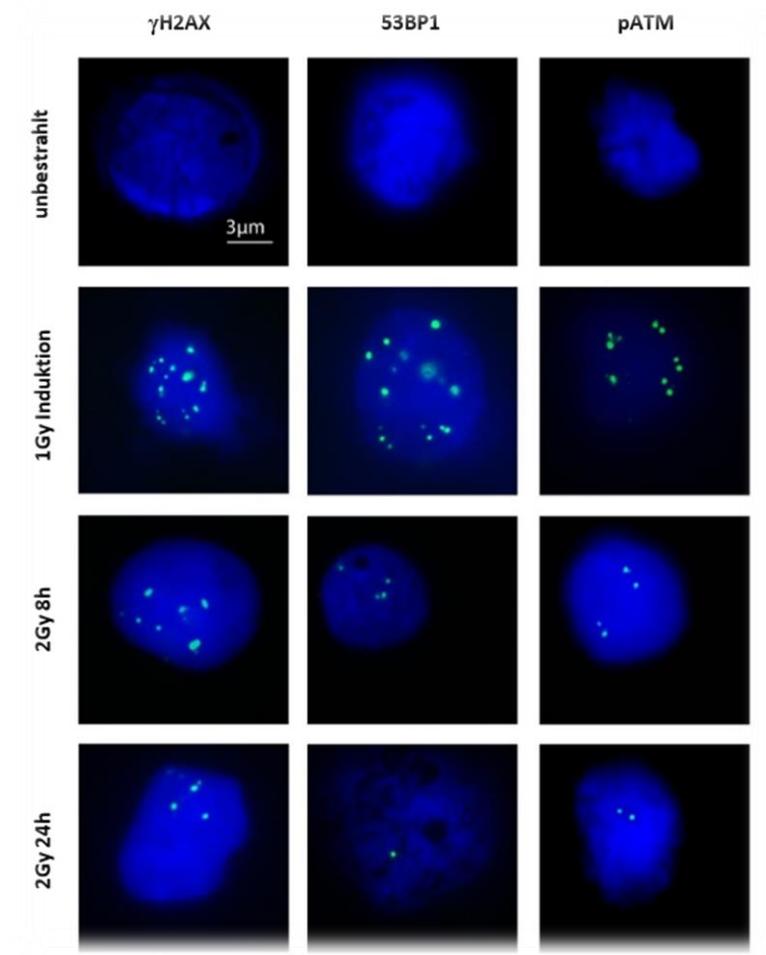


Abbildung 8: Repräsentative Aufnahmen strahleninduzierter Foci der Reparaturproteine γ H2AX, 53BP1 und pATM (grün) an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung in DAPI-markierten Zellkernen (blau)

Im Weiteren wurden die Probandengruppen, die Zeitpunkte und die markierten Reparaturfaktoren miteinander verglichen.

Zur Signifikanzprüfung der Ergebnisse wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Bei einem statistischen Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zeigte sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (30 Minuten, 8 und 24 Stunden) oder applizierten Strahlendosis (1 und 2 Gy) ein signifikanter Unterschied zwischen den Probandengruppen (gesunde Kontrollen und Malignome). Auch bei der Anzahl quantitativ erfasster Foci für γ H2AX, pATM und 53BP1 war keine signifikante Differenz zu erkennen.

4.2.1. DSB-Reparaturkinetik von Kindern mit Malignom und gesunden Kindern

Ohne Bestrahlung konnten durchschnittlich unter Betrachtung der drei unterschiedlichen Reparaturfaktoren in den Lymphozyten der gesunden Kinder $0,13 \pm 0,02$ Foci pro Zelle nachgewiesen werden. Bei den Patienten mit Malignom wurden $0,18 \pm 0,01$ Foci ermittelt. Bei der Induktion wurden

4. Ergebnisse

für die gesunden Kontrollen $9,51 \pm 0,20$ und bei den Malignomen $9,67 \pm 0,44$ Foci pro Zelle beobachtet. Nach 8 Stunden wurden bei den gesunden Kindern $4,36 \pm 0,18$ und für die Kinder mit Malignomen $4,37 \pm 0,32$ Foci pro Zelle quantifiziert sowie 24 Stunden nach der Bestrahlung $2,39 \pm 0,15$ (gesunde Kinder) und $2,35 \pm 0,18$ (Kinder mit Malignom) Foci pro Zelle (Abbildung 9). Es zeigte sich somit kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Focizahlen zwischen gesunden Kindern und Kindern mit Malignom bei Betrachtung der drei Reparaturfaktoren und untersuchten Zeitpunkte.

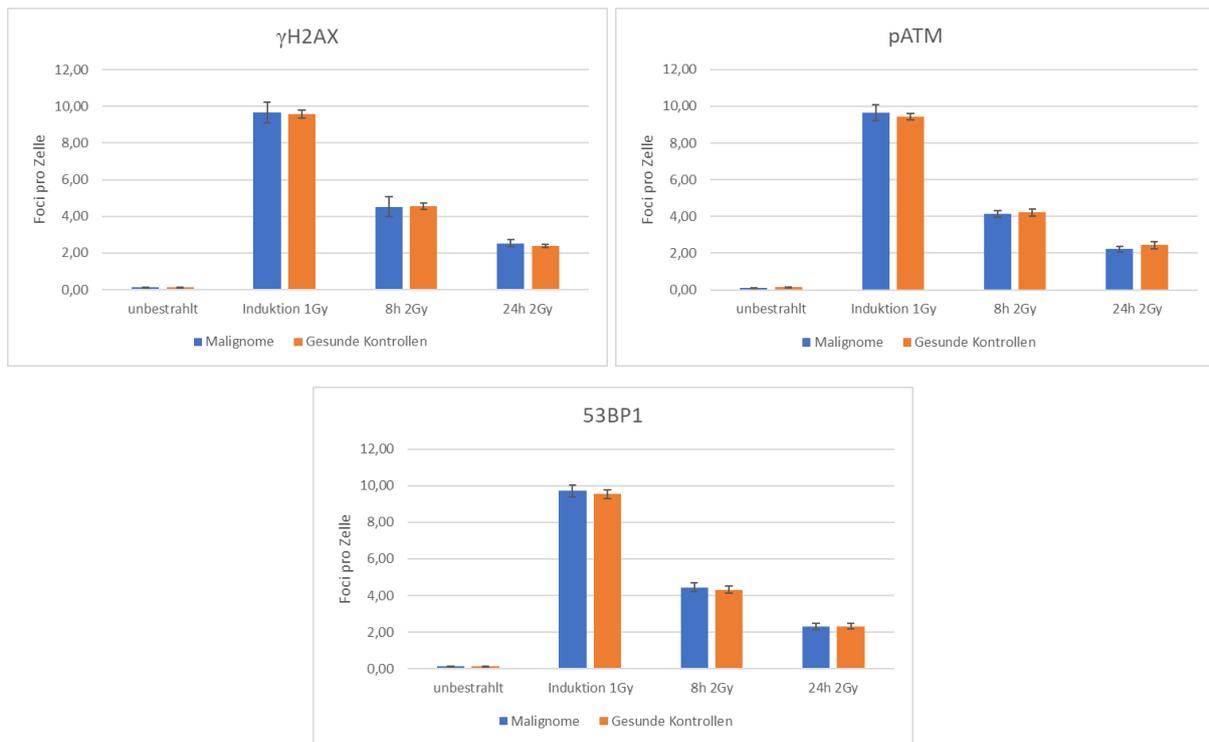


Abbildung 9: Darstellung der quantifizierten Foci pro Zelle für γ H2AX, pATM und 53BP1. Verglichen wurden Patienten mit malignen Tumoren und gesunde Kontrollprobanden pro Strahlendosis und Zeitpunkt

Durchschnittlich wurden in Summe für alle drei Reparaturfaktoren nach der Induktion mit 1 Gy in beiden Probandengruppen 9,59 Foci pro Zelle gezählt. 8 Stunden nach der Bestrahlung mit 2 Gy wurden durchschnittlich 4,37 Foci pro Zelle erfasst. Unabhängig von der applizierten Dosis vermindert sich die Anzahl der Foci somit innerhalb des betrachteten Zeitraums (von 30 min bis 8h) um 46%. 24 Stunden nach der Bestrahlung waren noch durchschnittlich 2,37 Foci pro Zelle vorhanden. Somit waren im Zeitraum von 8 bis 24 Stunden nach der Bestrahlung 54% der Foci nicht mehr nachweisbar (Abbildung 10).

4. Ergebnisse

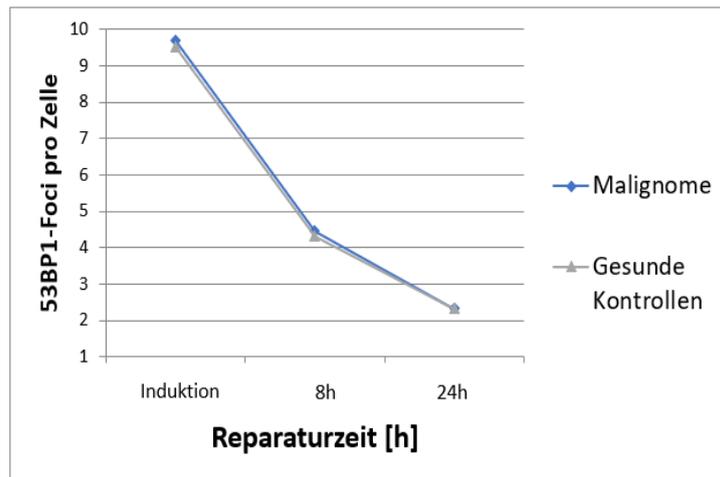


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Reparaturkinetik für 53BP1-Foci jeweils 30 Minuten, 8 und 24 Stunden nach der Bestrahlung. Verglichen wurden Probanden mit malignen Tumoren mit der gesunden Referenzgruppe

Als Untersuchungsmaterial dienen in dieser Arbeit aus dem Blut isolierte Lymphozyten. Vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe folgend (Schuler et al. 2014) wurden auch in dieser Arbeit Leukämien trotz Erkrankung mit proliferierenden Lymphoblasten im Blut nicht ausgeschlossen um die typische Verteilung der Tumorentitäten abzubilden und um die Ergebnisse im Vergleich zu betrachten. Um einen Einfluss unreifer Blasten im Blut mit potentiell multiplen Mutationen bei Leukämien zu detektieren wurden zusätzlich alle Kinder mit maligner Erkrankung (= Malignome gesamt) und Kinder mit soliden Malignomen unter Ausschluss der Leukämien (= Solide Malignome) noch gesondert betrachtet. Die Tabellen 3, 4 und 5 zeigen den jeweiligen Mittelwert und Standardfehler aller Kinder mit maligner Erkrankung (= Malignome gesamt), soliden Malignome und gesunden Kontrollkinder im Hinblick auf die drei betrachteten Reparaturfaktoren im direkten Vergleich.

γ H2AX	Malignome gesamt	Solide Malignome	Gesunde Kontrollen
unbestrahlt	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02
Induktion 1 Gy	9,67 ± 0,58	9,67 ± 0,53	9,57 ± 0,21
8h 2 Gy	4,52 ± 0,54	4,73 ± 0,57	4,55 ± 0,16
24h 2 Gy	2,52 ± 0,20	2,57 ± 0,23	2,39 ± 0,09

Tabelle 3: Mittelwert und Standardfehler der γ H2AX-Foci aller Kinder mit maligner Erkrankung (= Malignome gesamt), soliden Malignome und gesunden Kontrollkinder zum direkten Vergleich

4. Ergebnisse

pATM	Malignome gesamt	Solide Malignome	Gesunde Kontrollen
unbestrahlt	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,02
Induktion 1 Gy	9,65 ± 0,42	9,88 ± 0,38	9,42 ± 0,18
8h 2 Gy	4,13 ± 0,18	4,27 ± 0,21	4,21 ± 0,19
24h 2 Gy	2,22 ± 0,15	2,27 ± 0,18	2,44 ± 0,20

Tabelle 4: Mittelwert und Standardfehler der pATM-Foci aller Kinder mit maligner Erkrankung (= Malignome gesamt), soliden Malignome und gesunden Kontrollkinder zum direkten Vergleich

53BP1	Malignome gesamt	Solide Malignome	Gesunde Kontrollen
unbestrahlt	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02
Induktion 1 Gy	9,70 ± 0,31	10,15 ± 0,31	9,53 ± 0,22
8h 2 Gy	4,45 ± 0,23	4,69 ± 0,25	4,31 ± 0,19
24h 2 Gy	2,32 ± 0,18	2,48 ± 0,25	2,33 ± 0,16

Tabelle 5: Mittelwert und Standardfehler der 53BP1-Foci aller Kinder mit maligner Erkrankung (= Malignome gesamt), soliden Malignome und gesunden Kontrollkinder zum direkten Vergleich

Auch unter Ausschluss der Leukämien zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Focizahl bei allen drei Reparaturfaktoren und an den untersuchten Zeitpunkten. In der Abbildung 11 wird dies illustriert.

4. Ergebnisse

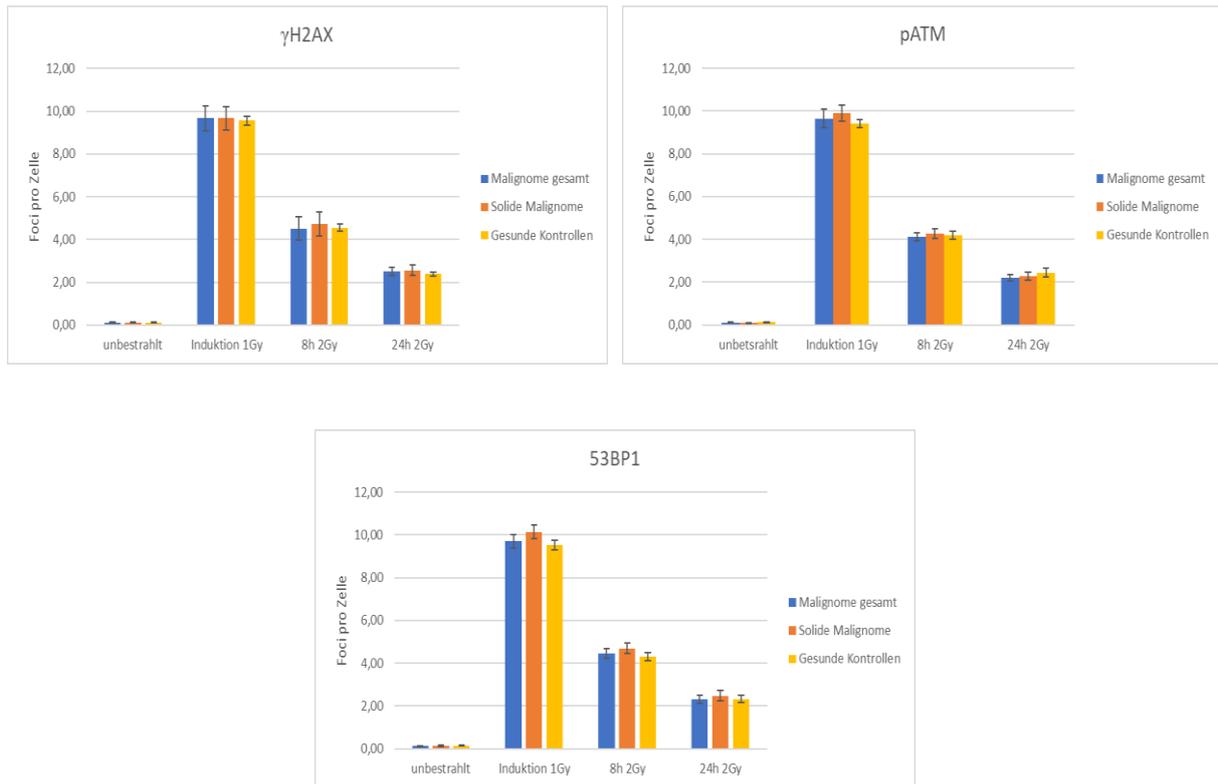


Abbildung 11: Darstellung der quantifizierten Foci pro Zelle für γ H2AX, pATM und 53BP1. Verglichen wurden Patienten mit Malignomen gesamt, solide Malignome und gesunden Kontrollprobanden pro Strahlendosis und Zeitpunkt

4.2.2. DSB-Reparaturkinetik der angefärbten Reparaturproteine

Die unbestrahlten Zellen beider Probandengruppen (gesunde Kinder und Kinder mit Malignomen) zeigten für γ H2AX $0,12 \pm 0,015$, für pATM $0,13 \pm 0,015$ und für 53BP1 $0,14 \pm 0,020$ Foci pro Zelle. Nach der Induktion mit einer Strahlendosis von 1 Gy wurden für γ H2AX $9,62 \pm 0,395$, für pATM $9,535 \pm 0,300$ und für 53BP1 $9,615 \pm 0,265$ Foci pro Zelle quantifiziert. Nach einem Zeitraum von 8 Stunden wurden für γ H2AX $4,535 \pm 0,350$, für pATM $4,17 \pm 0,185$ und für 53BP1 $4,38 \pm 0,210$ Foci pro Zelle detektiert, während 24 Stunden nach der Bestrahlung für γ H2AX $2,455 \pm 0,145$, für pATM $2,33 \pm 0,175$ und für 53BP1 $2,325 \pm 0,170$ Foci pro Zelle vorhanden waren (Abbildung 12). Somit konnte kein signifikanter Unterschied in der Focianzahl zwischen den Reparaturproteinen und an den untersuchten Zeitpunkten sowie den beiden betrachteten Kollektiven nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

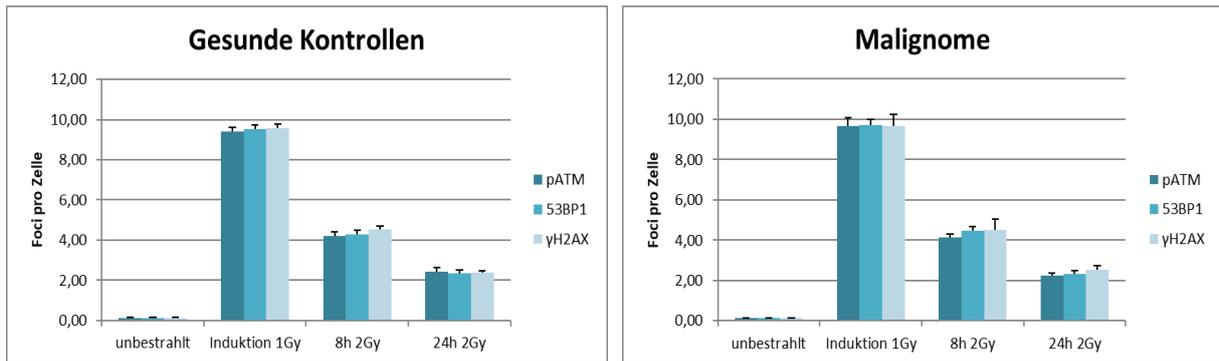


Abbildung 12: Darstellung der quantifizierten Foci pro Zelle bei Patienten mit malignen Tumoren und gesunden Kontrollprobanden. Verglichen wurden drei unterschiedliche Reparaturproteine pro Strahlendosis und Zeitpunkt

5. Diskussion

Eine verminderte oder fehlerhafte DNA-Reparatur führt zur Anhäufung von DNA-Schäden. Dies wird als Ursache für die Entstehung von malignen Erkrankungen im Kindesalter diskutiert. Der DSB ist unter allen möglichen DNA-Läsionen der Schwerwiegendste. Repariert die Zelle diesen Schaden nicht oder nur fehlerhaft, kann dies die DNA-Replikation beeinflussen, die Apoptose einleiten oder zu einer genetischen Mutation führen. In dieser Arbeit wurde die Reparaturkinetik strahleninduzierter DSBs durch Visualisierung von γ H2AX-, pATM- und 53BP1-Foci untersucht. Eine Pilot- sowie Folgestudie (Rübe CE. et al. 2010; Schuler et al. 2014) konnte eine erhöhte Anzahl an DSBs bei Kindern mit malignen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Kindern aufzeigen, wodurch eine verminderte DSB-Reparaturkapazität als möglichen Auslöser für die Tumorgenese im Kindesalter in Betracht gezogen wurde.

Ziel dieser Arbeit war es, die Ergebnisse der bereits durchgeführten Studien durch die additive Analyse weiterer Probanden zu validieren. Entgegen der Erwartung wurde jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (30 Minuten, 8 und 24 Stunden) oder applizierten Strahlendosen (1 und 2 Gy) ein Unterschied bei der DSB-Reparaturkapazität zwischen den Probandengruppen (gesunde Kontrollen und Malignome) nachgewiesen. Durch die Gegenüberstellung der quantitativen Ergebnisse der γ H2AX-, pATM- und 53BP1-Analyse sollte untersucht werden, ob eines der Reparaturfaktor besonders geeignet ist eine DSB-Reparaturdefizienz mit hoher Sensitivität nachzuweisen. Es waren jedoch keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

5.1. Betrachtung der Versuchsmethodik

5.1.1. Auswahl des Patientenkollektives

Es wurden Lymphozyten von 26 Kindern untersucht. 14 der Kinder litten an einer malignen Tumorerkrankung und 12 Kinder fungierten als gesunde Kontrollen. Die Verteilung der Tumorentitäten bei den hier untersuchten Probanden mit Malignomen ist vergleichbar mit den Daten des Deutschen Kinderkrebsregisters im Jahresbericht 2018. Zu den drei größten Gruppen gehören die Leukämien, die Lymphome und die Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) (Tabelle 6). Von den untersuchten Kindern mit Malignom waren 9 weiblich und 5 männlich. Da prozentual mehr männliche Kinder im Vergleich zu Weiblichen an Krebs erkranken, bildet das hier analysierte Kollektiv die tatsächliche Geschlechterverteilung nicht ab.

5. Diskussion

Tumorgruppe	Häufigkeit der malignen Tumore bei den untersuchten Kindern [%]	Häufigkeit in Deutschland (Daten des DKKR von 2009-2017) [%]
Leukämien	28,6	30,2
Lymphome	28,6	14,4
ZNS-Tumore	14,3	23,8
PNS-Tumore	14,3	5,5
Renale Tumore	7,1	4,7
Knochentumore	7,1	5,2
Weichteiltumore	0	5,8
Keimzelltumore	0	3,9
Sonstige	0	6,6

Tabelle 6: Darstellung der Häufigkeiten der Tumorentitäten der untersuchten Kinder im Vergleich zu den Daten des DKKR vom Jahresbericht 2018

Im Unterschied zur Pilotstudie (Rübe CE. et al. 2010) wurde in der weiterführenden Studie von Schuler et al. 2014 Leukämien nicht ausgeschlossen um die Abbildung der natürlichen Verteilung der Tumorentitäten zu gewährleisten, da Leukämien etwa 30% der kindlichen Malignome ausmachen. Um einen potentiellen Einfluss der im peripheren Blut zirkulierenden, proliferierenden Lymphoblasten auf die DSB-Reparaturkinetik zu erfassen wurden in dieser Arbeit die Kinder mit Malignomen einbezogen aber auch unter Ausschluss der Leukämien („Malignome solide“) getrennt betrachtet. Es wurde kein Unterschied in der Focizahl beider Gruppen nachgewiesen, weder an den unterschiedlichen Reparaturzeitpunkten noch für die untersuchten Reparaturfaktoren.

Leukämien sind maligne Erkrankungen des blutbildenden oder lymphatischen Systems. Sie zeichnen sich durch stark vermehrte Bildung von funktionsuntüchtigen Vorläuferzellen der Leukozyten aus, die das Knochenmark infiltrieren, dort die übliche Blutbildung verdrängen und in der Regel auch stark vermehrt im peripheren Blut auftreten. Dies führt zu einem Mangel an reifen funktionstüchtigen Leukozyten. Je nach beteiligtem Zelltyp unterscheidet man myeloische von lymphatischen Leukämien. Myeloische Leukämien gehen von den Vorläuferzellen der Granulozyten, im weiteren Sinne auch der Erythrozyten und Thrombozyten aus; lymphatische Leukämien betreffen die Lymphozyten und ihre Vorläuferzellen. Daher sind insbesondere die lymphatischen Leukämien als Einflussfaktor von Interesse. Darüber hinaus wird anhand des Grades der Unreife der im Knochenmark und im Blut vorkommenden Leukämiezellen zwischen akuten und chronischen Leukämien unterschieden. Bei den akuten Leukämien finden sich vor allem Zellen in einem sehr frühen, unreifen Stadium, die nahezu funktionslos sind. Bei den chronischen Leukämien werden vermehrt Leukämiezellen beobachtet, die

5. Diskussion

deutlich weiterentwickelt sind und bereits den reifen Blutzellen ähneln, jedoch noch nicht vollständig funktionstüchtig sind (Possinger und Regierer 2006). Die ALL ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. In der sogenannten FAB-Klassifikation („French-American-British“) wird zwischen drei verschiedenen Morphologien der ALL „L1-3“ unterschieden (Tabelle 7). Diese demonstriert die deutlichen Unterschiede innerhalb dieser Leukämiezellen aber auch die Veränderungen im Vergleich zu normalen Lymphozyten (Bennett et al. 1976; Pui et al. 2004).

Cytological features	L1	L2	L3
Cell size	Small cells predominate	Large, heterogeneous in size	Large and homogeneous
Nuclear chromatin	Homogeneous in any one case	Variable-heterogeneous in any one case	Finely stippled and homogeneous
Nuclear shape	Regular, occasional clefting or indentation	Irregular; clefting and indentation common	Regular-oval and round
Nucleoli	Not visible, or small and inconspicuous	One or more present, often large	Prominent; one or more vesicular
Amount of cytoplasm	Scanty	Variable; often moderately abundant	Moderately abundant
Basophilia of cytoplasm	Slight or moderate, rarely intense	Variable; deep in some	Very deep
Cytoplasmic vacuolation	Variable	Variable	Often prominent

Tabelle 7: FAB-Klassifikation der ALL (aus Bennett JM., Catovsky D., Daniel MT., Flandrin G., Galton DA., Gralnick HR., Sultan C.: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976; 33(4): 451-8)

Auch bei der chronischen lymphatischen Leukämie zeigen sich typischerweise reifzellige, aber kleine Lymphozyten sowie Gumprechtsche Kernschatten (entstehend als Artefakt bei der Präparation) im Blutausschlag (Shanafelt et al. 2004). Außerdem sind reziproke Translokationen für Leukämien typisch. Diese chromosomalen Veränderungen sind häufig und vielfältig. Dabei werden vor allem Chromosomen-Translokationen und Chromosomen-Deletionen angeführt (Possinger und Regierer 2006). Diese Patienten zeigen aufgrund ihrer Erkrankung mit proliferierenden Lymphoblasten somit potentiell eine morphologische, funktionelle und genetische Veränderung von im Blut zirkulierenden Lymphozyten.

5. Diskussion

Aufgrund der geringen Anzahl der in dieser Studie eingeschlossenen Kinder mit maligner Erkrankung (Malignome $n = 14$ gesamt, davon 10 solide Tumore und 4 Leukämien) lässt sich letztlich nicht sicher ausschließen, dass die proliferierenden Lymphoblasten mit potentiell veränderter oder verminderter Funktion oder auch die DSB-Reparatur betreffende genetischen Veränderungen einen Einfluss auf die Untersuchung der DNA-Reparaturkapazität haben.

5.1.2. Untersuchung der DSB-Reparaturkapazität mittels IFM

Mittels der IFM wurde an isolierten Blut-Lymphozyten gezeigt, dass die Anzahl der Foci nach der Bestrahlung mit voranschreitender Reparaturzeit abnimmt. Dies korreliert mit der Reparatur von DSBs in der Zelle über die Zeit. Aufgrund einer sehr effizienten DSB-Reparatur in den isolierten Lymphozyten war 8 Stunden nach der Bestrahlung nur noch eine sehr geringe Anzahl an Foci nachweisbar. Durch die Quantifizierung von DNA-Reparaturproteinen mittels IFM konnte in verschiedenen klinischen Studien die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber DNA-schädigenden Therapien abgebildet werden (Löbrich und Jeggo 2005; Rube CE. et al. 2010). Hierbei korreliert die Kinetik des Foci-Verlustes mit der Kinetik der DSB-Reparatur (Rothkamm und Löbrich 2003; Rube CE. et al. 2010). Die quantitative Analyse der γ H2AX-, pATM- und 53BP1-Foci mittels IFM ermöglicht ein Monitoring der DSB-Reparaturkapazität unabhängig von genetischen und epigenetischen Veränderungen. Hierdurch ist es möglich Veränderungen, welche die DSB-Reparatur beeinflussen, zu detektieren und die individuelle Sensitivität gegenüber DNA-schädigender Therapie zu ermitteln. Da Blutproben vor Beginn einer krankheitsassoziierten Therapie leicht zu gewinnen und die Analyse innerhalb von 24 Stunden durchführbar ist, erlaubt diese Methode eine Testung vor Beginn der Therapie, womit DSB-Reparaturdefekte in der klinischen Routine erkannt und somit die Identifikation von Patienten mit genetischer Prädisposition detektiert werden können.

Die objektive Quantifizierung der γ H2AX-, pATM- und 53BP1-Foci ist jedoch schwierig. Ein Grund hierfür ist die Dreidimensionalität der untersuchten Zellen. Die Foci-Zählung wird per Auge anhand von Schnittbildern des Zellkerns an einem Epifluoreszenzmikroskops durchgeführt. Diese Vorgehensweise erfordert Routine sowie Erfahrung und ist zudem zeitaufwendig, weshalb der Probendurchsatz gering ist. Nach der Applikation von Strahlendosen ab 2 Gy überschneiden sich überdies die Fluoreszenzen räumlich naher Foci, wodurch diese nicht mehr klar voneinander differenziert werden können. Hierdurch wird die tatsächliche Anzahl vorhandener Foci unterschätzt. Des Weiteren besteht eine große Variabilität bezüglich der Foci-Größe und -Leuchtintensität (Abbildung 13). Hierdurch bedingt variieren die Ergebnisse in Anhängigkeit vom subjektiven Eindruck des Betrachters.

5. Diskussion

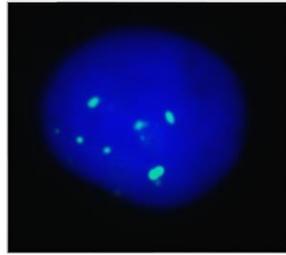


Abbildung 13: Variabilität der Größe und Leuchtintensität der γ H2AX-Foci in einem Lymphozyt 8 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy

Durch den Nachweis von γ H2AX-, pATM- und 53BP1-Foci können Reparaturdefekte des NHEJ detektiert werden. Dieser Nachweis über die Induktion und Reparatur von DSBs wird jedoch indirekt erbracht, indem Reparaturproteine des NHEJ visualisiert werden, die im Umfeld eines DSBs akkumulieren. In proliferierenden Zellen kann die DSB-Reparatur jedoch auch über die HR erfolgen. Diese DSBs würden bei dem Nachweis von NHEJ-assoziierten Reparaturproteinen unerkannt bleiben, was zu einer Diskrepanz zwischen visualisierten Foci und tatsächlicher DSB-Anzahl führen kann (Kinner et al. 2008).

Ebenfalls kritisch zu hinterfragen ist die Bedeutung nachgewiesener Foci. Die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung von γ H2AX erfolgt durch die Proteinphosphatase 2A im Anschluss an die erfolgte DSB-Reparatur (Chowdhury et al. 2005). Hierdurch ist es möglich, aufgrund der noch nicht erfolgten Dephosphorylierung, Foci nachzuweisen, obwohl der DSB gar nicht mehr vorhanden ist. Auch eine Persistenz von γ H2AX an der ehemaligen Bruchstelle ist möglich und in der Literatur beschrieben (Mah et al. 2010). McManus und Hendzel 2005 haben zudem eine DSB-unabhängige Akkumulation von γ H2AX beschrieben. Somit entspricht nicht jeder nachgewiesene Fokus auch einem DSB. Eine Korrelation zwischen der Foci-Verlust-Kinetik und der DSB-Reparatur wurde mittels PFGE durch mehrere Autoren beschrieben (Rothkamm und Löbrich 2003; Rube CE. et al. 2010). Jedoch ist eine abnehmende Foci-Anzahl nicht immer gleichbedeutend mit der DSB-Reparatur, da Additionen, Deletionen und falsches Re-Joining statt einer adäquaten DSB-Reparatur ebenfalls möglich sind und nicht von der Foci-Analyse abgebildet werden.

Dennoch ist die IFM eine sensitive Methode zur Untersuchung der DSB-Reparaturkinetik im Vergleich zu anderen Methoden wie der PFGE oder dem Comet-Assay. Die benötigte Strahlendosis ist niedrig und entspricht den üblichen Dosen einer fraktionierten Strahlentherapie. Neben der Betrachtung des Reparaturverlaufes wird auch die DSB-Lokalisation innerhalb der Zelle ermöglicht.

Allerdings lässt der zunehmend bekannte Einfluss des Chromatin-Remodelings auf die DNA-Reparatur vermuten, dass Methoden wie zum Beispiel die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) eine deutlich exaktere Beschreibung der DSB-Reparaturkinetik bieten (Lorat et al. 2012). Die eukaryontische DNA ist zu hochkondensierten Chromosomen verpackt. Das Chromatin kann in aktives Euchromatin und inaktiviertes Heterochromatin unterteilt werden, welche nach dem Grad der Kondensation und dem

5. Diskussion

Vorhandensein unterschiedlicher Histonvarianten und -modifikationen definiert wird. Die Auflösung des TEM erlaubt die Visualisierung der intrazellulären Verteilung von Reparaturproteinen im Kontext des Chromatins. Durch die Markierung von phosphoryliertem Ku70, welches eine Bindung mit gebrochenen DNA-Enden zur Vorbereitung des Re-Joining eingeht, ermöglicht beispielsweise eine sichere Erkennung von nicht-reparierten DSBs in euchromatischen und heterochromatischen Bereichen und somit die Darstellung und Analyse von chromatinabhängigen Unterschieden in der DNA-Reparaturkinetik (Lorat et al. 2012).

5.1.3. Cytospin als Zellsedimentationsverfahren

Eine wichtige Grundvoraussetzung zur Durchführung der IFM stellt eine ausreichende Anzahl und zelluläre Integrität der Lymphozyten dar um plausible Ergebnisse zu erzielen. Zur Durchführung der Analyse ist es notwendig die Zellen aus ihrem Kulturmedium auf einen Objektträger aufzubringen.

Je nach Größe, Gewicht und Allgemeinzustand des Patienten wurden 4-8 ml Vollblut aquiriert. Bei kleinen Volumina an Vollblut war die Anzahl an Lymphozyten, die auf Objektträger aufgebracht werden konnten, jedoch gering, obwohl sich normwertig in einem 1 ml Vollblut ca. 1000 bis 2900 Lymphozyten befinden. Aufgrund der geringen Zellzahl durch ungenügende Sedimentation und den Zellverlusten im Rahmen der durchgeführten Experimente wurde in dieser Arbeit statt der bisher angewendeten Schwerkraftsedimentation die Zytozentrifugation mittels des Cytospin etabliert.

Auch Ho et al. 2011 publizierte, dass durch das Isolieren von Lymphozyten aus dem peripheren venösen Blut, der Kryokonservierung und dem Waschen bereits 50% der Zellen verloren gehen. Ein weiterer Verlust von 60% der übrigen Blut-Lymphozyten erfolgt aufgrund insuffizienter Fixierung der Zellen bei der Schwerkraftsedimentation im Rahmen der multiplen Waschschrte, welche bei der IFM erforderlich sind. Hierbei hatte es keinen Einfluss auf den Zellverlust, ob die Lymphozyten direkt bearbeitet oder zuvor 2-3 Tage oder 4 Wochen kryokonserviert waren. Auch Wildemann et al. 2006 beschreibt aufgrund der insuffizienteren Fixierung der Zellen an einem Untergrund bei der Schwerkraftsedimentation einen größeren Zellverlust durch die Waschschrte, was durch Verwendung von größeren Blutvolumina kompensiert wurde. Durch den Cytospin erfolgte eine Zellanreicherung, was bei kleinen Probenvolumina einen Vorteil darstellt.

Zudem wird die Detektierbarkeit erhöht, da viele Zellen auf einer kleinen Objektträgerfläche konzentriert aufgebracht werden. Papillo und Lapen 1994 publizierten, dass bei der Zellzentrifugation das Absetzen der Zellen aus der Suspension schneller erfolgt als bei der Schwerkraftsedimentation, was zu einer Zeitersparnis bei der Analyse führt.

Ein Nachteil der Methode ist eine mögliche Veränderung der Zellmorphologie und damit potentiell auch deren Funktion. Mittels Fluoreszenzmikroskop zeigte sich in den Lymphozyten, dass Zellkerne beschädigt waren (Abbildung 14). In der Literatur sind bei Lymphozyten auch morphologische Transformationen wie ein elliptisch auseinander gezogenes Zytoplasma mit ausgefranst Rändern aber auch ein vergrößerter und veränderter Zytoplasmasaum und deutlich hervortretende Nucleoli

5. Diskussion

beschrieben worden (Wildemann et al. 2006; Tsang et al. 2017). Die Schwerkraftsedimentation als sanfteres Verfahren wiederum ermöglicht einen guten morphologischen Zell- und damit auch Zellkernerhalt von menschlichen Lymphozyten (Tsang et al. 2017). Durch die mechanische Belastung für die Zellen im Rahmen der Zentrifugation kann ein Einfluss auf den Zellkern und damit auch die DSB-Reparatur-Kapazität nicht ausgeschlossen werden. Dies stellt eine mögliche Ursache dafür dar, dass in dem hier untersuchten Patientenkollektiv kein Hinweis mehr auf den Zusammenhang von verminderter DSB-Reparaturkapazität und einer malignen Tumorerkrankung hergestellt werden konnte.

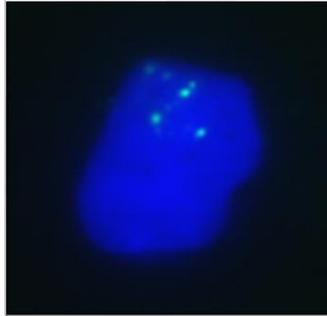


Abbildung 14: Ausgefranzter Zellkern eines Lymphozyten 8 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy Färbung mit γ H2AX

5.2. Betrachtung der Versuchsergebnisse mit Vorarbeiten

5.2.1. Vergleich der DSB-Reparaturkinetik von Kindern mit maligner Erkrankung und gesunden Kontrollkindern

In dieser Arbeit wurde mittels der γ H2AX-, pATM- und 53BP1-Focianalyse gezeigt, dass keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Reparaturkapazität zwischen den analysierten Patienten mit Malignom und den gesunden Kontrollkindern vorhanden waren. Diese Ergebnisse sind jedoch gegensätzlich zu denen, die in vorangegangenen Publikationen der Arbeitsgruppe veröffentlicht wurden. Diese Projekte wurden ebenfalls in der AG Rube (Rube CE. et al. 2010; Schuler et al. 2014) durchgeführt, weshalb die Experimente dieser Arbeit adäquat erfolgten. Die relevanten Unterschiede und somit möglichen Einflussfaktoren auf die Vergleichbarkeit der Arbeiten von Schuler et al. 2014 und Rube CE. et al. 2010 zu dieser Arbeit werden in Tabelle 8 dargestellt.

5. Diskussion

Merkmale	In dieser Arbeit	Schuler et al. 2014	Rübe CE. et al. 2010
Probanden	Malignome (einschließlich Leukämien)	Malignome (einschließlich Leukämien)	Solide Malignome
Material	Isolierte Lymphozyten	Isolierte Lymphozyten	Vollblut oder isolierte Lymphozyten
Ablauf	Kryokonservierung; Zytozentrifugation	Kryokonservierung; Schwerkraftsedimentation	Sofortige Untersuchung; Schwerkraftsedimentation
Bestrahlung	Linearbeschleuniger, Photonen, 6 MV. Dosisrate: 2 Gy/min	Röntgenröhre, Photonen, 90 kV, 19 mA. Dosisrate: 1 Gy/min	Röntgenröhre, Photonen, 90 kV, 19 mA. Dosisrate: 1 Gy/min
Untersuchungszeitpunkte	30 min; 8h; 24h	15 min; 8h; 24h	30 min; 2,5h; 5h; 8h

Tabelle 8: Vergleich der unterschiedlichen Methoden-Merkmale und des Ablaufes aller 3 Arbeiten

Rübe CE. et al. 2010 hingegen konnten statistisch signifikante Unterschiede in der durchschnittlichen DSB-Reparaturkapazität zwischen Tumorkindern und gesunden Kontrollkindern aufzeigen. Anhand von Familien mit der Erkrankung AT wurden bei Rübe CE. et al. 2010 nach der Differenzierung in homozygot gesunde (ATM+/+), heterozygote (ATM+/-) und homozygot kranke (ATM-/-) Familienmitglieder selbst bei Heterozygotie dezente Unterschiede in der DSB-Reparaturkapazität nachgewiesen. Für diese Untersuchungen wurden die isolierten Blut-Lymphozyten frisch, ohne vorherige Kryokonservierung, bearbeitet. Schuler et al. 2014 führte vor der Untersuchung der isolierten Lymphozyten eine Kryokonservierung durch um alle Proben zeitgleich analysieren zu können und somit versuchsbezogene Schwankungen zu minimieren. Dies führte dazu, dass der subtile DSB-Reparaturdefekt von ATM +/- Probanden nur noch bei der Markierung von γ H2AX und 8 Stunden nach der Bestrahlung nachgewiesen werden konnten. Dies wurde in den bisherigen Studien deutlich klarer detektiert, weshalb die Kryokonservierung als Einflussfaktor in den Fokus geriet. Es scheint, dass der Nachweis solch subtiler DSB-Reparaturdefekte nach einer zuvor durchgeführten Kryokonservierung der Zellen nicht mehr möglich ist.

Laut Duthie et al. 2002 hat die Kryokonservierung keinen Einfluss auf endogene und exogen induzierte DNA-Schäden. Weder die Isolierung noch das Einfrieren der Zellen erhöhte die Anzahl von DNA-Strangbrüchen über das endogene Level im Vergleich zu direkt bearbeiteten, isolierten menschlichen Lymphozyten (Duthie et al. 2002; Ho et al. 2011). Allerdings wurden Hydrogenperoxid-induzierte DNA-Strangbrüche in frischen Lymphozyten repariert, in kryokonservierten Lymphozyten hingegen nicht (Duthie et al. 2002). Ho et al. 2011 untersuchte ebenfalls direkt bearbeitete und kryokonservierte Lymphozyten und fand heraus, dass es bei der Reparatur von Oxidantien-induzierten DSBs bei beiden keinen Unterschied gab. Dies bestätigt die Vermutung, dass kryokonservierte Lymphozyten zwar zum validen DNA-Schadensmonitoring dienen, aber deren DNA-Reparatur nur fraglich abgebildet wird

5. Diskussion

(Duthie et al. 2002). In einer Studie mit NK-Zellen, eine Unterart der Lymphozyten, konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der Zellen in der Probe zum Zeitpunkt der Kryokonservierung keinen Einfluss auf die spätere Zellvitalität bzw. -regeneration, den Phänotyp oder die untersuchten Funktionen wie Proliferation, Zytokinproduktion oder Zytotoxizität hat (Domogala et al. 2016). Das Einfrieren der Proben sollte aufgrund besserer Erholungsraten von NK-Zellen nach Kryokonservierung von 95% statt 80% allerdings langsam stattfinden, wobei die Geschwindigkeit der Abkühlung der Proben keinen Einfluss auf die Aktivität oder andere Funktionen der NK-Zellen zeigte (Ichino und Ishikawa 1985).

Ho et al. 2011 andererseits konnte einen Verlust von Lymphozyten aus peripherem venösem Blut nach der Kryokonservierung feststellen, wobei es hierbei keinen Unterschied machte, ob die Zellen 2-3 Tage oder 4 Wochen kryokonserviert waren. Dies führt zu der These, dass durch die Kryokonservierung möglicherweise labilere reparaturdefiziente Zellen vorzeitig in die Apoptose gehen und so subtile Verminderungen der DSB-Reparaturkapazität nicht mehr detektiert werden. Doch Ho et al. 2011 konnten weder einen vorherrschenden Verlust von stärker geschädigten Zellen durch eine Kryokonservierung bis zu 4 Wochen noch eine erhöhte Induktion von oxidationsinduzierten DNA-Läsionen in zuvor kryokonservierten Zellen feststellen.

Dies bestätigt Schulers Hypothese (Schuler et al. 2014), dass die Kryokonservierung von Blut-Lymphozyten zwar nicht den Nachweis von tiefgreifenden DSB-Reparaturdefekten verhindert, aber sehr wohl die Erkennung von subtilen DSB-Reparaturverminderungen kompromittieren kann.

In dieser Arbeit kam neben der Kryokonservierung mit der Zellzentrifugation eine weitere Modifikation zur Methodik hinzu. Der Cytopsin, wie schon unter 5.1.3. beschrieben, könnte als weiterer Einflussfaktor auf die genomische Stabilität Auslöser für den Verlust der signifikanten Feststellbarkeit von Unterschieden in der DSB-Reparaturkapazität darstellen.

Rübe CE. et al. 2010 untersuchte 23 Kinder mit Malignom verglichen mit 24 gesunden Kontrollkindern. In der Folgearbeit von Schuler et al. 2014 wurde bereits ein größeres Kollektiv von 41 Kindern mit maligner Erkrankung analysiert. Durch die untersuchungsbedingten Zellverluste minimierte sich die Probandenanzahl dieser Arbeit auf 14 Kinder mit malignem Tumor und 12 gesunden Kontrollkindern. Doch die geringe Fallzahl kann lediglich Hinweise aber kaum eine valide Bestätigung von Hypothesen erreichen. Ferner sorgten Modifikationen im Ablauf und der Methodik für eine Diskrepanz in der signifikanten Detektierbarkeit von Unterschieden in der DSB-Reparaturkapazität.

5.2.2. Vergleich der Reparaturkinetiken für γ H2AX, 53BP1 und ATM

Die antikörperbasierte Markierung von Histonmodifikationen sowie DNA-Reparaturproteinen und Quantifizierung der Foci mittels IFM ermöglichte neue Einblicke in die DNA-Reparatur. Die Bildung und Visualisierung von Foci wurde erstmals für die Histonmodifikation γ H2AX beschrieben (Stiff et al.

5. Diskussion

2004). Da die Phosphorylierung von H2AX im Umfeld eines DSBs eine Vielzahl von Histonmodifikationen umfasst, kann γ H2AX mittels IFM als mikroskopisch sichtbarer Fokus nachgewiesen werden (Rogakou et al. 1991). Die Quantifizierung von γ H2AX-Foci gilt als sehr sensitives Verfahren zur Analyse von DSBs nach der Exposition mit ionisierender Strahlung (Fernandez-Capetillo et al. 2004). Doch nicht nur γ H2AX kann zur Detektion der DSB-Schadensantwort verwendet werden. γ H2AX fungiert als Plattform für DNA-Reparaturfaktoren wie 53BP1 und pATM (Panier und Boulton 2014). Auch 53BP1 kann in der IFM visualisiert werden (Adams und Carpenter 2006), kolokalisiert nach Induktion strahleninduzierter DSBs mit γ H2AX (Harding und Bristow 2012; Rube CE. et al. 2010) sowie pATM (Suzuki et al. 2010) und weist eine vergleichbare Reparaturkinetik wie γ H2AX auf (Rappold et al. 2001). Beucher et al. 2009 konnte eine Kolokalisation von γ H2AX- und pATM-Foci nach der Induktion strahleninduzierter DSBs aufzeigen, welche im zeitlichen Verlauf ebenfalls eine vergleichbare Reparaturkinetik zeigte.

γ H2AX, pATM und 53BP1 wiesen in dem hier untersuchten Patientenkollektiv zu keinem der untersuchten Zeitpunkte oder Strahlendosen signifikant unterschiedliche Foci-Zahlen auf. Eine Diskrepanz in der Größe, Form und Leuchtintensität der Foci innerhalb eines Zellkerns hingegen konnte festgestellt werden, was die objektive Quantifizierung erschwerte. Es zeigte sich jedoch für keinen der untersuchten Reparaturfaktoren eine höhere Sensitivität bezüglich der Foci-Quantifizierung. Auch in den Vorarbeiten der AG Rube wurde von Unterschieden in der Form und Darstellung jedoch auch in der Anzahl an Foci berichtet. So wurde von Schuler et al. 2014 in der unbestrahlten Kontrolle sowie 30 Minuten und 24 Stunden nach der Bestrahlung eine signifikant geringere Anzahl an γ H2AX-Foci im Vergleich zu pATM und 53BP1 quantifiziert. Als mögliche Erklärung wurde ein vermehrtes Hintergrundsignal und eine größere Lichtempfindlichkeit des Fluorochroms mit schnellerem Ausbleichen durch die Lichtquelle für γ H2AX-Foci diskutiert (nicht publiziert). Beide Faktoren könnten eine valide Auszählung beeinflussen und so die verminderte Anzahl quantifizierter Foci erklären. Des Weiteren waren die pATM- und 53BP1-Foci im Vergleich zu γ H2AX-Foci größer. Bei Beucher et al. 2009 wurden hingegen in der G1- und G2-Phase weniger pATM-Foci im Vergleich zu γ H2AX-Foci nachgewiesen. Ursächlich für diese Differenz zeigte sich dort jedoch ein schwächeres Fluoreszenzsignal der pATM-Foci im Vergleich zu γ H2AX-Foci.

Da alle 3 Reparaturfaktoren trotz individueller Unterschiede in der Darstellung den Foci-Verlust über die Reparaturzeit solide darstellen, können sie gleichermaßen zur Untersuchung der DNA-Schadenskinetik verwendet werden.

5.3. Schlussfolgerung

In diese Arbeit konnten 14 Kinder mit maligner Erkrankung analysiert werden. Hiervon litten 4 an einer Leukämie. Bei einer solch geringen Fallzahl lässt sich trotz getrennter Betrachtung der Malignome gesamt und solider Tumore unter Ausschluss von Leukämien ein Einfluss proliferierender Lymphoblasten im peripheren Blut auf die DSB-Reparaturkapazität bei Lymphozyten nicht sicher ausschließen. Ferner zeigte sich durch Veränderungen der Methodik, dass die Kryokonservierung von Blut-Lymphozyten die Erkennung einer subtilen DSB-Reparaturdefizienz kompromittiert und die Auswertung der DSB-Reparaturkinetik beeinflussen kann. Auch der Einschluss von Kindern mit Syndromen, welche einen bekannten Defekt in der DNA-Reparatur und damit eine erhöhte Tumorwahrscheinlichkeit aufweisen, hat einen relevanten stochastischen Einfluss beim Vergleich der DSB-Reparaturkinetik von Kindern mit maligner Erkrankung und gesunden Kontrollkindern. So sollten in gesonderten Untersuchungen mit großer Fallzahl zunächst die Einflüsse von zirkulierenden proliferierenden Lymphoblasten im peripheren Blut bei Leukämie und der Kryokonservierung im Vergleich zu direkter Bearbeitung frischer Zellen auf die DSB-Reparaturkinetik geklärt werden. Hiernach und unter Ausschluss bekannter familiärer Syndrome mit verminderter DNA-Reparaturkapazität kann ein erneuter Vergleich einer großen Patientenzahl von Kindern mit Malignom und gesunden Kontrollen angestrebt werden um Unterschiede in der Anzahl der Foci und somit DSB-Reparaturkinetik nachzuweisen.

Sollte der Cytospin als eine Option zur Zellzentrifugation mit ihren Vorteilen weiterhin zur Sedimentation verwendet werden, muss zunächst in Studien untersucht werden, inwieweit zentrifugierte Zellen durch die mechanische Belastung beeinflusst werden. Der damit einhergehende Einfluss auf den Zellkern und damit auch möglicherweise auf die DSB-Reparaturkapazität müssen zuvor ausführlich analysiert werden.

All diese Faktoren stellen mögliche Ursachen dafür dar, dass in dem hier untersuchten, neuen Patientenkollektiv kein Hinweis mehr auf den Zusammenhang von verminderter DSB-Reparaturkapazität und einer malignen Tumorerkrankung hergestellt werden konnte.

Problematisch ist zudem die fehlende objektive und im Idealfall automatisierte Quantifizierung der Foci. Überschneidungen von Fluoreszenzen räumlich naher Foci bei Verwendung von Strahlendosen ab 2 Gy wie auch die variable Größe und Leuchtintensität der Foci stellen hier Probleme dar. Vollautomatische Bildanalysesysteme könnten mit ihren mathematischen Filtern eine hilfreiche Alternative zur subjektiven, betrachterabhängigen Auswertung darstellen (Böcker und Iliakis 2006) und sogar eine Vergleichbarkeit der Daten aus unterschiedlichen Laboren ermöglichen (Redon et al. 2008; Scherthan et al. 2008).

Alternativ zur IFM steht mit der TEM eine innovative Methode zur Untersuchung von DSBs und DNA-Reparaturkinetik mit wesentlich höherem Auflösungsvermögen zur Verfügung. Mit Hilfe von

5. Diskussion

goldmarkierten Antikörpern können sogar einzelne DSB-Reparaturproteine wie zum Beispiel phosphoryliertes Ku70 mittels TEM im Kontext des Chromatins visualisiert werden (Lorat et al. 2012). In der IFM ist es hingegen nur möglich Reparaturproteine zu visualisieren, die in großer Anzahl im Umfeld eines DSBs akkumulieren und hierdurch einen deutlich sichtbaren Fokus erzeugen, während sich die Fluoreszenz einzelner Proteine im Hintergrundsignal verliert. So stellt die Visualisierung goldmarkierter Reparaturfaktoren mittels TEM möglicherweise die Zukunft der DNA-Schadensanalyse dar.

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Name	Seite
1	Schematische Darstellung möglicher DNA-Schäden (aus Kauffmann S., Sauer R., Weber W.: Bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Strahlenschutz. Urban und Fischer Verlag. 2011)	10
2	NHEJ (modifizierte Darstellung. Ursprüngliche Abbildung von Dueva R., Iliakis G.: Alternative pathways of non-homologous end joining in genomic instability and cancer. Translational Cancer Research 2013; Vol. 2, No. 3.)	12
3	Homologe Rekombination (modifizierte Darstellung. Ursprüngliche Abbildung aus http://docplayer.org/30789841-Klinische-strahlenbiologie.html)	13
4	Cytospin (http://www.labotec.co.za/product/cytospin-cytocentrifure)	19
5	Zentrifugationscontainer, sogenannte Cytofunnels. (a) Objektträger, (b) Filterpapier, (c) Cytofunnel, (d) Cytoclip zur Fixierung des Objektträgers (http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_24579.pdf)	20
6	Veranschaulichung der Quantität der isolierten Lymphozyten. Gegenüberstellung der beiden Auftragungsmethoden vor und nach dem Färbeprozess	20
7	Aufnahme einer Schnittebene der Bestrahlungsplanung innerhalb des Planungsprogrammes Pinnacle Version 9.0 mit den farbig dargestellten Isodosen. Die 100%-Isodose (rot) befindet sich oberhalb des Bodens der Zellkulturflasche und umschließt somit die Lymphozyten	27
8	Repräsentative Aufnahmen strahleninduzierter Foci der Reparaturproteine γ H2AX, 53BP1 und pATM (grün) an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung in DAPI-markierten Zellkernen (blau)	33
9	Darstellung der quantifizierten Foci pro Zelle für γ H2AX, pATM und 53BP1. Verglichen wurden Patienten mit malignen Tumoren und gesunden Kontrollprobanden pro Strahlendosis und Zeitpunkt	34
10	Exemplarische Darstellung der Reparaturkinetik für 53BP1-Foci jeweils 30 Minuten, 8 und 24 Stunden nach der Bestrahlung. Verglichen wurden Probanden mit malignen Tumoren mit der gesunden Referenzgruppe	35
11	Darstellung der quantifizierten Foci pro Zelle für γ H2AX, pATM und 53BP1. Verglichen wurden Patienten mit Malignomen gesamt, solide	37

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

	Malignome und gesunden Kontrollprobanden pro Strahlendosis und Zeitpunkt	
12	Darstellung der quantifizierten Foci pro Zelle bei Patienten mit malignen Tumoren und gesunden Kontrollprobanden. Verglichen wurden drei unterschiedliche Reparaturproteine pro Strahlendosis und Zeitpunkt	38
13	Variabilität der Größe und Leuchtintensität der γ H2AX-Foci in einem Lymphozyt 8 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy	43
14	Ausgefränkter Zellkern eines Lymphozyten 8 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy Färbung mit γ H2AX	45

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Name	Seite
1	Tabelle der Charakteristika der Probanden mit malignen Tumoren	31-32
2	Zusammenhang des spezifischen Untersuchungszeitpunktes nach der Bestrahlung der Lymphozyten mit der verwendeten Strahlendosis der Proben	32
3	Mittelwert und Standardfehler der γ H2AX-Foci aller Kinder mit maligner Erkrankung (= Malignome gesamt), soliden Malignome und gesunden Kontrollkinder zum direkten Vergleich	35
4	Mittelwert und Standardfehler der pATM-Foci aller Kinder mit maligner Erkrankung (= Malignome gesamt), soliden Malignome und gesunden Kontrollkinder zum direkten Vergleich	36
5	Mittelwert und Standardfehler der 53BP1-Foci aller Kinder mit maligner Erkrankung (= Malignome gesamt), soliden Malignome und gesunden Kontrollkinder zum direkten Vergleich	36
6	Darstellung der Häufigkeiten der Tumorentitäten der untersuchten Kinder im Vergleich zu den Daten des DKKR vom Jahresbericht 2018	40
7	FAB-Klassifikation der ALL (aus Bennett JM., Catovsky D., Daniel MT., Flandrin G., Galton DA., Gralnick HR., Sultan C.: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976; 33(4): 451-8)	41
8	Vergleich der unterschiedlichen Methoden-Merkmale und des Ablaufes aller 3 Arbeiten	46

6.3. Literaturverzeichnis

Adams MM, Carpenter PB (2006): Tying the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1. *Cell Div.* 31:1-19

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (eds) (2005): *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Bakkenist CJ, Kastan MB (2003): DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421(6922):499-506

Ball LG, Xiao W (2005): Molecular basis of ataxia teleangiectasia and related diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 26: 897-907

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y (1998): Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281(5383):1674-1677

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

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 33(4):451-458

Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA, Löbrich M (2009): ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* 28(21):3413–3427

Böcker W, Iliakis G (2006): Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells. *Radiat Res.* 165 (1):113-124

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001): ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 276(45):42462-4267

Canman CE, Lim DS (1998): The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene* 17(25):3301-3308

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

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

Chen DJ, Davis AJ (2013): DNA Double Strand Break Repair via Non-Homologous End-Joining. *Translational cancer research* 130–143

Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA (2008): Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncol.* 47(5):809-824

Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J (2005): gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA doublestrand break repair. *Mol. Cell.* 20(5):801-809

Cleaver JE (2011): γ H2AX: biomarker of damage or functional participant in DNA repair “all that glitters is not gold!” *Photochem. Photobiol.* 87:1230–1239

Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ (1999): Requirement of ATM-dependent phosphorylation of BRCA1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286(5442):1162-1166

Critchlow SE, Jackson SP (1998): DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci.* 10:394-398

Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH (2008): Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet.* 49(4):383-396

Dimitrova N, Chen YCM, Spector DL, de Lange T (2008): 53BP1 promotes Non-Homologous-End-Joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* 456:524–528

Domogala A, Madrigal JA, Saudemont A (2016): Cryopreservation has no effect on function of natural killer cells differentiated in vitro from umbilical cord blood CD34(+) cells. *Cytotherapy* 18(6):754-759

Downey M, Durocher D (2006): gamma H2AX as a Checkpoint Maintenance Signal. *Cell Cycle* 5(13):1376-1381

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

Eliezer Y, Argaman L, Rhie A, Doherty AJ, Goldberg M (2009): The direct interaction between 53BP1 and MDC1 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of damage. *J. Biol Chem.* 284:426–435

Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004): H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* 3(8-9): 959-967

FitzGerald JE, Grenon M, Lowndes NF (2009): 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem Soc Trans.* 37:897–904

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, Lindahl T, Lowndes N, Sarasin A, Wood RD (2006): DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* 5:986-996

Gerthsen C, Vogel H (eds) (1995): *Physik*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg

Goodhead DT (1994): Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol.* 65(1):7-17

Gruppen C (ed) (2008): *Grundkurs Strahlenschutz: Praxiswissen für den Umgang mit radioaktiven Stoffen*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg

Gutjahr P (ed) (2004): *Krebs bei Kindern und Jugendlichen: Klinik und Praxis der Pädiatrischen Onkologie*. Deutscher Ärzte Verlag, Köln

Harding SM, Bristow RG (2012): Discordance between phosphorylation and recruitment of 53BP1 in response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 11:1432– 1444

Ho CK, Choi SW, Siu PM, Benzie IF (2011): Cryopreservation and storage effects on cell numbers and DNA damage in human lymphocytes. *Biopreserv Biobank* 9(4):343-347

Ichino Y, Ishikawa T (1985): Effects of cryopreservation on human lymphocyte functions: comparison of programmed freezing method by a direct control system with a mechanical freezing method. *J Immunol Methods* 77(2):283-290

Iwabuchi K, Basu BP, Kysela B, Kurihara T, Shibata M, Guan D, Cao Y, Hamada T, Imamura K, Jeggo PA, Date T, Doherty AJ (2003): Potential role for 53BP1 in DNA end-joining repair through direct interaction with DNA. *J. Biol Chem.* 278:36487–36495

Jackson SP (2002): Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23(5):687-696

Jeggo P, Löbrich M (2006): Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry* 122(1-4):124-127

Kauffmann S, Sauer R, Weber W (eds) (2011): *Bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Strahlenschutz*. Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH, München

Khanna KK, Jackson SP (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 27:247-254

Kinderkrebsregister D (2018): *Jahresbericht Annual Report 2018 (2009-2017)*. Deutsches Kinderkrebsregister DKKR German Childhood Cancer Registry GCCR

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

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

Koch E, Larak M, Ellendorff F (1991): Comparative studies on in vitro reactivity of fresh and cryopreserved pig lymphocytes. *Cyrobiology* 28(5):405-412

Lavin MF (2008): Ataxia-teleangiectasia: From a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:759-769

Lee JH, Goodarzi AA, Jeggo PA, Paull TT (2010): 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *EMBO J.* 29(3):574–585

Lee JH, Paull TT (2005): ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308(5721):551-554

Li X, Heyer WD (2008): Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 18(1):99-113

Li L, Zou L (2005): Sensing, signaling and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. *J. Cell Biochem.* 94:298-306

Lieber MR (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 79:181-211

Löbrich M, Jeggo PA (2005): Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair* 4:749-759

Lorat Y, Schanz S, Schuler N, Wennemuth G, Rube C, Rube CE (2012): Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS One* 7:e38165

Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, Lerenthal Y, Jackson SP, Bartek J, Lukas J (2004): Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J.* 23(13):2674–2683

Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC (2010): gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24:679–686

Mailand N, Bekker-Jensen S, Faustrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J (2007): RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131:887-900

Mazin AV, Alexeev AA, Kowalczykowski SC (2003): A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *J. Biol Chem.* 278(16):14029-14036

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

McKinnon PJ (2012): ATM and the molecular pathogenesis of ataxia teleangiectasia. *Annu Rev Pathol.* 7:303-321

McManus KJ, Hendzel MJ (2005): ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 16(10):5013-5025

Merkle D, Douglas P, Moorhead GB, Leonenko Z, Yu Y, Cramb D, Bazett-Jones DP, Lees-Miller SP (2002): The DNA-dependent protein kinase interacts with DNA to form a protein-DNA complex that is disrupted by phosphorylation. *Biochemistry* 41(42):12706-12714

Mladenov E, Iliakis G (2011): Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res.* 711(1-2):61-72

Nikjoo H, O'Neill P, Goodhead DT, Terrissol M (1997): Computational modelling of low energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *Int J Radiat Biol.* 71(5):467-483

Panier S, Boulton SJ (2014): Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:7–18

Papillo JL, Lapen D (1994): Cell Yield, ThinPrep versus cytocentrifuge. *Acta Cytol.* 38:33–36

Possinger K, Regierer AC (edS) (2006): *Facharzt Hämatologie, Onkologie.* Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH, München

Powell S, McMillan TJ (1990): DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiother Oncol.* 19(2):95-108

Prokopcova J, Kleibl Z, Banwell CM, Pohlreich P (2007): The role of ATM in breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat.* 104(2):121-128

Pui CH, Relling MV, Downing JR (2004): Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 350(15):1535-1548

Rappold I, Iwabuchi K, Date T, Chen JJ (2001): Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53Bp1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *Journal of Cell Biology* 154:469

Rathert P, Roth S (2007): *Urinzytologie. Praxis und Atlas.* Springer Verlag, Berlin Heidelberg

Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA (2008): gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood. *Adv Space Res.* 43(8):1171-1178

Robb J, Metello C, Odom C (1996): Comparison of Cyto-Shuttle and Cytocentrifuge as processing methods for nongynecologic cytology specimens. *Diagn Cytopathol.* 14(4):305–309

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2008): Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Auflage

Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK (eds) (2008): Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie. Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH, München

Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1991): Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo. *J. Cell Biol.* 146(5):905–916

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

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

Rübe CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kühne M, Fleckstein J, Gräber S, Graf N, Rübe C (2010): DNA Repair Alterations in Children with Pediatric Malignancies: Novel Opportunities to identify Patients at Risk for High-Grade Toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 78(2):359-369

Rübe CE, Fricke A, Widmann TA, Fürst T, Madry H, Pfreundschuh M, Rübe C (2011): Accumulation of DNA Damage in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells During Human Aging. *PLoS One.* 6(3):e17487

San Filippo J, Sung P, Klein H (2008): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem.* 77:229-257

Scherthan H, Hieber L, Braselmann H, Meineke V, Zitzelsberger H (2008): Accumulation of DSBs in gamma-H2AX domains fuel chromosomal aberrations. *Biochem Biophys Res Commun.* 371(4):694-697

Schlegel BP, Jodelka FM, Nunez R (2006): BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation. *Cancer Res.* 66:5181-5189

Schuler N, Palm J, Kaiser M, Betten D, Furtwängler R, Rübe C, Graf N, Rübe CE (2014): DNA-damage foci to detect and characterize DNA repair alterations in children treated for pediatric malignancies. *PLoS One* 9(3):e91319

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. *J. Cell Biol.* 151(7):1381-1390

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

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE (2004): Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood*. 103(4):1202-1210

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

Shroff R, Arbel-Eden A, Pilch D, Ira G, Bonner WM, Petrini JH, Haber JE, Lichten M (2004): Distribution and Dynamics of Chromatin Modification Induced by a Defined DNA Double-Strand Break. *Curr Biol*. 14(19):1703–1711

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

Streffer C. (1969): *Strahlen-Biochemie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg

Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J (2000): Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry* 39:8026-8031

Suzuki K, Takahashi M, Oka Y, Yamauchi M, Suzuki M, Yamashita S (2010): Requirement of ATM-dependent pathway for the repair of a subset of DNA double strand breaks created by restriction endonucleases. *Genome Integr*. 1:4

Tsang M, Gantchev J, Ghazawi FM, Litvinov IV (2017): Protocol for adhesion and immunostaining of lymphocytes and other non-adherent cells in culture. *Biotechniques* 63(5):230-233

Turinetto V, Giachino C (2015): Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res*. 43(5):2489–2498

Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ (2002): 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298:1435–1438

Ward IM, Minn K, Jorda KG, Chen J (2003): Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J. Biol Chem*. 278:19579–19582

Ward JF (1988): DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 35:95-125

Weterings E, Chen DJ (2008): The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res*. 18(1):114-124

Wildemann B, Reiber H, Oschmann P (eds) (2006): *Neurologische Labordiagnostik*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart New York

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

Zgheib O, Huyen Y, DiTullio RA Jr, Snyder A, Venere M, Stavridi ES, Halazonetis TD (2005): ATM signaling and 53BP1. *Radiother Oncol* 76:119–122

6.4. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
γ H2AX	phosphoryliertes H2AX
μ l	Mikroliter
53BP1	p53 bindendes Protein 1
5-MP	5-Mercaptopurin
6-MP	6-Mercaptopurin
6-TG	Thioguanin
ADR	Adriamycin
AG	Arbeitsgruppe
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AraC	Cytarabin
AT	Ataxia Teleangiectasia
ATM	Ataxia-Teleangiectasia-mutated Proteinkinase
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BLM	Bleomycin
BRCA1	Breast Cancer gene 1
BRCA2	Breast Cancer gene 2
BRCT	BRCA1 Domänen
CBDCA	Carboplatin
CCNU	Lomustin
CDDP	Cisplatin
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CPM	Cyclophosphamid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DACT	Actinomycin D
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DKKR	Deutsches Kinderkrebsregister
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	DNA-abhängige Proteinkinase
DNR	Daunorubicin
DOX	Doxorubicin
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DTIC	Dacarbazin

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

EPI	Epirubicin
ESB	DNA-Einzelstrangbruch
F	female = weiblich
FAB	French-American-British
FCS	Fetales Kalbserum
GAR	Glycin/Arginin-reiche Region
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
Gy	Gray
h	Stunde
HR	Homologe Rekombination
IDA	Idarubicin
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
IFO	Ifosfamid
IgG	Immunglobulin G
IRIF	ionising radiation induced foci
J	Joule
kg	Kilogramm
L-PAM	Melphalan
M	male = männlich
M.	Morbus
MBp	Megabasenpaare
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
min	Minute
mm	Millimeter
ml	Milliliter
MTX	Methotrexat
MV	Megavolt
NHEJ	Non-homologes End-Joining
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NS	Normalserum Ziege
p53	Protein 53
pATM	phosphoryliertes ATM
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCB	Procarbazin
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese

6. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIKK	Phosphatidylinositol-Kinase-ähnlichen-Kinasen
PNS	Peripheres Nervensystem
RIF	radiation-induced foci
RNF8	RING-finger ubiquitin Ligase 8
RPA	Replikationsprotein A
rpm	Rounds per minute
RPMI	Medium Roswell Park Memorial Institute
SN-38	Irinotecan
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFF	Trofosamid
TMZ	Temozolomid
TOPO	Topotecan
VCR	Vincristin
VDS	Vindesin
VP-16	Etoposid
VRL	Vinorelbin
WHO	World-Health-Organization
XLF	XRCC4-like factor
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4
ZNS	Zentrales Nervensystem

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Homburg (Saar) *Herrn Prof. Dr. med. Ch. Rübe* und der Leiterin des Labors für molekulare Radioonkologie des Universitätsklinikums Homburg (Saar) *Frau Prof. Dr. med. C. E. Rübe* für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit als Medizinstudentin in einem experimentellen Umfeld tätig zu sein.

Dem *Hämato-onkologische Labor der Klinik für Innere Medizin M1* der Universitätsklinik des Saarlandes möchte ich für die angenehme und hilfreiche Zusammenarbeit in ihrem Labor bei der Zytozentrifugation danken.

Bei *Daniela Ludwig* möchte ich mich für die Einarbeitung in das experimentelle Prozedere bedanken.

Dr. Stefanie Schanz danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung während meiner Zeit im Labor.

Bei *Dr. rer. nat. Nadine Schuler* möchte ich mich für die Durchsicht der Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt *Dr. rer. med. Yvonne Lorat*. Mit ihrer unermüdlichen Unterstützung beim Schreiben der Arbeit stand sie immer an meiner Seite und war die beste vorstellbare emotionale Begleitung während der gesamten Zeit. Ihre Geduld und Mühe ist mit Gold nicht aufzuwiegen.

Meiner Familie danke ich für die wundervolle Unterstützung während meines Studiums und in meinem gesamten Leben.

Ein besonderer Dank gilt *meinem Lebenspartner Alexander*, der während der experimentellen Phase und insbesondere in der Zeit des Schreibens geduldig an meiner Seite stand.

8. Lebenslauf

8. Lebenslauf

Name Julia Kathrin Feldle

Adresse

Geburtsort

Geburtsdatum

Schulbildung

Studium

Berufstätigkeit

Zusatzbezeichnung