

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

**Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in murinen Organgeweben nach  
fraktionierter Bestrahlung**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von: Annika Birte Stützel

geb. am: 24.08.1985 in Filderstadt

Tag der Promotion:

Dekan:

Prüfungsvorsitz:

1. Prüfer:

2. Prüfer:

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1 Zusammenfassung/ Summary</b>	<b>- 5 -</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>- 7 -</b>
<b>2.1 DNA-Doppelstrangbrüche</b>	<b>- 7 -</b>
2.1.1 Strahlenbiologische Grundlagen	- 7 -
2.1.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	- 8 -
<b>2.2 Ataxia teleangiectasia</b>	<b>- 12 -</b>
2.2.1 Molekulare Grundlagen der DNA-Schadensantwort	- 12 -
2.2.2 Klinisches Bild	- 16 -
<b>2.3 Klinische Strahlentherapie</b>	<b>- 18 -</b>
2.3.1 Grundlagen der Strahlentherapie	- 18 -
2.3.2 Strahlenbiologie von Normalgeweben	- 19 -
<b>2.4 Ziele der Arbeit</b>	<b>- 21 -</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>- 22 -</b>
<b>3.1 Mausstämme</b>	<b>- 22 -</b>
<b>3.2 Bestrahlung der Versuchstiere</b>	<b>- 22 -</b>
<b>3.3 Gewebegewinnung</b>	<b>- 25 -</b>
<b>3.4 Immunfluoreszenzfärbung</b>	<b>- 26 -</b>
3.4.1 Prinzip	- 26 -
3.4.2 $\gamma$ -H2AX-Färbung	- 26 -
3.4.3 $\gamma$ -H2AX/ 53BP1-Doppelfärbung	- 28 -
<b>3.5 Quantifizierung der Foci</b>	<b>- 28 -</b>
<b>3.6 Genotypisierung</b>	<b>- 29 -</b>
<b>3.7 Statistische Auswertung</b>	<b>- 30 -</b>

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>- 31 -</b>
4.1 Quantifizierung von $\gamma$ -H2AX-Foci	- 31 -
4.2 Einzeitbestrahlung	- 32 -
4.3 Fraktionierte Bestrahlung	- 37 -
<b>5 Diskussion</b>	<b>- 41 -</b>
5.1 Betrachtungen zur Methodik	- 41 -
5.2 Diskussion der Versuchsergebnisse	- 43 -
5.3 Ergebnisse im Kontext der Literatur	- 44 -
5.3.1 Bestrahlung von ATM <sup>+/-</sup> -Mäusen	- 44 -
5.3.2 Normalgewebsreaktionen	- 45 -
5.3.3 Organspezifische Unterschiede	- 47 -
5.4 Zusammenfassung und Ausblick	- 48 -
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>- 49 -</b>
<b>7 Publikationen/ Dank</b>	<b>- 57 -</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>- 58 -</b>
<b>9 Lebenslauf</b>	<b>- 59 -</b>

## Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53-binding protein 1
AFP	Alpha-Fetoprotein
APLF	Aprataxin- and PNF-like factor
AT	<i>Ataxia teleangiectasia</i>
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia</i> mutated
ATP	5'-Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia teleangiectasia</i> related
bp	Basenpaare
BRCA1	Breast cancer susceptibility protein-1
CDC2	Cell division control-2
CHK2	Checkpoint Kinase-2
CT	Computertomographie
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	DNA-abhängige Proteinkinase (catalytic subunit)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSB	Doppelstrangbruch
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
Gy	Gray
HR	Homologe Rekombination
IgG	Immunglobulin G
IRIF	Ionizing radiation induced foci
KAP-1	Krüppel-associated box (KRAB)-associated protein (KAP)-1
kDa	Kilodalton
LMDS	Locally multiply damage site
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint protein 1
MeV	Megaelektronenvolt
MRN	Mre11-Rad50-NBS1
NHEJ	Nicht-homologes End-joining
PBS	Phosphate buffered saline (Puffer)

PBS/NS	Puffer mit Normalserum
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PIKK	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase ähnliche Kinasen
PIKK	Phosphoinositol-Kinase ähnliche Kinase
RAG1/RAG2	Recombination activating gene-1/-2
RNF8	RING-Finger ubiquitin ligase
rpm	rounds per minute
rs-SCID	Radiosensitive - severe combined immunodeficiency
SCID	Severe combined immunodeficiency
SMC1	Structural maintenance of chromosomes protein-1
TxRed	Texas Red
V(D)J	V - variable, D - diversifying, J - joining
WRN	Werner Protein
XLF	X-like-factor
XRCC4	X-ray-complementing Chinese hamster gene 4

Des Weiteren wurden die üblichen Abkürzungen des SI-Einheiten-Systems verwendet.

## 1 Zusammenfassung/ Summary

### Zielsetzung:

Eine fraktionierte Bestrahlung verursacht bei 5-10 % der Patienten schwere Normalgewebstoxizitäten, die die Therapiedauer und damit den Behandlungserfolg limitieren. Als Ursache von individuellen Unterschieden der Strahlensensitivität werden zunehmend genetische Faktoren diskutiert, die an der Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) beteiligt sind. In einem murinen *in vivo* Modell sollte der Einfluss genetisch determinierter DSB-Reparaturdefekte auf kumulative DNA-Schäden nach fraktionierter Bestrahlung untersucht werden.

### Material und Methoden:

Untersucht wurden Mäuse mit definierten Reparaturdefekten ( $ATM^{+/-}$  heterozygot;  $SCID^{-/-}$  homozygot) sowie reparaturprofiziente Wildtypmäuse ( $ATM^{+/+}$  homozygot). Zunächst erfolgte eine Einzeitbestrahlung mit 2 Gy, in einem zweiten Versuchsansatz eine fraktionierte Bestrahlung bis zu einer Gesamtdosis von 5 x 2 Gy. Zu definierten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurden ein früh- (Dünndarm) und ein spät-reagierendes (Herz) Organgewebe entnommen und durch Auszählen von  $\gamma$ -H2AX-Foci, die der Darstellung von DSB dienen, ausgewertet.

### Ergebnisse:

In reparaturdefizienten  $SCID^{-/-}$ -Mäusen zeigte sich im Laufe der fraktionierten Bestrahlung eine deutliche Akkumulation strahleninduzierter DSB. Der geringe Reparaturdefekt von  $ATM^{+/-}$ -Mäusen wurde nach Einzeitbestrahlung nicht nachgewiesen, führte aber nach fraktionierter Bestrahlung, verglichen mit reparaturprofizienten  $ATM^{+/+}$ -Mäusen, zu einer überproportionalen Anhäufung unreparierter DSB. Hinsichtlich der Reparaturkapazitäten konnten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Organgeweben festgestellt werden.

### Schlussfolgerung:

Sowohl in früh- als auch in spät-reagierenden Geweben akkumulieren strahleninduzierte DSB nach fraktionierter Bestrahlung, wobei das Ausmaß der Akkumulation vom Genotyp und dem daraus resultierenden DSB-Reparaturdefekt abhängt. Somit können auch kleine, genetisch determinierte Reparaturdefekte zu einer starken Anhäufung von DNA-Schäden führen und damit schwere Normalgewebstoxizitäten verursachen.

## **Repair of DNA double-strand breaks in murine tissues after fractionated irradiation**

### Purpose:

About 5-10 % of all patients develop severe normal tissue toxicities during the course of fractionated irradiation, which limit therapeutic effectiveness. There is increasing evidence that individual differences in radiosensitivity are caused by genetic factors participating in recognition and repair of DNA double-strand breaks. In this murine *in vivo* model, we analyzed the impact of genetically determined DSB repair defects on the cumulative DNA damage after fractionated irradiation.

### Material and methods:

Mice with defined repair defects ( $ATM^{+/-}$  heterozygous;  $SCID^{-/-}$  homozygous) as well as repair proficient mice ( $ATM^{+/+}$  homozygous) were either irradiated with a single dose of 2 Gy or treated by fractionated irradiation (5 x 2 Gy). At specific time intervals after irradiation, one early-responding (small intestine) and late-responding tissue (heart) was analyzed by counting  $\gamma$ -H2AX foci, which represent DSBs.

### Results:

Repair-deficient  $SCID^{-/-}$  mice showed a distinct accumulation of radiation-induced DSBs after fractionated irradiation. After single dose treatment, no significant difference between  $ATM^{+/-}$  and  $ATM^{+/+}$  mice was detectable, whereas the subtle repair defect of  $ATM^{+/-}$  led to an excess of unrepaired DSBs after fractionated irradiation. There were no differences in repair capacities observed between both analyzed tissues.

### Conclusion:

In the present study we could demonstrate an accumulation of radiation-induced DSBs after fractionated irradiation in both early- and late-responding tissues. The extent of accumulation depends on the genetic background and the resultant repair defect. Even minor, genetically determined repair defects lead to pronounced DNA damage accumulation and may therefore cause individual radiotoxicities of adjacent normal tissues after fractionated irradiation.

## 2 Einleitung

### 2.1 DNA-Doppelstrangbrüche

#### 2.1.1 Strahlenbiologische Grundlagen

Die Integrität der Desoxyribonukleinsäure (DNA), Träger der Erbinformation, ist ein essentieller Bestandteil für die Lebensfähigkeit einer Zelle. Unter physiologischen Bedingungen treten allerdings ständig Schäden an der DNA auf.

Ein Auslöser für verschiedenste Formen von DNA-Schäden ist ionisierende Strahlung. Der Begriff „ionisierende Strahlung“ umfasst Teilchenstrahlung (z.B. Elektronen, Protonen,  $\alpha$ -Teilchen) und elektromagnetische Strahlung, die ihrerseits abhängig von Herkunft und Wellenlänge in Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung unterteilt wird. Stellt man sich energiereiche, elektromagnetische Strahlung als Photonen-Strom vor, so kann jedes Photon eine Ionisation hervorrufen. Abhängig von ihrer Energie führen Photonen zu verschiedenen Effekten in der bestrahlten Materie. Der Compton-Effekt wird durch hochenergetische Röntgenstrahlung ausgelöst. Dabei schlägt ein Photon ein Elektron aus der Hülle eines Atoms. Das Photon gibt dabei einen Teil seiner Energie an dieses Elektron ab und wird von seiner Bahn abgelenkt. Es kann, genauso wie das freigesetzte Elektron, das Sekundärelektron, weitere Ionisationen auslösen. Niederenergetischere Röntgenstrahlung führt meist zum photoelektrischen Effekt. Dabei gibt das Photon seine gesamte Energie an ein kernnahes Elektron des absorbierenden Atoms ab. Dieses Elektron kann nun, mit etwas geringerer Energie als das Photon, als Sekundärelektron weitere Ionisationen bewirken. Hat ein Photon eine Energie von mindestens 1,022 MeV, was der doppelten Ruheenergie eines Elektrons bzw. Positrons entspricht, so kann es zur Paarbildung kommen. Dabei entstehen im elektrischen Feld eines Atomkerns aus einem Photon ein Elektron und ein Positron. Man spricht von einer „Materialisierung“ des Photons.

Die biologischen Effekte ionisierender Strahlung beruhen u.a. auf einer Interaktion mit der DNA. Direkte Ionisationen an der DNA führen direkt zu chemischen Veränderungen. Indirekte Ionisationen werden häufiger durch elektromagnetische Strahlen als durch Teilchenstrahlen ausgelöst. Entstandene Sekundärelektronen können dabei über die Bildung von Hydroxylradikalen aus Wasser die DNA schädigen.

Radikale sind hochreaktiv und haben eine geringe Reichweite, sodass lokale Anhäufungen von Hydroxylradikalen zu multiplen DNA-Schäden (Basenschäden, Schäden des Zucker-Phosphat-Gerüsts) führen, die als *Locally multiply damaged sites* (LMDS) bezeichnet werden. Ein Beispiel für eine LMDS ist ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB), bei dem das Zucker-

Phosphat-Gerüst beider Stränge im Bereich von 10 bp durch Radikale oder direkte Ionisierung beschädigt wird. DSB können allerdings nicht nur durch ionisierende Strahlung und andere exogene Agenzien (Chemotherapeutika, Chemikalien), sondern auch im Rahmen endogener Prozesse (Replikationsvorgänge, V(D)J-Rekombination) entstehen (Khanna und Jackson, 2001; van Gent *et al.*, 2001). Obwohl die DSB dabei durch spezifische Enzyme (RAG1 und RAG2 bei der V(D)J-Rekombination) gezielt induziert werden, scheint die Ligation dieser Brüche über die gleichen Reparaturwege zu erfolgen, die bei strahleninduzierten DSB von Bedeutung sind.

Bleiben DSB für längere Zeit unrepariert, so können dauerhafter Zellzyklusarrest, Induktion von Apoptose oder mitotischer Zelltod resultieren (Olive, 1998; Engels *et al.*, 2007). Werden sie fehlerhaft repariert, so kann dies zu direkt induzierten oder verzögerten chromosomalen Umlagerungen führen und damit die Karzinogenese begünstigen (Morgan *et al.*, 1998; Hoeijmakers, 2001). Aufgrund dieser für die Zelle bzw. den Organismus fatalen Konsequenzen stellen DSB die schwerwiegendste Form von DNA-Schäden dar.

Des Weiteren kann ionisierende Strahlung aber auch einfache Basenschäden, Basenfreisetzungen, Protein-DNA-Verbindungen und Einzelstrangbrüche hervorrufen. Immer richten sich dabei die Effekte der Strahlung unter anderem nach der Dosis, die definiert ist als absorbierte Energie pro Masse und in der Einheit Gy (Gray) angegeben wird (1 Gray=1 J/kg). Die Bestrahlung mit 1 Gy führt pro Zelle zu ca.  $10^5$  Ionisierungen, 1000-2000 Einzelstrangbrüchen und 40 DSB (Connell und Hellman, 2009). Der Effekt der Strahlung in Abhängigkeit von der Dosis wird in sogenannten Dosis-Effekt-Kurven dargestellt. Abhängig von der jeweiligen Strahlenart kommt es mit zunehmender Dosis zu einem linearen bzw. linear-quadratischen Anstieg an chromosomalen Aberrationen (Lloyd *et al.*, 1976).

### 2.1.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Reparatur von DSB erfolgt in Säugetierzellen hauptsächlich über zwei verschiedene Reparaturmechanismen: das Nicht-homologe End-joining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) (Kobayashi *et al.*, 2008; van Gent *et al.*, 2001). Das NHEJ benötigt nur sehr begrenzte bzw. keine Sequenzhomologien und läuft daher in allen Zellzyklusphasen ab (Rothkamm *et al.*, 2003). Die homologe Rekombination dagegen ist auf das Vorliegen eines Schwesterchromatids angewiesen und findet daher nur in der späten S- bzw. G2-Phase statt (Wyman und Kanaar, 2006). In der Literatur wird sie oft als fehlerfreier

Reparaturmechanismus bezeichnet, weil, im Gegensatz zum NHEJ, ein direktes Ablesen der Sequenz am homologen Schwesterchromatid erfolgt. Die HR findet vor allem in der frühen embryonalen Entwicklung statt, wenn ein fehlerfreies Ablesen zur Erhaltung der exakten genomischen Information notwendig ist (Orii *et al.*, 2006).

Beide Mechanismen wurden während der Entwicklung von Eukaryoten hochkonserviert. Sie dienen gleichermaßen, wenn auch mit unterschiedlichen Reparaturproteinen (O'Driscoll und Jeggo, 2006), der Erhaltung der genomischen Integrität. In Hefen ist aufgrund ihrer Polyploidie die HR der dominierende Reparaturmechanismus von strahleninduzierten DSB (Shrivastav *et al.*, 2008). In Säugetierzellen kommt, bezogen auf nicht-replikationsassoziierte DSB, dem NHEJ die größere Bedeutung zu (Branzei und Foiani, 2008). Lediglich die während der Replikation bzw. in der G2-Phase auftretenden DSB können mithilfe der HR repariert werden (Löbrich und Jeggo, 2007).

Das NHEJ gilt als fehleranfällig, weil es die DNA-Enden direkt miteinander ligiert. Dabei müssen nicht-ligierbare Enden zuvor prozessiert werden, was zum Verlust von Nukleotiden führen kann. Der Vorgang des NHEJ kann prinzipiell in drei Schritte unterteilt werden (Mahaney *et al.*, 2009): Zunächst wird der DSB erkannt und die Bruchenden zusammengehalten, dann kommt es zur Prozession dieser Enden, wobei beschädigte oder nicht-ligierbare Gruppen entfernt werden. Als letzter Schritt erfolgt die DNA-Ligation (Abb.1).

Beteiligt an diesem Vorgang sind eine Reihe von Schlüsselproteinen, u.a. Ku (Ku 70/80-Heterodimer), DNA-PKcs (katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase), Artemis, XRCC4 (X-ray-complementing Chinese hamster gene 4) und DNA-Ligase IV. Kommt es zur Inaktivierung einzelner dieser Proteine führt dies zu einer deutlichen Strahlensensibilität sowie Defekten in der V(D)J-Rekombination (O'Driscoll und Jeggo, 2006; Meek *et al.*, 2004).

Die Reparatur von DSB mithilfe des NHEJ beginnt mit einer Anlagerung eines Ku-Proteins an ein Bruchende. Ku besteht aus zwei Untereinheiten (Ku70 und Ku80), welche an die Bruchenden binden und diese zusammenhalten (Cary *et al.*, 1997; DeFazio *et al.*, 2002). Es kommt zur Translokation der Ku-Proteine zwischen die DNA-Enden, wodurch diese zugänglich für die Anlagerung von 2 DNA-PKcs-Molekülen sind (Yoo und Dynan, 1999). Dieser Komplex aus DNA-PKcs (nach Anlagerung an Ku als DNA-PK bezeichnet) und Ku soll die Bruchenden vor dem Angriff durch Nukleasen schützen (Mahaney *et al.*, 2009). Die DNA-PKcs ist ein 465 kDa Polypeptid, bestehend aus über 4000 Aminosäuren, und gehört

zur Familie der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase ähnlichen Kinasen (PIKK) (Abraham, 2004). Ein Verlust der katalytischen Untereinheit und die daraus resultierende Kinaseinaktivität der DNA-PKcs führt bei Mäusen zu dem Krankheitsbild des SCID (Severe combined immunodeficiency) (Blunt *et al.*, 1995; Peterson *et al.*, 1995, Araki *et al.*, 1997). Diese Mäuse sind gekennzeichnet durch einen schweren Immundefekt, der auf eine Dysfunktion von B- und T-Zellen zurückzuführen ist, sowie durch eine deutlich erhöhte Strahlenempfindlichkeit.

Die DNA-PKcs phosphoryliert ihre Substrate an Serin- bzw. Threoninresten, welche von Glutaminresten gefolgt sind (Lees-Miller *et al.*, 1992). Die Kinaseaktivität wird durch die Anlagerung an doppelsträngige DNA (dsDNA) verstärkt (Gottlieb und Jackson, 1993). Die DNA-PK ist in der Lage, sich selbst zu phosphorylieren, was nach heutigem Kenntnisstand zur Dissoziation der DNA-PKcs von der DNA und Ku führen könnte. Die Autophosphorylierung könnte somit einen Regulationsmechanismus der Anlagerung und Auflösung des DNA-PK-DNA-Komplexes darstellen (Chan und Lees-Miller, 1996; Merkle *et al.*, 2002).

In einem zweiten Schritt des NHEJ kommt es zur Prozession der Bruchenden, welche, je nach Komplexität des DSB, das Entfernen nicht-ligierbarer Gruppen oder Sekundärstrukturelemente und Auffüllen von Lücken beinhaltet. Je nach Bruch sind verschiedene Prozessionsenzyme beteiligt, u.a. Artemis, DNA-Polymerase  $\mu$  und  $\lambda$ , PNK (Polynukleotidkinase), APLF (Aprataxin und PNF-like factor) und WRN (Werner protein) (Mahaney *et al.*, 2009).

Artemis hat eine 5'→3' Exonuklease-Aktivität und in Anwesenheit von DNA-PKcs und Adenosin-Triphosphat (ATP) auch eine Endonuklease-Aktivität. Eine Inaktivität des Artemis-Proteins führt beim Menschen zum Krankheitsbild des rs-SCID (Radiosensitive-SCID) (Moshous *et al.*, 2001).

WRN, welches ein Protein der RecQ Helicase Familie ist, ist eine Exonuklease und fungiert im Rahmen der Prozession auch als DNA-abhängige ATPase und Helikase. Es wird DNA-PK-abhängig phosphoryliert (Karmakar *et al.*, 2002). Die DNA-Polymerasen  $\mu$  und  $\lambda$  sind für das Auffüllen von entstandenen DNA-Lücken zuständig.

Die Ligation der DNA-Enden erfolgt in einem letzten Schritt. Daran beteiligt sind vor allem ein Komplex aus XRCC4 und DNA-Ligase IV. XRCC4 verfügt selbst über keine enzymatische Aktivität, ermöglicht allerdings die Anlagerung anderer Reparaturproteine. Es interagiert mit Ku, PNK, APLF, XLF und der DNA (Mahaney *et al.*, 2009). XRCC4 stabilisiert darüber hinaus die DNA-Ligase IV und stimuliert deren Aktivität (Grawunder *et al.*, 1997).

Bei dem NHEJ handelt es sich demnach um einen komplexen DSB-Reparaturmechanismus, der eine Vielzahl von Reparaturproteinen einbezieht. Wie letztlich die Entscheidung gefällt wird, über welchen Reparaturweg ein DSB repariert wird, bleibt unklar und ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

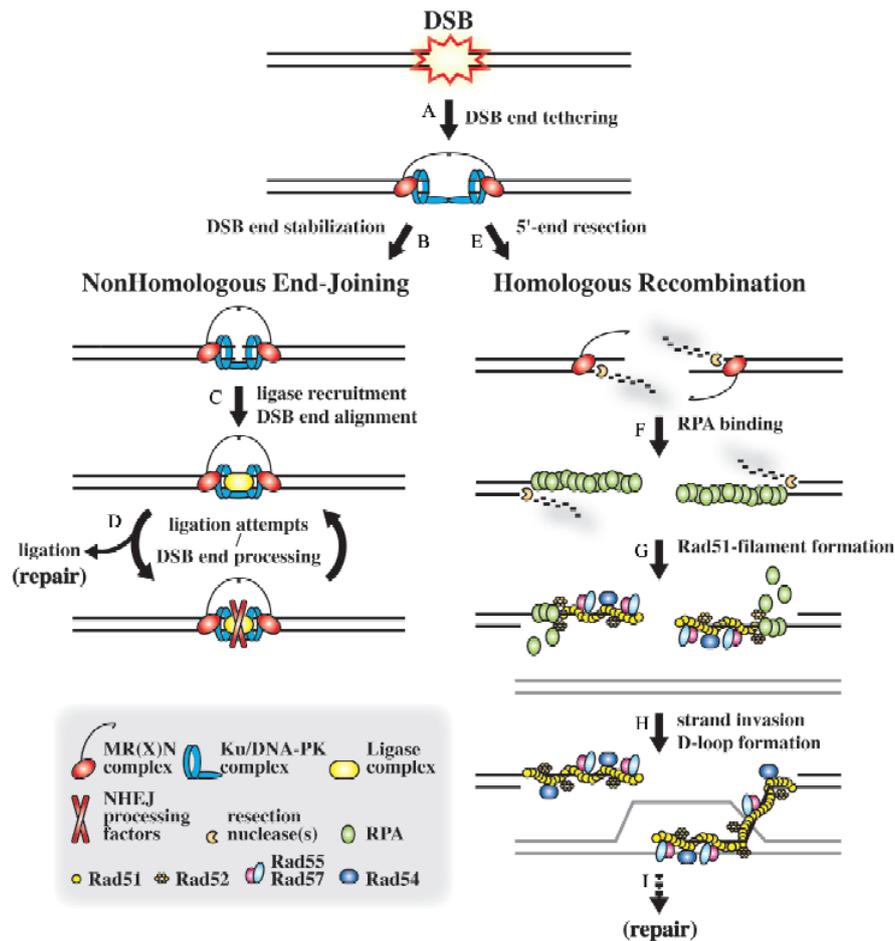
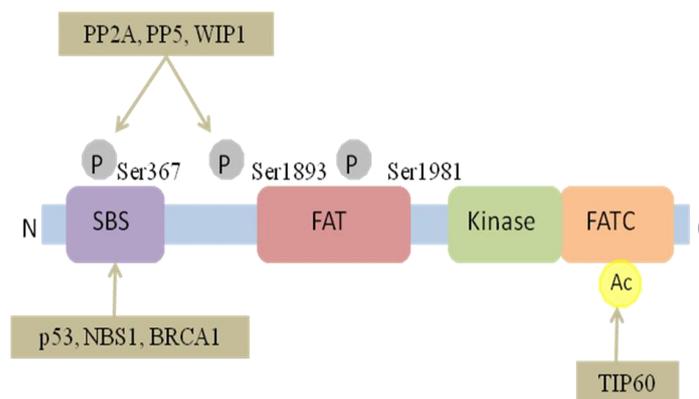


Abb. 1: DSB-Reparaturmechanismen (Einzelheiten siehe Text) (aus Pardo et al., 2009)

## 2.2 Ataxia teleangiectasia

### 2.2.1 Molekulare Grundlagen der DNA-Schadensantwort

Um eine möglichst effektive DNA-Schadensantwort zu gewährleisten, muss die Reparatur mit anderen Vorgängen in der Zelle, wie dem Fortschreiten des Zellzyklus und der Apoptose, koordiniert werden. Im Zentrum dieser komplexen Koordination steht das 370 kDa schwere ATM-Protein (*Ataxia teleangiectasia mutated*) (Chen und Lee, 1996). Das *atm*-Gen liegt auf Chromosom 11q22-23 (Gatti *et al.*, 1988) und codiert für eine Serin/Threonin-Kinase, die neben der DNA-PKcs und ATR (ATM and Rad3-related protein) Mitglied der Familie der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase ähnlichen Kinasen (PIKK) ist. Neuere Studien gehen davon aus, dass mindestens 900 Phosphorylierungsstellen auf über 700 Substraten von ATM und ATR phosphoryliert werden können (Matsuoka *et al.*, 2007; Linding *et al.*, 2007).



**Abb. 2: Schematische Darstellung von ATM**

Die Kinase-Domäne ist nahe dem C-Terminus lokalisiert. FATC fungiert als Bindungsstelle für die Acetyltransferase TIP60, außerdem gibt es eine FAT-Domäne sowie eine N-terminale Substratbindungsstelle. Kommt es zu Deletionen in der SBS resultiert eine Inaktivität von ATM. ATM besitzt drei Autophosphorylierungsstellen (Ser 367, Ser1893, Ser1981) und mehrere Ser- und Thr-Phosphorylierungsstellen (P). Drei Phosphatasen kontrollieren die Aktivität von ATM (PP5, PP2A, WIP1) (modifiziert nach Lavin, 2008).

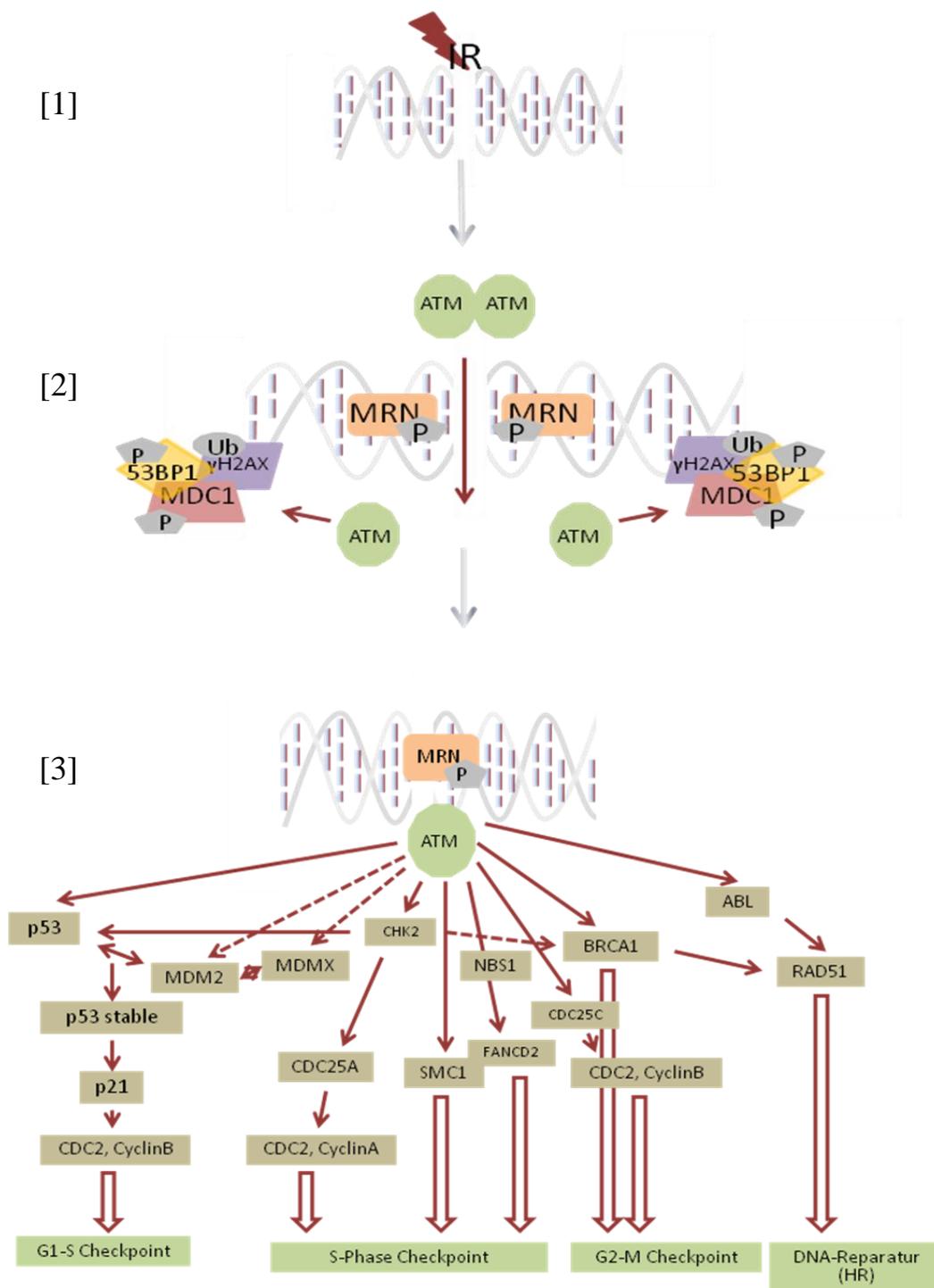
Tritt ein DSB auf, kommt es zunächst zur Akkumulation des MRN-Komplexes (Mre11-Rad50-NBS1) an der Bruchstelle. MRN bindet als heterotetramerer Komplex an die DNA und sorgt für eine räumliche Nähe der geschädigten Enden des DSB (de Jager *et al.*, 2001). Die Akkumulation ist abhängig von dem Vorhandensein von MDC1 (Mediator of DNA-damage Checkpoint protein 1). Der MRN-Komplex dient als Sensor für die Rekrutierung von ATM

zur Bruchstelle (Lee und Paull, 2005). ATM liegt im inaktiven Zustand in der Zelle als Dimer vor. Wenn es zum DSB rekrutiert wird, kommt es zur Dissoziation in zwei Monomere, sowie zur Autophosphorylierung, was der Erhaltung der ATM-Aktivität dienen soll (Bakkenist und Kastan, 2003). Sobald ATM aktiviert ist, kann es eine Vielzahl von Proteinen phosphorylieren, die eingebunden sind in die DNA-Reparatur, DNA-Replikation und Zellzykluskontrolle (Matsuoka *et al.*, 2007).

Die ATM-abhängige Phosphorylierung der Histonvariante H2AX scheint das initiale Signal zur Anhäufung von weiteren an der Schadensantwort beteiligten Proteinen zu sein. H2AX, welches 2-25% der H2A-Histone ausmacht, wird von einem Mitglied der PIKK-Familie (ATM, DNA-PKcs, ATR) an Ser-139 lokal phosphoryliert, sobald ein DSB in unmittelbarer Nähe auftritt (Rogakou *et al.*, 1998). Die phosphorylierte Form wird als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet. Alle drei Mitglieder der PIKK-Familie verfügen über die Möglichkeit, H2AX zu phosphorylieren, sodass in ATM-defizienten Zellen die DNA-PK die Phosphorylierung vollständig übernehmen kann (Kinner *et al.*, 2008; Stiff *et al.*, 2004). Als weiteres ATM-Substrat bindet nun MDC1 an  $\gamma$ -H2AX und amplifiziert dessen Signal, möglicherweise durch das Verhindern der  $\gamma$ -H2AX-Dephosphorylierung (Stucki *et al.*, 2005). Es folgen weitere Reparatur-Proteine wie 53BP1 (p53 binding protein 1), MRN, Claspin, Brit1/Mcph1 und BRCA1 (breast cancer susceptibility protein-1), die im Rahmen der DNA-Schadensantwort als Mediatoren bezeichnet werden (Harper und Elledge, 2007). Über MDC1 kommt es zur Polyubiquitinierung der DSB-Enden, sowie über RNF8 (RING-Finger ubiquitin ligase) zur Ubiquitinierung von H2AX, was zur Anreicherung von 53BP1 und BRCA1 führt (Lavin *et al.*, 2008).

53BP1 assoziiert mit methylierten Lysinresten an den Histonen H3 und H4, die unter normalen Bedingungen unzugänglich sind und erst durch Chromatinstrukturveränderungen im Rahmen der Reparatur von strahleninduzierten DSB freigelegt werden (Huyen *et al.*, 2004).

Neben dieser lokalen Anhäufung von Mediatorproteinen kommt es auch zur Phosphorylierung zahlreicher Effektorproteine durch ATM, vereinfachend dargestellt in Abb. 3. Diese Effektorproteine übernehmen Funktionen in der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur, transkriptionalen und translationalen Abläufen, sowie in der Apoptose. Durch die Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints kann beispielsweise die Zeit für eine Reparatur verlängert werden. Ist diese Reparatur allerdings nicht möglich, so kann die Einleitung der Apoptose erfolgen. Die Fähigkeit einer Zelle, diese Vorgänge zu koordinieren, ist essentiell für die Verhütung maligner Prozesse und somit für die Lebensfähigkeit eines Organismus.



**Abb. 3: ATM-Aktivierung und Signalkaskade**

[1] Ionisierende Strahlung induziert einen DSB, der [2] vom MRN-Komplex erkannt wird. Es kommt zur Monomerisierung und Aktivierung von ATM. Als initiales Mediatorprotein wird H2AX phosphoryliert. Es kommt zur Bildung von nukleären  $\gamma$ -H2AX-, 53BP1- und MDC1-Foci. [3] ATM phosphoryliert nach Interaktion mit MRN eine Vielzahl von Effektorproteinen, die wiederum Einfluss auf Zellzyklus-Checkpoints sowie die DNA-Reparatur haben. Unter anderem wird NBS1 phosphoryliert und fungiert als Adapter für weitere ATM-abhängige Phosphorylierungen, u.a. von SMC1 (structural maintenance of chromosomes protein-1). In der Kontrolle einzelner Prozesse, wie z.B. beim G1-S-Checkpoint, kommt es zur Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen, um eine strenge Regulation zu sichern. MDM2 (Murine double minute-2), CHK2 (Checkpoint kinase-2), BRCA1 (Breast cancer susceptibility protein-1), CDC2 (Cell division control-2), FANCD2 (Fanconi anaemia complementation group D2).

(modifiziert nach Lavin, 2008)

ATM hat allerdings auch einen direkten Einfluss auf die Reparatur von DSB. Ungefähr 90% der DSB werden in der G1-Phase ATM-unabhängig repariert. So konnte gezeigt werden, dass ATM-defiziente Zellen einen DSB-Reparaturdefekt für eine kleine Fraktion (10-25%) von Brüchen aufweisen (Foray *et al.*, 1997; Riballo *et al.*, 2004, Kühne *et al.*, 2004). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei diesen Brüchen vermutlich um Heterochromatin-assoziierte DSB handelt (Goodarzi *et al.*, 2008).

Die lokale Anhäufung von an der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur beteiligten Proteinen kann mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (Kobayashi *et al.*, 2008, Rogakou *et al.*, 1999).

Da diese punktförmigen Signale durch ionisierende Strahlung induziert werden, spricht man von IRIF (*ionizing-radiation-induced-foci*). Aufgrund dieser Foci gelingt es, einzelne DSB sichtbar zu machen. Ein in diesem Zusammenhang bedeutsames Protein ist  $\gamma$ -H2AX.

Es konnte mithilfe vergleichender Untersuchungen mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) gezeigt werden, dass nach 95 kV Röntgenbestrahlung ein  $\gamma$ -H2AX-Focus einem DSB entspricht (Sedelnikova *et al.*, 2002; Rothkamm und Löbrich, 2003). Das Verschwinden der Foci spiegelt die Dephosphorylierung von  $\gamma$ -H2AX im Rahmen des Reparaturvorgangs wider (Kinner *et al.*, 2008). Im Gegensatz zur PFGE, die ab einer Röntgendosis von etwa 5 Gy verlässliche Daten liefert, können DSB mittels der  $\gamma$ -H2AX-Immunfluoreszenz-Methode in einem Dosisbereich von 0,001 Gy bis 5 Gy detektiert werden (Rothkamm und Löbrich, 2003; Kinner *et al.*, 2008). Genau wie  $\gamma$ -H2AX bilden unter anderem MDC1, ATM und 53BP1 diskrete Foci aus. Diese kolokalisieren mit  $\gamma$ -H2AX Foci am Chromatin (Bekker-Jensen *et al.*, 2006; Celeste *et al.*, 2002; Stucki und Jackson 2004; Kitagawa *et al.*, 2004). Andere Reparaturproteine wie Ku70/Ku80 und DNA-PK akkumulieren zwar an DSB, sind aber nicht als abgrenzbare, diskrete Foci zu erkennen. Wiederum andere Proteine (Rad51, Rad52, BRCA2, ATR) akkumulieren in Subchromatinkompartimenten (Bekker-Jensen *et al.*, 2006). Mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie kann demnach eine Aussage über das Auftreten von DSB sowie über die an der Reparatur beteiligten Proteine getroffen werden.

### 2.2.2 Klinisches Bild

Kommt es bei Menschen zu einem genetisch bedingten kompletten Fehlen bzw. zu vollständiger Inaktivität des ATM-Proteins, so resultiert dies in der Erkrankung Ataxia teleangiectasia (AT) (syn. Louis-Bar-Syndrom; Boder-Sedgwick-Syndrom). Bereits 1926 wurden von dem Internisten Ladislav Syllaba und dem Neurologen Kamil Henner von drei Geschwistern im Jugendalter berichtet, die mit okulären Teleangiektasien und Choreoathetosen aufgefallen waren (Syllaba und Henner, 1926). Denise Louis-Bar beschrieb 15 Jahre später ein neunjähriges Mädchen mit progressiver cerebellärer Ataxie, mentaler Retardierung und beidseitigen okulokutanen Teleangiectasien (Louis-Bar, 1941). Die Bezeichnung Ataxia teleangiectasia ist daher auf zwei Hauptsymptome zurückzuführen und wurde erstmals von Boder und Sedgwick 1958 eingeführt (Boder und Sedgwick, 1958). Diese autosomal-rezessive Systemerkrankung tritt homozygot mit einer Prävalenz von ca. 1:40000 auf und ist deshalb als seltene Erkrankung zu betrachten. Die Prävalenz heterozygoter Träger beträgt jedoch 1:100, das heißt, dass 1% der Bevölkerung betroffen ist.

Es sind über 400 verschiedene über das gesamte *atm*-Gen verteilte Mutationen bekannt, wobei beinahe in jeder betroffenen Familie eine eigene spezifische Mutation vorliegt. Dies führt einerseits dazu, dass homozygot Betroffene in der Regel auf jedem Allel eine andere Mutation haben, also von jedem Elternteil eine andere Variante geerbt haben. Andererseits führt die Vielzahl der bekannten Mutationsvarianten dazu, dass ein sehr heterogener Ausprägungsgrad der Symptome resultiert, abhängig von der jeweiligen Mutation (Chun und Gatti, 2004). Bei den meisten Mutationen (85%) handelt es sich um trunkierende oder Spleißmutationen, die zu kurzen, instabilen ATM-Proteinen führen. Bei ca. 10% liegen Missense-Mutationen vor. Aus diesen Mutationen gehen stabile Proteine einer normalen Größe, aber beeinträchtigter Funktion hervor (Concannon, 2002).

Bei homozygoten Menschen kommt es in der Regel ab einem Alter von 2 bis 3 Jahren zum Auftreten einer Ataxie bei zuvor normaler Kindesentwicklung. Viele Kinder benötigen ab dem zehnten Lebensjahr einen Rollstuhl. Es kann sich eine Dysarthrie sowie eine okulomotorischen Apraxie, eine Störung der Augenbewegung, entwickeln. Einige Jahre nach Auftreten der neurologischen Symptome entwickeln sich okulokutane Teleangiectasien. Oft zeigen sich rezidivierende sinopulmonale Infekte, zurückzuführen auf eine Immundefizienz, sowie eine Neigung zur Entwicklung maligner Tumore (Lebenszeitrisiko 30-40%). Dabei stehen Leukämien und Lymphome im Vordergrund. Die Lebenserwartung ist sehr stark abhängig von dem Ausprägungsgrad der Symptome, allerdings ist es keine Seltenheit, dass die Erkrankten das Erwachsenenalter erreichen (Meyn, 1999).

Laborchemische und radiologische Auffälligkeiten umfassen neben der Mutation im *atm*-Gen und der resultierenden Abwesenheit bzw. Dysfunktion des ATM-Proteins ein erhöhtes alpha-Fetoprotein (AFP), Translokationen zwischen Chromosom 7 und 14 in Lymphozyten, eine deutlich erhöhte Radiosensitivität und eine cerebelläre Atrophie in der Magnetresonanztomographie (Chun und Gatti, 2004). Es handelt somit sich um eine monogene Erberkrankung mit pleiotropen Effekten. Diese lassen sich durch die komplexe Funktion des ATM-Proteins bei der Regulation von verschiedenen Zellvorgängen erklären.

Im Gegensatz zu homozygoten Trägern zeigen heterozygot Betroffene keine AT-typischen Symptome, aber schon 1976 gab es erste Hinweise auf ein erhöhtes Krebsrisiko dieser Menschen, wobei das Spektrum der Malignome abweicht von dem der homozygoten Träger (Swift *et al.*, 1976). Studien mit AT-Familien konnten zeigen, dass bei AT-heterozygoten Menschen ein deutlich erhöhtes Brustkrebsrisiko vorliegt (Swift *et al.*, 1991). Andere Studien zeigten, dass AT-heterozygote Patienten nach Bestrahlung der Brust ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von schweren Normalgewebsreaktionen haben (Ho *et al.*, 2007; Angele *et al.*, 2003).

## 2.3 Klinische Strahlentherapie

### 2.3.1 Grundlagen der Strahlentherapie

Die Strahlentherapie hat sich seit Entdeckung der ionisierenden Strahlung Ende des 19. Jahrhunderts als feste Therapieoption neben Chemotherapie und Operation bei der Behandlung maligner Tumorerkrankungen etabliert (Connell und Hellman, 2009). Sie findet Einsatz bei mehr als jedem zweiten Tumorpatienten und kann dabei neoadjuvant, adjuvant und primär kurativ angewendet werden. Der Erfolg der Behandlung ist dabei u.a. vom Allgemeinzustand des Patienten und von der histologischen Entität des Tumors (und damit seiner Radiosensitivität) abhängig. Des Weiteren wird der Erfolg maßgeblich beeinflusst durch Normalgewebstoxizitäten, die auftreten, wenn umliegendes, gesundes Gewebe im Bestrahlungsfeld liegt (Bentzen *et al.*, 2006).

Während des 20. Jahrhunderts gab es eine Reihe von konzeptionellen und technologischen Verbesserungen, die heute die Grundlagen einer effektiven und sicheren strahlentherapeutischen Behandlung darstellen. Dazu zählt, neben technologischen Fortschritten in der Herstellung und Applikation ionisierender Strahlung, Verbesserungen im Bereich der computerbasierten Bestrahlungsplanung und Erkenntnissen der Tumorbiologie, vor allem das Prinzip der Dosisfraktionierung. Nach diesem Prinzip werden Tumoren mit täglichen Fraktionen über Wochen bzw. Monate bestrahlt, wobei jede Fraktion aus einer relativ geringen Dosis besteht (1,2-3 Gy). Dadurch scheint der geringe Überlebensvorteil, den umliegende Normalgewebszellen nach Strahlenexposition im Vergleich zu Tumorzellen haben, verstärkt zu werden. Ein heute allgemein akzeptiertes Modell zur Erklärung dieses Sachverhaltes gründet sich v.a. auf vier Vorgänge, die unabhängig voneinander zwischen den Fraktionen im bestrahlten Gewebe auftreten: (a) Effizientere Reparatur von subletalen zellulären Schäden im Normalgewebe, (b) Überführung der Tumorzellen von strahlenresistenten (späte S-Phase) in strahlensensitive Zellzyklusphasen (G<sub>2</sub>/M-Phase), (c) Reoxygenierung von hypoxischen (und damit strahlenresistenten) Bereichen des Tumors, (d) Migration von Normalgewebszellen in bestrahlte Bereiche und damit Repopularisierung dieser mit gesunden Zellen (Connell und Hellman, 2009). Neben fraktionierter Bestrahlung findet auch die Hyperfraktionierung in der Klinik Anwendung. Dabei ist die Dosis pro Fraktion geringer, die Anzahl der Fraktionen dementsprechend höher, sodass eine Bestrahlung zweimal täglich stattfinden kann. Der Zeitraum zwischen zwei Fraktionen sollte mindestens sechs Stunden betragen, basierend auf der biologischen Beobachtung, dass die meisten subletalen DNA-Schäden im Normalgewebe innerhalb von sechs Stunden nach

Bestrahlung repariert werden. Dadurch wird das Prinzip der Dosisfraktionierung maximal ausgenutzt und bei möglichst hoher Tumorkontrolle eine größtmögliche Reduktion von Normalgewebstoxizitäten erreicht.

### 2.3.2 Strahlenbiologie von Normalgeweben

Das Ausmaß der Normalgewebsreaktionen unterliegt großen interindividuellen Schwankungen (Bentzen und Overgaard, 1994). Schwere Normalgewebstoxizitäten entwickeln sich bei ca. 5-10% der Patienten, die als „over-responders“ bezeichnet werden (Begg, 2006). Nach heutigem Kenntnisstand sind Normalgewebsreaktionen immer multifaktorieller Genese und werden hervorgerufen durch DNA-Schäden und Veränderungen des Mikromilieus, wie Chemokinen, inflammatorischen Cytokinen und veränderten Zell-Zell-Interaktionen (Barnett *et al.*, 2009; Bentzen, 2006). Daher scheinen viele Gene aus dem Bereich der DNA-Schadensantwort, der Apoptose, der Proliferation sowie von inflammatorischen Prozessen von Bedeutung zu sein. Patienten mit Mutationen in Genen, welche für Proteine kodieren, die an der DNA-Schadensantwort beteiligt sind, haben somit ein erhöhtes Risiko, schwere Normalgewebsreaktionen nach Bestrahlung zu entwickeln (Fernet und Hall, 2004; Ho *et al.*, 2006).

Nach ihrem zeitlichen Auftreten unterscheidet man frühe, meist deterministische Normalgewebsschäden von stochastisch auftretenden Spätfolgen. Typischerweise treten frühe Strahlennebenwirkungen in schnell proliferierenden Geweben auf (Haut, Gastrointestinaltrakt, blutbildendes System) und sind in der Regel reversibel.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang der Dünndarm, ein Organ mit hohem Zellumsatz, dessen Epithelzellen sich aus einem fortwährend teilenden Stammzellpool rekrutieren. Er liegt bei der Behandlung der meisten abdominalen Tumoren wie Blasen- oder Rektumkarzinomen im Bestrahlungsfeld. Ab einer Dosis von 40 Gy treten Strahlentoxizitäten in Form von Diarrhöen auf. Dieser akuten Schleimhautschädigung liegt eine Erschöpfung der Vorläuferzellen in den Dünndarmkrypten zugrunde. Es kommt zur Nachschubinsuffizienz und zum Verlust des Zottenepithels. Dieser Verlust des Schleimhautepithels führt zum Zusammenbruch der Schleimhautbarriere. Eine Heilung erfolgt durch die Proliferation überlebender Vorläufer- und Stammzellen.

Späte Strahlentoxizitäten werden vor allem bei langsam proliferierenden Geweben beobachtet (zentralnervöses System, Niere, Herz), in denen nur einzelne funktionelle Zellen die Fähigkeit zur Teilung besitzen. Sie führen meist zu irreversiblen Effekten wie Atrophie, Fibrose und

---

Gefäßveränderungen (Wang *et al.*, 2007). Das Herz beispielsweise wird meist im Rahmen der Bestrahlung von Mediastinaltumoren und Mammakarzinomen in Mitleidenschaft gezogen. Noch viele Jahre nach strahlentherapeutischer Behandlung kann sich eine Kardiomyopathie entwickeln. Es wird angenommen, dass Zellen in spät-reagierenden Geweben strahleninduzierte DNA-Schäden besser reparieren können als dies in früh-reagierenden Geweben der Fall ist (Thames *et al.*, 1984)

## 2.4 Ziele der Arbeit

Nach strahlentherapeutischer Behandlung entwickeln 5-10% der Patienten schwere Normalgewebstoxizitäten. Als eine Ursache für interindividuelle Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit werden genetische Faktoren, die an der Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind, diskutiert.

Es gab bereits einige Untersuchungen zur Induktion und Reparatur von DSB im Gewebe reparaturprofizienter und –defizienter Mäuse nach Einzeitbestrahlung (Rübe *et al.*, 2008a, b), allerdings bleibt offen, wie sich die Reparatur von DSB in solchen Geweben nach fraktionierter Bestrahlung verhält. Von besonderem Interesse ist dabei der Einfluss kleiner, genetisch determinierter DSB-Reparaturdefekte auf kumulative DNA-Schäden nach fraktionierter Bestrahlung.

Zu diesem Zweck wurden in einem präklinischen *in vivo* Modell Mäuse reparaturprofizienter ( $ATM^{+/+}$ ) und –defizienter ( $ATM^{+/-}$ ;  $SCID^{-/-}$ ) Mausstämmen fraktioniert bestrahlt und anschließend deren Organgewebe hinsichtlich ihrer DSB-Reparaturfähigkeit untersucht. Um mögliche Unterschiede zwischen strahlenbiologisch unterschiedlichen Geweben (früh-reagierend vs. spät-reagierend) aufzudecken, wurden in dieser Untersuchung Dünndarm- und Herzgewebe ausgewertet.

Die vorliegende Arbeit soll daher einen Beitrag zu folgenden Fragestellungen leisten:

1. Wie verhält sich die DSB-Reparatur in reparaturprofizientem Normalgewebe nach fraktionierter Bestrahlung?
2. Welchen Einfluss haben genetisch determinierte Reparaturdefekte auf kumulative DNA-Schäden nach fraktionierter Bestrahlung?
3. Lassen sich organspezifische bzw. gewebetypspezifische Unterschiede in der DSB-Reparatur feststellen?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Mausstämme

Es wurden heterozygote AT-Mäuse des Stammes 129S6/SvEvTac-Atm<sup>tm1Awb</sup>/J (ATM<sup>+/-</sup>) von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Bei diesen Mäusen wurde das *atm*-Gen durch einen Insertionsvektor unterbrochen. Dieser Vektor enthält eine *neo*-Resistenz und führt zu einer trunkierenden Mutation an der gleichen Stelle, die bei menschlichen AT-Patienten betroffen sein kann.

Aus einem Zuchtpaar dieses Stammes wurden Nachkommen verschiedenen Genotyps hergestellt (ATM<sup>+/+</sup>, ATM<sup>+/-</sup>, ATM<sup>-/-</sup>).

SCID<sup>-/-</sup>-Mäuse des Stammes CB17/Icr-Prkdc<sup>scid</sup>/Crl wurden von Charles River (Sulzfeld, Germany) bezogen.

Jeweils 4-5 Mäuse wurden zusammen in einem Käfig unter keimarmen Bedingungen gehalten, um das Infektionsrisiko zu reduzieren. Dabei fanden alle Mäuse die gleichen Bedingungen (Temperatur 22 ±2°C, Luftfeuchtigkeit 55±10%, Licht-Dunkel-Verhältnis 12 h:12 h), sowie während des gesamten Versuchszeitraumes die gleiche Standard-Labor-Nahrung und Wasser vor. Nach Anlieferung wurden die Mäuse mindestens sieben Tage vor dem Experiment zur Akklimatisation im Tierstall gehalten. Zum Zeitpunkt der Experimente waren alle Mäuse ca. 12 Wochen alt.

#### 3.2 Bestrahlung der Versuchstiere

Die Einzeitbestrahlung von ATM<sup>+/-</sup> - und ATM<sup>+/+</sup> -Mäusen erfolgte mit 2 Gy. Die Tiere wurden 0.5 h, 2.5 h, 5 h, 24 h und 48 h nach Bestrahlung getötet und Herz und Dünndarm wurden entnommen. Gemäß Tabelle 1 wurden zwischen 2 und 8 Experimente pro Zeitpunkt nach Bestrahlung und Genotyp durchgeführt.

Die fraktionerte Bestrahlung wurde mit allen in Tabelle 1 aufgeführten Genotypen (ATM<sup>+/-</sup>, ATM<sup>+/+</sup>, SCID<sup>-/-</sup>) durchgeführt. Die Tiere wurden nach 2 Gy und 0.5 h, 2 Gy und 24 h, 3 x 2 Gy und 24 h, 5 x 2 Gy und 24 h sowie 5 x 2 Gy und 72 h Reparaturzeit getötet und anschließend wurden wiederum Herz und Dünndarm entnommen. Die Reparaturzeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach der letzten Fraktion. Zwischen zwei Fraktionen lag jeweils ein Zeitraum von 24 h. Pro Zeitpunkt nach Bestrahlung und Genotyp wurden zwischen 1 und 3 Experimente durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Mäuse des gleichen Genotyps.

Die Bestrahlung der Versuchstiere erfolgte in einem Plastikzylinder mit einem Durchmesser von 20 cm, einer Höhe von 25 cm und einer Dicke von 1,5 cm.

**Tab. 1: Anzahl der Experimente** (aufgeschlüsselt nach Genotypen; Zahl vor dem Schrägstrich Herz/ Zahl nach dem Schrägstrich Dünndarm; ⚡:Bestrahlung mit 2 Gy)

Gesamtdosis	0 Gy	2Gy	2 Gy	2 Gy	2 Gy	2 Gy	6 Gy	10 Gy	10 Gy
		⚡	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡
							⚡	⚡	⚡
							⚡	⚡	⚡
								⚡	⚡
<b>Reparaturzeit</b>	-	0.5 h	2.5 h	5h	24 h	48 h	24 h	24 h	72 h
<b>ATM<sup>+/+</sup></b>	2/2	2/2	2/2	2/2	3/3	2/2	3/3	3/3	3/3
<b>ATM<sup>+/-</sup></b>	5/5	8/7	4/4	4/4	7/7	4/3	4/4	4/3	4/4
<b>SCID<sup>-/-</sup></b>	3/3	3/3	-	-	3/3	-	3/3	3/3	1/1

Bevor die Bestrahlung mittels Linearbeschleuniger (MDX, Siemens) durchgeführt werden konnte, musste zunächst ein genauer Bestrahlungsplan erstellt werden. Die Isodosenverteilung wurde mithilfe des ADAC Pinnacle Systems für 3-dimensionale Bestrahlungsplanung festgelegt (Abb. 4). Aufgrund der Dosisverteilung konnte gewährleistet werden, dass die 95%-Isodose den gesamten Körper jeder einzelnen Maus umfasst (Abb. 5).

Bestrahlungscharakteristika:

- Photonenenergie: 6 MV
- Dosisrate: 2,0 Gy/min
- Quelle-Haut-Abstand (source-skin-distance SSD): 99 cm
- Größe des Bestrahlungsfeldes: 900 cm<sup>2</sup> (30 cm x 30 cm)

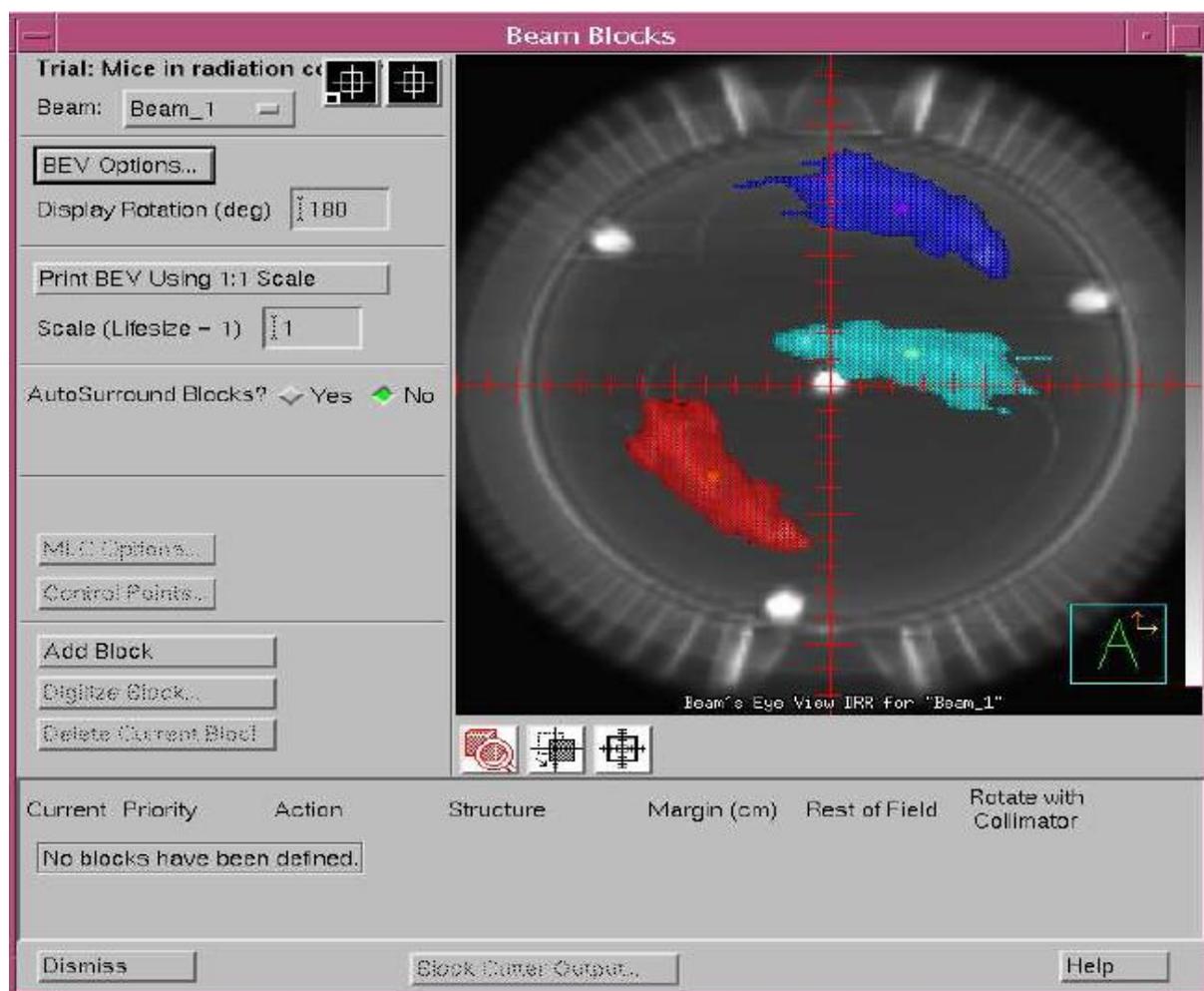


Abb. 4: CT-Plan für Ganzkörperbestrahlung

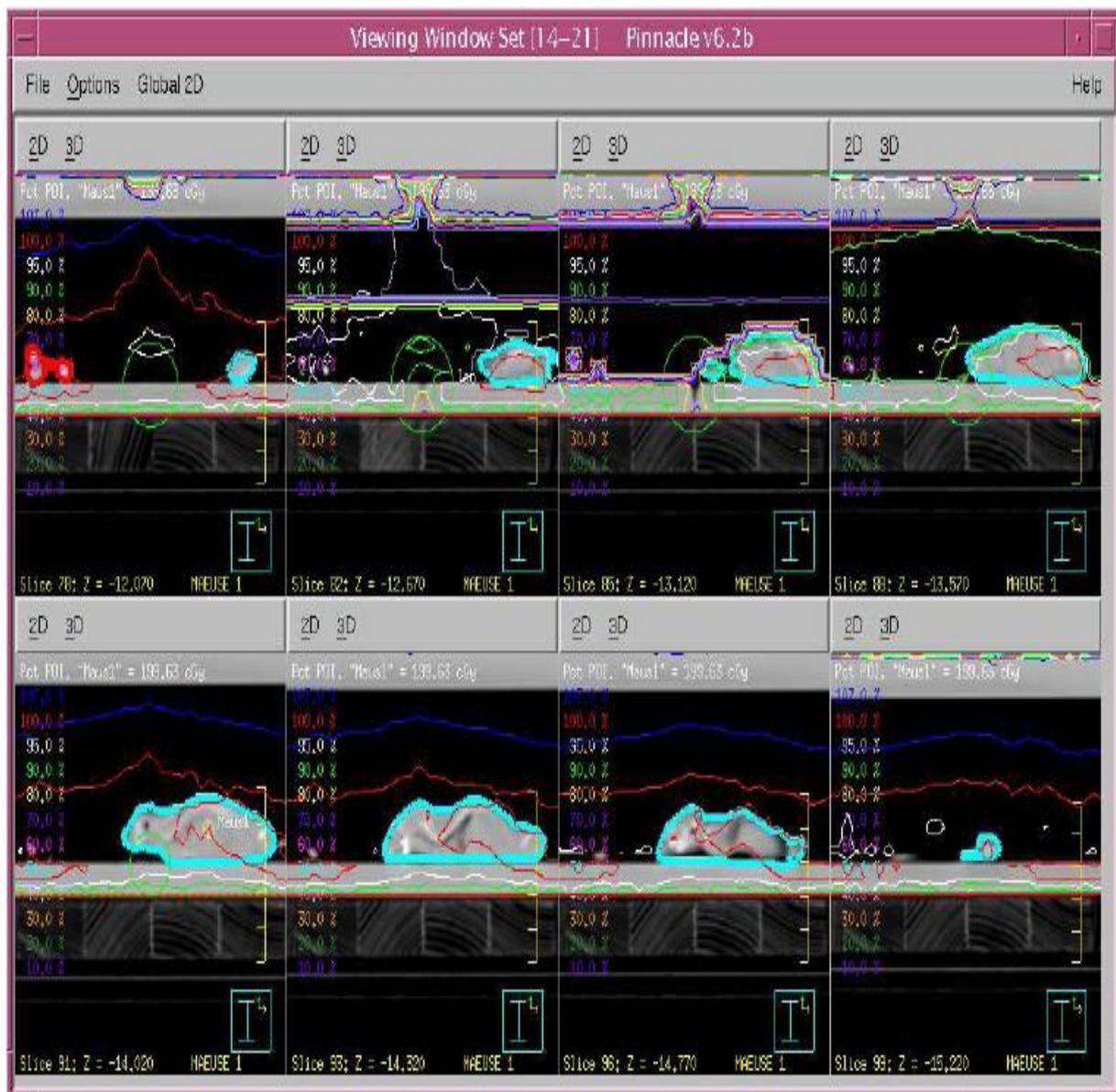


Abb. 5: Isodosenverteilung

### 3.3 Gewebegewinnung

Zunächst wurden die Versuchstiere mit Xylazin und Ketamin, welches intraperitoneal appliziert wurde, anästhesiert (1 ml Xylazin und 0.75 ml Ketamin in 8.25 ml 0.9%-iger Natriumchloridlösung). Anschließend erfolgte eine Punktion des linken Ventrikels, wodurch das Blut aus dem Herz und Gefäßsystem nahezu vollständig entfernt wurde. Dann wurden Dünndarm, Herz und, zur nachträglichen Genotypisierung, auch die Leber zügig entnommen. Die Organe wurden in kleinere Stücke geschnitten, bevor sie über Nacht bei Raumtemperatur in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd verblieben. Im Einbettautomaten wurden die Organe in Paraffin eingebettet und im Anschluss mit einem Mikrotom in 4  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte

geschnitten. Die Schnitte wurden danach auf Objektträger (jeweils 2 Schnitte pro Objektträger; HistoBond<sup>®</sup>-Objektträger; Marienfeld Laboratory; Lauda-Königshofen, Germany) aufgebracht und 18 Stunden bei 37°C im Trockenschrank getrocknet.

### 3.4 Immunfluoreszenzfärbung

#### 3.4.1 Prinzip

Bei der Immunfluoreszenzfärbung bindet ein Primärantikörper an dem zu markierenden Antigen. Gegen diesen Primärantikörper ist wiederum ein Sekundärantikörper gerichtet, welcher mit einem fluoreszierenden Farbstoff versehen ist (Fluorochrom). Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Licht bestimmter Wellenlängen angeregt, woraufhin die Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Bei der Rückkehr der Elektronen auf das Ausgangsniveau emittieren diese Licht einer Wellenlänge, die länger ist als die des Anregungslichtes (Stokes'sche Regel). Jeder Farbstoff hat spezielle Charakteristika bezüglich der Wellenlängen des Anregungslichtes und des Emissionslichtes. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene an Antikörper gekoppelte Farbstoffe verwendet. Alexa Fluor 488 absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 495 nm und emittiert es mit einer Wellenlänge von 519 nm, wohingegen Alexa Fluor 568 Licht einer Wellenlänge von 578 nm absorbiert und Licht einer Wellenlänge von 603 nm emittiert. Bei den angegebenen Wellenlängen handelt es sich um die Absorptions- bzw. Emissionsmaxima.

#### 3.4.2 $\gamma$ -H2AX-Färbung

Die  $\gamma$ -H2AX-Färbung ist eine Immunfluoreszenzfärbung, mit deren Hilfe man phosphorylierte H2AX-Histone in Zellen nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen nachweisen kann (Rothkamm und Löbrich, 2003; Rogakou *et al.*, 1998; Rogakou *et al.*, 1999). Zu Beginn der Färbung werden die auf den Objektträgern getrockneten Schnitte zweimal 10 min in 100% Xylol entparaffiniert. Anschließend erfolgt eine Rehydratation mittels einer absteigenden Alkoholreihe (100% Ethanol, 96% Ethanol, 90% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol; jeweils 10 min pro Alkoholkonzentration). Es folgt eine Wässerung für zweimal 5 min in Aqua dest..

Danach werden die Organschnitte bei 96°C 60 min im Wasserbad in einer Citratpufferlösung (Dako REAL<sup>™</sup> Target Retrieval Solution, S2031; Glostrup, Denmark; Verdünnung 1:9 in

Aqua dest.) erhitzt. Dieser Schritt dient der Epitop-Demaskierung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Nach 30-minütigem Abkühlen der Schnitte werden diese in Aqua dest. 1 min gewaschen, um daraufhin 5 min in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,2-7,4) unter Rühren gewaschen zu werden. Im Anschluss werden die Proben für 60 min in PBS/NS (PBS/Ziegen-Normalserum 100:1; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen.

Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-Phospho-Histone H2AX [Ser 139], JBW 103, mouse monoclonal; Upstate, Temecula, CA, USA) für mindestens 12 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4°C. Der Antikörper wird vorher im Verhältnis 1:800 in PBS/NS verdünnt, gevortext und anschließend für 60 sec. bei 13000 rpm zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland). Zur Inkubation werden jeweils 200 µl auf einen Objektträger aufgestrichen. Nach der Inkubation werden die Proben dreimal je 8 min in PBS gewaschen, bevor sie 5 min in PBS/NS geblockt werden.

Es wird dann der Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488, goat-anti-mouse IgG; Invitrogen molecular probes, Oregon, USA) aufgetragen und die Proben werden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer 60 min im Dunkeln mit dem Antikörper inkubiert. Der Antikörper wird vorher im Verhältnis 1:200 in PBS/NS verdünnt, gevortext und für 60 sec. bei 13000 rpm zentrifugiert. Es werden pro Objektträger 200 µl aufgetragen. Die Schnitte werden im Anschluss in drei weiteren Waschschritten in PBS je 5 min gewaschen.

Zum Schluss werden die Proben in einem Schritt mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) gegengefärbt und in Mounting Medium ausgehärtet (H-1500, Vectashield® Hard Set Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Die DAPI-Färbung dient der Markierung von DNA und damit indirekt der Sichtbarmachung von Zellkernen. Wird DAPI durch ultraviolettes Licht (358 nm) angeregt, fluoresziert es mit blauer Farbe (461 nm). Diese Färbung ist behilflich bei der Abgrenzung der im Gewebe dicht gelagerten Zellkerne und somit bei der Zuordnung der  $\gamma$ -H2AX-Foci zu einer Zelle.

Alle Färbeschritte werden, falls nicht gesondert angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 3.4.3 $\gamma$ -H2AX/ 53BP1-Doppelfärbung

Bei der  $\gamma$ -H2AX/ 53BP1-Doppelfärbung wird neben  $\gamma$ -H2AX auch 53BP1 markiert. Die ersten Färbeschritte bis zum Auftragen des Primärantikörpers sind die Gleichen wie bei der oben beschriebenen  $\gamma$ -H2AX-Einzelfärbung. Allerdings wird zunächst der 53BP1-Primärantikörper in der Verdünnung 1:200 in PBS/NS aufgetragen (200  $\mu$ l pro Objektträger; Rabbit-anti-53BP1; Ethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) und eine Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss werden die Objektträger dreimal 10 min unter Rühren in PBS gewaschen. Dann erfolgt die Auftragung des Sekundärantikörpers in der Verdünnung 1:400 in PBS/NS (200  $\mu$ l pro Objektträger; Goat-anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488, Invitrogen molecular probes, Oregon, USA). Dieser wird 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Proben erneut dreimal je 10 min in PBS gewaschen und danach 60 min in PBS/NS geblockt. Dann erfolgt die Auftragung des 1:200 in PBS/NS verdünnten  $\gamma$ -H2AX-Primärantikörpers (200  $\mu$ l pro Objektträger; Rabbit-anti- $\gamma$ -H2AX ICH-000591; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA). Die Inkubationsdauer des Antikörpers beträgt 60 min und erfolgt im Brutschrank bei 37°C. Danach werden die Objektträger erneut in PBS 10 min gewaschen bevor der Sekundärantikörper aufgetragen wird und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert (1:400 in PBS/NS; 200  $\mu$ l pro Objektträger; Goat-anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 568, Invitrogen molecular probes, Oregon, USA). Es erfolgt ein weiterer Waschschrift in PBS für 30 min. Dann werden die Schnitte, wie in der Einzelfärbung angegeben, in Mounting Medium mit DAPI eingebettet.

### 3.5 Quantifizierung der Foci

Zur Quantifizierung der Foci wurde das Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600 verwendet. Dieses ist ausgestattet mit drei Epifluoreszenzfiltersystemen. Bei der Auswertung der Gewebeschnitte kamen folgende Filter zum Einsatz (EX: Anregungsfilter; DM: Beamsplitter; BA: Emissionsfilter):

DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol): EX 340-380. DM 400. BA 435-495.

FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat) : EX 465-485. DM 505. BA 515-555.

Zur Aufnahme der Fotos wurde außerdem verwendet:

Tx Red (Texas Red, Sulforhodamin 101 Sulfonylchlorid): EX 540-580. DM 595. BA 600-660

Das Mikroskop ist weiterhin verbunden mit einer Digitalkamera für Mikroskope (Nikon Digital Sight, DS-2 MBWc) und der entsprechenden Software (Nikon, Düsseldorf, Germany) zur Aufnahme und Bearbeitung von Bildern.

Die quantitative Analyse der Foci erfolgte unter Benutzung der Vergrößerungsobjektive von x60 und x100. Es wurden pro Gewebeschnitt mindestens 80 Zellen und mindestens 40 Foci ausgewertet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen aus unterschiedlichen Bereichen des Schnittes stammten, aber dem gleichen Zelltyp entsprachen. Aufgrund der Lokalisation der Zellen, die ausgewertet wurden, konnte sichergestellt werden, dass überwiegend nicht-proliferierende G<sub>0</sub>-Phase-Zellen in die Auswertung eingingen.

Beim Herz wurden lediglich die Kardiomyozyten im Längsschnitt ausgewertet, wenn eine deutliche Querstreifung mit Glanzstreifen sichtbar war. In Kardiomyozyten im Längsschnitt sind Foci sehr viel besser voneinander abgrenzbar.

Beim Dünndarm wurden die Zellen des einschichtig, prismatischen Oberflächenepithels der Dünndarmzotten ausgewertet. In den Dünndarmkrypten befinden sich Stammzellen, die aufgrund ihrer proliferativen Funktion einen variablen DNA-Gehalt haben und somit das Ergebnis verfälschen würden. In die Auswertung gingen lediglich die Focizahlen von mutmaßlich intakten Enterozyten ein, davon abzugrenzen sind die apoptotischen Epithelzellen sowie die Becherzellen, welche nicht ausgezählt wurden. Es wurden sowohl Längs- als auch Queranschnitte des Dünndarms ausgewertet.

### 3.6 Genotypisierung

Die AT-Mäuse, an denen die Experimente durchgeführt wurden, entstammten der eigenen Zucht und waren die Nachkommen eines heterozygoten AT-Paares. Nach den Mendel'schen Regeln entstehen nach Paarung der Mäuse im Verhältnis 1:2:1 homozygot kranke (ATM<sup>-/-</sup>), heterozygote (ATM<sup>+/-</sup>) und homozygot gesunde (ATM<sup>+/+</sup>) Mäuse. Die ATM<sup>-/-</sup>-Mäuse lassen sich phänotypisch gut erkennen. Die Unterscheidung zwischen ATM<sup>+/+</sup>- und ATM<sup>+/-</sup>-Mäusen muss allerdings durch Genotypisierung mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) erfolgen.

Die PCR erfolgte gemäß dem mitgelieferten Standard-PCR-Protokoll (Protokoll Atm<sup>tm1Awb</sup>) des Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Die DNA-Extraktion erfolgte gemäß dem Protokoll "Purification of total DNA from Animal Tissues (DNeasy 96 Protocol)" aus dem Handbuch DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Handbook von QIAGEN. Als Gewebe diente entweder die Leber der Tiere (ca. 25 mg), eine Ohrstanze oder die Schwanzspitze (0.4-0.6 cm). Es

ergaben sich PCR-Produkte von 147 bp (Wildtyp-Allel) und 280 bp (mutiertes Allel). Die Primersequenzen lieferte das Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine USA). Die Primer wurden von Invitrogen bezogen (Invitrogen molecular probes, Oregon, USA).

Tab. 2: Primersequenzen

Primerbezeichnung	Jackson Laboratory Name	Sequenz (5'→3')
<b>Wildtyp Primer A</b>	Atm wild type primer oIMR0640	5'-GCT GCC ATA CTT GAT CCA TG-3'
<b>Wildtyp Primer B</b>	Atm wild type primer oIMR0641	5'-TCC GAA TTT GCA GGA GTT G-3'
<b>Mutations-Primer A</b>	Neo generic primer oIMR0013	5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3'
<b>Mutations-Primer B</b>	Neo generic primer oIMR0014	5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik des Universitätsklinikums des Saarlandes. Zur Prüfung der Signifikanz wurden zwei statistische Tests durchgeführt. Der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben prüft mit der Nullhypothese, ob die Mediane von zwei Stichproben gleich sind. Dieser Test kann angewendet werden, wenn es sich um stetige Messwerte handelt, die nicht normalverteilt sind. Bei diesem Test werden alle Werte der Größe nach geordnet und anschließend Rängen zugeteilt. Es wird die Summe aller zu einer Stichprobe gehörenden Ränge gebildet. Dann wird die kleinere Rangsumme mit dem entsprechenden kritischen Wert verglichen, der für ein definiertes Signifikanzniveau statistischen Tabellen zu entnehmen ist. Es können p-Werte sowohl für den zwei- als auch einseitigen Test ermittelt werden, wobei das Signifikanzniveau auf  $\alpha=5\%$  ( $p \leq 0.05$ ) festgelegt wurde. Beim einseitigen Test wird geprüft, ob einer der Mediane der beiden Stichproben größer oder kleiner ist als der andere ( $A < B$  oder  $A > B$ ), beim zweiseitigen Test wird geprüft ob beide Mediane gleich sind ( $A = B$ ).

Des Weiteren wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Dieser stellt eine Verallgemeinerung des Mann-Whitney-Tests auf mehr als zwei unabhängige Stichproben dar. Auch hier wurde das Signifikanzniveau auf  $\alpha=5\%$  ( $p \leq 0.05$ ) festgelegt.

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reparatur von DSB in Organgeweben reparaturprofizienter ( $ATM^{+/+}$ ) und –defizienter ( $ATM^{+/-}$ ;  $SCID^{-/-}$ ) Mäuse nach Einzeit- und fraktionierter Bestrahlung untersucht. Die untersuchten Organe, Dünndarm und Herz, wurden mittels der  $\gamma$ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

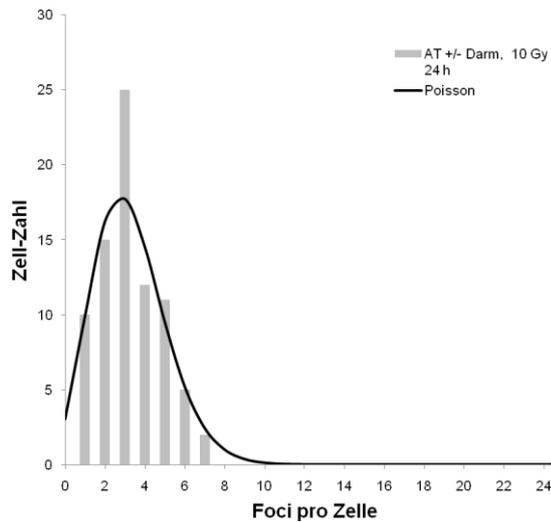
### 4.1 Quantifizierung von $\gamma$ -H2AX-Foci

Die Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte durch das Auszählen der  $\gamma$ -H2AX-Foci pro Zellkern. Dabei wurden pro Schnitt mindestens 80 Zellen und 40 Foci gezählt.

Die Verteilung von DSB innerhalb eines Zellkerns bzw. einer Zellpopulation entspricht einer Poisson-Verteilung. Dabei handelt es sich um eine diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung. Sie liefert Voraussagen darüber, wie oft seltene, zufällige und voneinander unabhängige Ereignisse eintreten, wenn bereits zuvor bekannt ist, wie oft sie durchschnittlich erwartet werden. Sind die Zahlenwerte für die erwartete mittlere Häufigkeit klein, so ist die Poisson-Verteilung asymmetrisch, werden die Zahlenwerte größer, so kommt es zur Annäherung an eine Gauß-Verteilung.

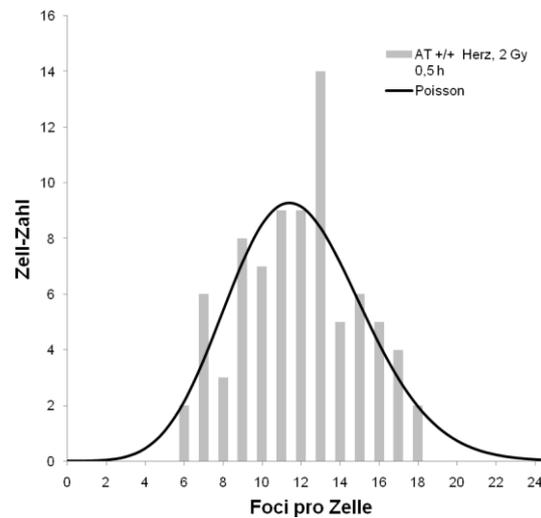
Entspricht die Verteilung der Focizahlen pro Zelle der Poisson-Verteilung, so kann davon ausgegangen werden, dass repräsentative Ausschnitte des Gewebes ausgewertet wurden und dass die Anzahl der ausgewerteten Zellen pro Gewebeschnitt ausreichend hoch ist.

In Abb. 6a/b sind exemplarisch die Anzahl der Zellen bei einer bestimmten Focuzahl pro Zelle dargestellt. Die Kurven bilden die nach der Poisson-Verteilung erwarteten Werte ab. Dargestellt sind die Werte nach 0.5 h und 24 h Reparaturzeit. Es ist zu erkennen, dass bis auf einzelne Ausreißer (3 Foci pro Zelle nach 10 Gy/24 h; 13 Foci pro Zelle nach 2 Gy/0.5 h) die tatsächlich ermittelte Häufigkeitsverteilung der statistischen Poisson-Verteilung sehr nahe kommt. Dies kann als Hinweis auf eine repräsentative Auswahl der gezählten Zellen sowie auf eine ausreichende Anzahl an ausgewerteten Zellen pro Gewebeschnitt betrachtet werden.



**Abb. 6a: Poisson-Verteilung/ Verteilung der Anzahl der Zellen auf die Anzahl der Foci pro Zelle (Dünndarm)**

Exemplarisch dargestellt sind die Werte des Dünndarms nach 10 Gy/24 h Reparaturzeit



**Abb. 6b: Poisson-Verteilung/ Verteilung der Anzahl der Zellen auf die Anzahl der Foci pro Zelle (Herz)**

Exemplarisch dargestellt sind die Werte des Herzens nach 2 Gy/0,5 h Reparaturzeit. Bei größeren Mittelwerten kommt es zu Annäherung an eine Gauß-Verteilung.

## 4.2 Einzeitbestrahlung

Bei den Versuchen zur Einzeitbestrahlung wurden zunächst Mäuse verschiedener Mausstämme ( $ATM^{+/+}$ ;  $ATM^{+/-}$ ) einmalig mit 2 Gy bestrahlt. Nach definierten Reparaturzeitpunkten (0,5 h, 2,5 h, 5 h, 24 h, 48 h) wurden Dünndarm und Herz durch Zählen von  $\gamma$ -H2AX-Foci ausgewertet. Zu jedem durchgeführten Experiment wurde zusätzlich das Gewebe einer unbestrahlten Maus gefärbt. Auch hier wurden  $\gamma$ -H2AX-Foci gezählt.

In den Abbildungen 7 und 8 ist die Anzahl der Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Reparaturzeit dargestellt. Hierzu wurden die mittleren Focizahlen pro Zelle berechnet. Diese ergeben sich aus den Focizahlen der einzelnen Experimente. Die Anzahl  $n$  der durchgeführten Experimente finden sich in Tab. 1. Von diesen mittleren Focizahlen pro Zelle wurden die mittleren Focizahlen der unbestrahlten Kontrollen abgezogen. Damit soll gewährleistet sein, dass tatsächlich nur strahleninduzierte DSB in der Auswertung Beachtung finden und nicht solche, die als Hintergrund-DSB im Rahmen von physiologischen Zellvorgängen auftreten.

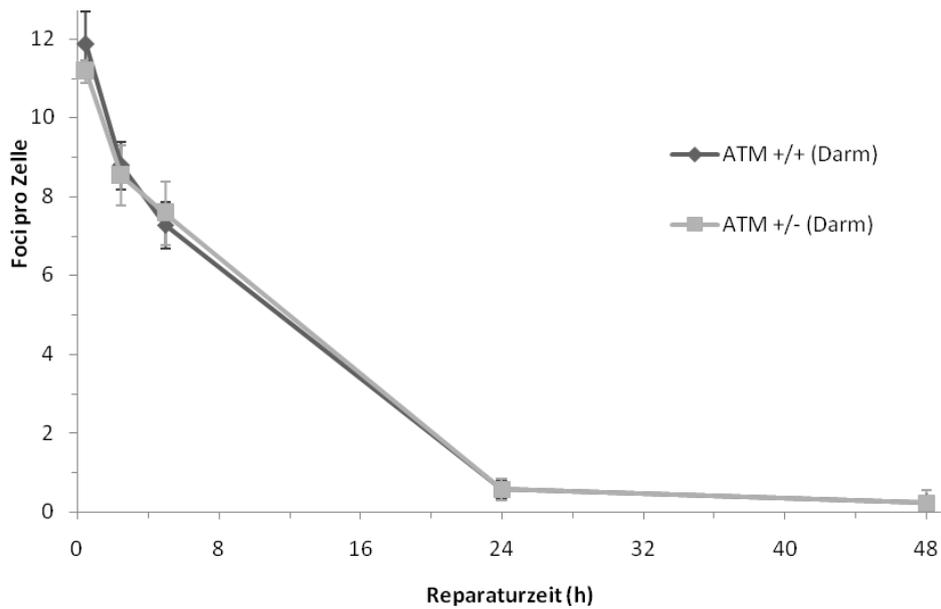
Die Kurven für den homozygot gesunden ( $ATM^{+/+}$ ) und den heterozygoten ( $ATM^{+/-}$ ) Genotyp verlaufen nahezu identisch. Es kommt bei beiden Genotypen mit zunehmender Reparaturzeit zu einer deutlichen Reduktion von DSB. Dabei gibt es zunächst eine 1. Phase der Reparatur (0.5 h - 5 h) mit einer schnellen Abnahme von DSB, gefolgt von einer langsameren Phase der Reparatur (5 h–24 h). Im Zeitraum zwischen 24 h und 48 h kommt es nur noch zu einer sehr geringen Abnahme von DSB.

Beim Dünndarm liegen die Mittelwerte bei beiden Genotypen nach 0.5 h Reparaturzeit zwischen 11 und 12 Foci pro Zelle ( $ATM^{+/+}$   $\sim 11.85 \pm 1.15$  Foci/ Zelle;  $ATM^{+/-}$   $\sim 11.16 \pm 0.25$  Foci/ Zelle). Nach 2.5 h bzw. 5 h Reparaturzeit liegen die Mittelwerte beider Genotypen ähnlich dicht zusammen (5 h:  $ATM^{+/+}$   $\sim 7.27 \pm 0.79$  Foci/ Zelle;  $ATM^{+/-}$   $\sim 7.57 \pm 1.21$  Foci/ Zelle) und nach 24 h Reparaturzeit liegt noch eine Differenz zwischen beiden Genotypen von 0.006 Foci pro Zelle vor ( $ATM^{+/+}$   $\sim 0.57 \pm 0.37$  Foci/ Zelle;  $ATM^{+/-}$   $\sim 0.57 \pm 0.20$  Foci/ Zelle). Die statistische Auswertung ergab zu keinem Reparaturzeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen  $ATM^{+/+}$  und  $ATM^{+/-}$ .

Beim Herz liegen die Mittelwerte nach 0.5 h Reparaturzeit bei  $\sim 11.54 \pm 0.36$  Foci pro Zelle für  $ATM^{+/+}$  und  $\sim 11.83 \pm 0.73$  Foci pro Zelle für  $ATM^{+/-}$ . Mit zunehmender Reparaturzeit wird dieser Unterschied geringer (24 h:  $ATM^{+/+}$   $\sim 0.63 \pm 0.27$  Foci/ Zelle;  $ATM^{+/-}$   $0.83 \pm 0.27$  Foci/ Zelle; 48 h:  $ATM^{+/+}$   $\sim 0.39 \pm 0.31$  Foci/ Zelle;  $ATM^{+/-}$   $\sim 0.5 \pm 0.29$  Foci/ Zelle). Auch hier ergab die statistische Prüfung zu keinem Reparaturzeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen  $ATM^{+/+}$  und  $ATM^{+/-}$ .

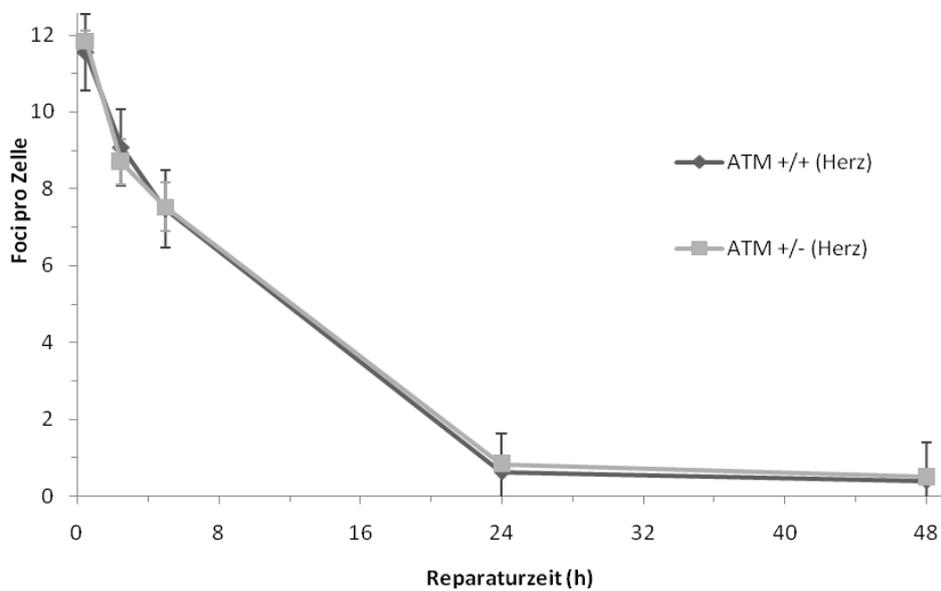
Auch die Werte der unbestrahlten Kontrollen beider Genotypen und Organe weisen nur eine geringe Differenz auf, die statistisch nicht signifikant ist (Dünndarm:  $ATM^{+/+}$   $\sim 0.12 \pm 0.02$  Foci/Zelle;  $ATM^{+/-}$   $\sim 0.28 \pm 0.43$  Foci/Zelle; Herz:  $ATM^{+/+}$   $\sim 0.12 \pm 0.03$  Foci/Zelle;  $ATM^{+/-}$   $\sim 0.11 \pm 0.04$  Foci/Zelle).

Der vermutete DSB-Reparaturdefekt AT-heterozygoter Mäuse konnte somit nach einer Einzeitbestrahlung mit 2 Gy nicht klar detektiert werden. Ebenso gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Organgeweben Dünndarm und Herz.



**Abb. 7: Ergebnisse der Einzelbestrahlung (Dünndarm)**

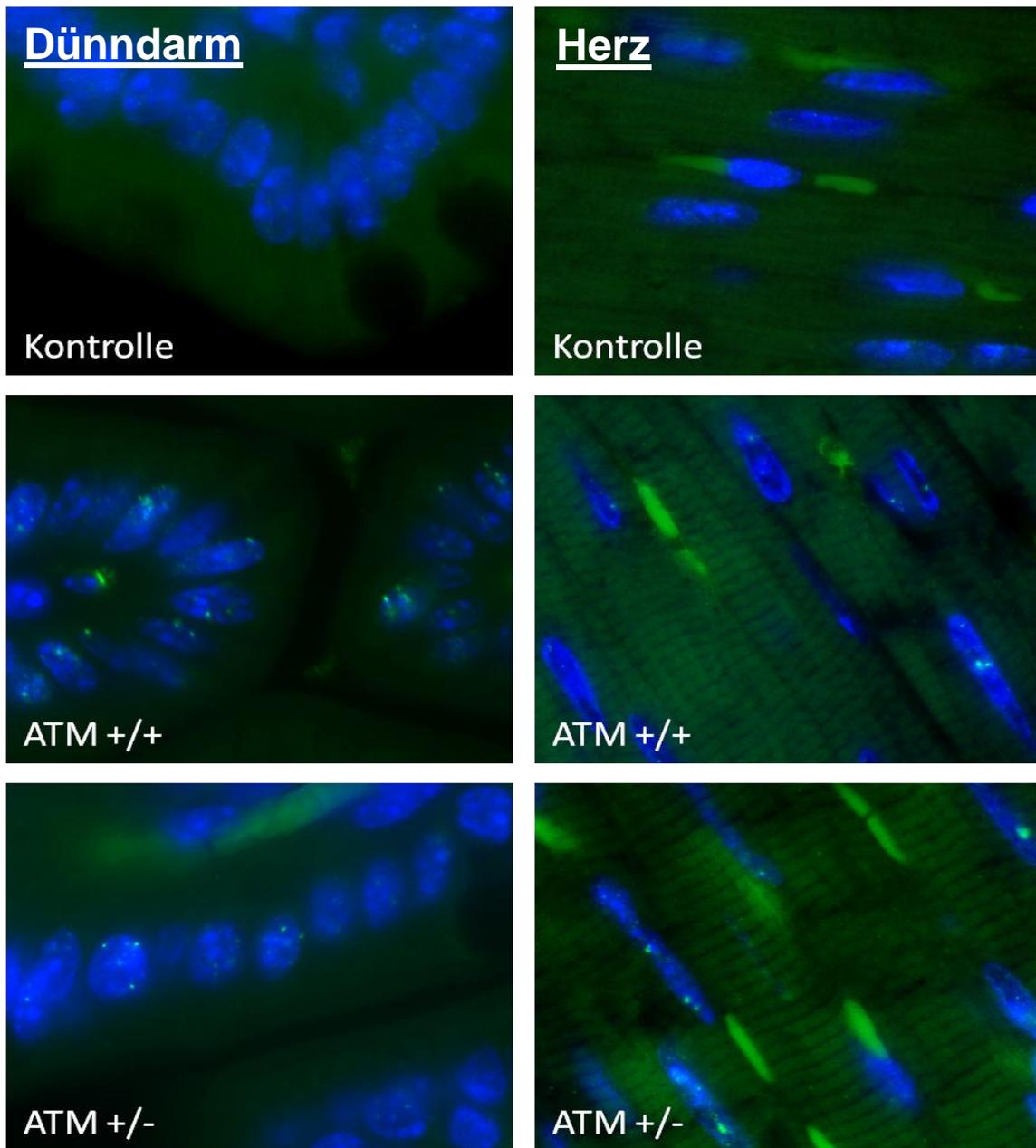
Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Reparaturzeit. Dargestellt sind die mittleren Focizahlen sowie die dazugehörigen Standardfehler (SEM).



**Abb. 8: Ergebnisse der Einzelbestrahlung (Herz)**

Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Reparaturzeit. Dargestellt sind die mittleren Focizahlen sowie die dazugehörigen Standardfehler (SEM).

Abb. 9 zeigt Dünndarm- und Herzgewebeschnitte nach einer Bestrahlung mit 2 Gy und einer Reparaturzeit von 24 h, die nach der  $\gamma$ -H2AX-Methode aufgearbeitet wurden. Es ist weder ein Unterschied zwischen beiden Genotypen, noch zwischen beiden Organen sichtbar. Deutlich zu erkennen ist, dass in den unbestrahlten Kontrollen kaum bzw. keine  $\gamma$ -H2AX-Foci sichtbar sind. Die Kontrollen sind somit klar abgrenzbar von den bestrahlten Geweben. Allerdings lässt sich kein Unterschied in den Focizahlen zwischen  $ATM^{+/+}$ - und  $ATM^{+/-}$ -Mäusen erkennen. Ebenso ist kein Unterschied zwischen den beiden Organgeweben Dünndarm und Herz sichtbar.



**Abb. 9: DAPI- $\gamma$ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung muriner Organgewebe nach 2 Gy/ 24h (x60 Vergrößerung)**  
Links: Färbung von Dünndarmgewebe verschiedener Genotypen. Die hier gezeigte Kontrolle ist dem homozygoten Genotyp entnommen. Rechts: Färbung von Herzmuskelgewebe verschiedener Genotypen. Die hier gezeigte Kontrolle ist dem homozygoten Genotyp entnommen. Bei den Aufnahmen wurden das DAPI-Bild und  $\gamma$ -H2AX-Bild getrennt voneinander aufgenommen und dann digital übereinandergelegt. Blau erscheinen die Zellkerne; die grünen Punkte innerhalb der Zellkerne stellen  $\gamma$ -H2AX-Foci dar und entsprechen DSB.

### 4.3 Fraktionierte Bestrahlung

In einem zweiten Versuchsansatz wurden homozygot gesunde ( $ATM^{+/+}$ ), heterozygote ( $ATM^{+/-}$ ) und  $SCID^{-/-}$ -Mäuse nach fraktionierter Bestrahlung untersucht (3 x 2 Gy nach 24 h Reparaturzeit; 5 x 2 Gy nach 24 h und 72 h Reparaturzeit). Die Mäuse wurden, wie in der Klinik üblich, mit 2 Gy pro Fraktion bestrahlt. Der Zeitraum zwischen 2 Bestrahlungen betrug, ebenfalls angelehnt an klinische Bedingungen, 24 h und nach Bestrahlung mit 5 x 2 Gy zusätzlich 72 h, um die klinische Situation einer Bestrahlungspause während des Wochenendes zu imitieren.

Die Anzahl der Versuche  $n$  nach Genotyp aufgeschlüsselt sind in Tab. 1 aufgeführt. Neben  $ATM^{+/+}$ - und  $ATM^{+/-}$ -Mäusen wurden auch  $SCID^{-/-}$ -Mäuse, die einen Defekt in der DNA-PKcs haben, fraktioniert bestrahlt. Vorherige Untersuchungen zu  $SCID^{-/-}$ -Mäusen zeigten einen deutlichen DSB-Reparaturdefekt dieser Mäuse nach Einzeitbestrahlung (Rübe *et al.*, 2008a). Der Einfluss eines solchen Reparaturdefektes auf mögliche kumulative DNA-Schäden nach fraktionierter Bestrahlung sollte in dieser Studie untersucht werden.

In den Abbildungen 10 und 11 sind die Ergebnisse zu den Untersuchungen von Herz- und Dünndarmgewebe graphisch zusammengefasst. Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (SEM). Die Darstellung der Foci/ Zelle nach 2 Gy/ 24 h entspricht den Werten der Einzeitbestrahlung.

Bei reparaturprofizienten  $ATM^{+/+}$ -Mäusen liegen die Mittelwerte für den Dünndarm bei  $\sim 0.57 \pm 0.37$  Foci/ Zelle nach 2 Gy, bei  $\sim 1.65 \pm 0.12$  Foci/ Zelle nach 3 x 2 Gy und bei  $\sim 2.14 \pm 0.11$  Foci/ Zelle nach 5 x 2 Gy. Es kommt demnach auch bei diesem reparaturprofizienten Mausstamm zu einer Kumulation von DSB nach fraktionierter Bestrahlung, die Annahme widerlegend, dass der größte Anteil von DSB in Normalgeweben innerhalb von sechs Stunden nach Bestrahlung repariert wird. Nach einer Reparaturzeit von 72 h nach Bestrahlung mit 5 x 2 Gy konnten im Mittel noch  $\sim 0.96 \pm 0.28$  Foci/ Zelle gezählt werden. Dieser Abfall an Foci pro Zelle spiegelt eine Form von Erholung der Zelle von strahlen-induzierten DNA-Schäden wider. Allerdings wird der Ausgangswert der Kontrolle nicht erreicht. Auch nach langen Reparaturzeiten sind noch strahleninduzierte DSB im Zellkern vorhanden.

Gleiche Schlussfolgerungen lassen sich aus den Untersuchungen vom Herzgewebe ableiten. Nach 2 Gy treten dort  $\sim 0.63 \pm 0.27$  Foci/ Zelle, nach 3 x 2 Gy  $\sim 1.82 \pm 0.26$  Foci/ Zelle und nach 5 x 2 Gy  $\sim 2.26 \pm 0.27$  Foci/ Zelle auf. Ebenso kann hier ein Abfall an Foci pro Zelle nach 72 h

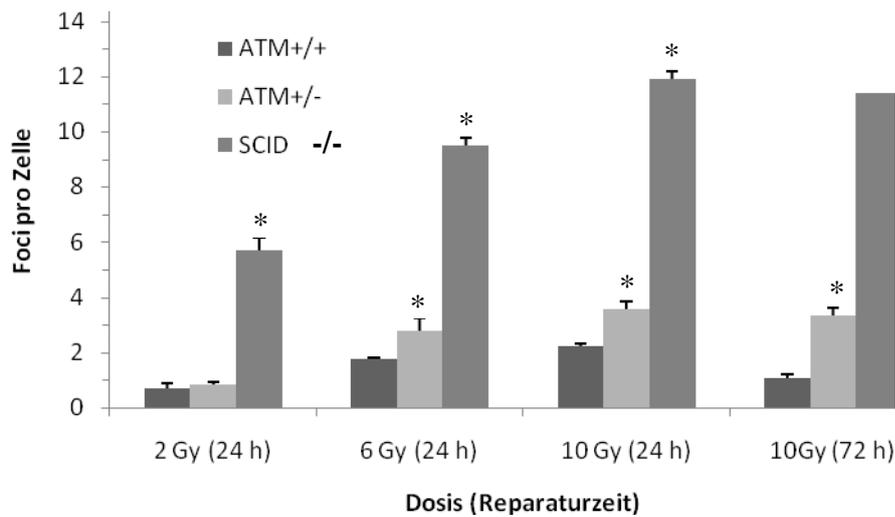
auf  $\sim 0.86 \pm 0.16$  beobachtet werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Dünndarm- und Herzgewebe konnte nach keiner Fraktion nachgewiesen werden.

Bei SCID<sup>-/-</sup>-Mäusen verbleibt in beiden Organgeweben nach jeder Fraktion ein deutlich größerer Anteil der strahleninduzierten DSB unrepariert im Zellkern, als dies bei ATM<sup>+/+</sup> der Fall ist. Frühere Studien, die die Anzahl von DSB in Lymphozyten innerhalb von 10 min nach Bestrahlung gemessen haben, konnten zeigen, dass bei SCID<sup>-/-</sup>-Mäusen die gleiche Anzahl an DSB induziert wird, wie es bei reparaturprofizienten Mäusen der Fall ist (Rübe *et al.*, 2008b). Daher sind die hier beobachteten Unterschiede zwischen ATM<sup>+/+</sup> und SCID<sup>-/-</sup> auf Reparaturunterschiede, und nicht auf Unterschiede in der Induktion von DSB zurückzuführen. Die Mittelwerte liegen beim Dünndarm nach 2 Gy bei  $\sim 5.59 \pm 0.82$  Foci/ Zelle (Herz:  $\sim 5.23 \pm 0.60$  Foci/ Zelle), was dem  $\sim 10$ -fachen des Mittelwertes bei ATM<sup>+/+</sup> nach Bestrahlung mit 2 Gy entspricht. Nach 3 x 2 Gy wurden  $\sim 9.37 \pm 0.53$  Foci/ Zelle (Herz:  $\sim 9.58 \pm 0.45$  Foci/ Zelle), nach 5 x 2 Gy/ 24 h  $\sim 11.81 \pm 0.41$  Foci/ Zelle (Herz:  $\sim 12.68 \pm 0.81$  Foci/ Zelle) und nach 5 x 2 Gy/ 72 h  $\sim 11.27$  Foci/ Zelle (Herz:  $\sim 11.75$  Foci/ Zelle) gezählt. Diese starke Akkumulation von DSB passt zu der Beobachtung, dass nur eine Maus das Zeitintervall bis 72 h nach Bestrahlung überlebte (daher keine Angabe einer Standardabweichung).

Wie bereits in den Abbildungen 7 und 8 gezeigt, konnte nach Einzeitbestrahlung kein signifikanter Unterschied in der DSB-Reparatur zwischen ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>+/-</sup> festgestellt werden. Jedoch unterscheiden sich die mittleren Focizahlen nach 3 x 2 Gy deutlich (ATM<sup>+/-</sup> Dünndarm:  $\sim 2.52 \pm 0.90$  Foci/ Zelle,  $p=0.05$ ; Herz:  $\sim 2.91 \pm 0.99$  Foci/ Zelle,  $p=0.05$ ). Auch nach 5 x 2 Gy ist der Unterschied statistisch signifikant (ATM<sup>+/-</sup> Dünndarm:  $\sim 3.28 \pm 0.49$  Foci/ Zelle; Herz:  $\sim 4.29 \pm 0.78$  Foci/ Zelle). Mit zunehmender Gesamtdosis kommt es bei ATM<sup>+/-</sup> zu einer stärkeren Akkumulation von DSB als bei ATM<sup>+/+</sup>. In dem Zeitraum zwischen 24 h und 72 h nach Bestrahlung mit 5 x 2 Gy kommt es nur noch zu einer geringen Reduktion an Foci (ATM<sup>+/-</sup> 5 x 2 Gy/ 72 h ; Dünndarm:  $\sim 3.07 \pm 0.50$  Foci/ Zelle; Herz:  $\sim 3.36 \pm 0.51$  Foci/ Zelle).

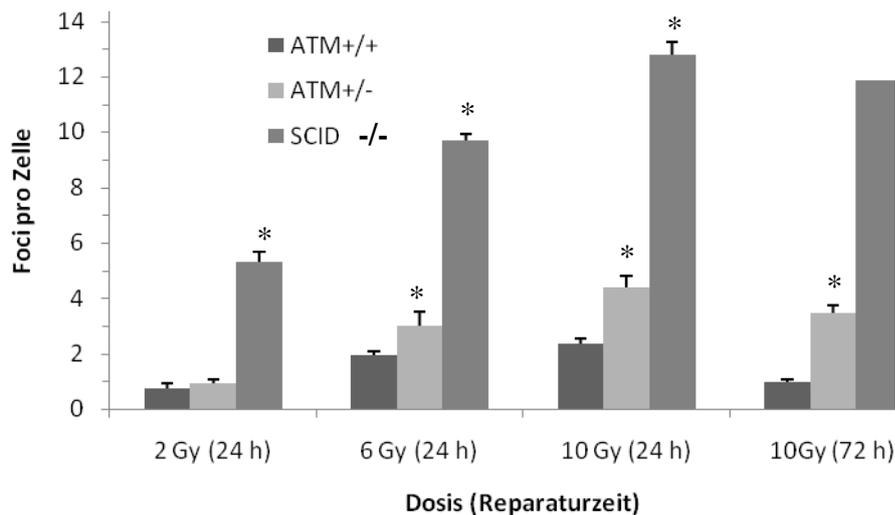
Zusammenfassend kann daraus gefolgert werden, dass nach fraktionierter Bestrahlung ein in der Einzeitbestrahlung nicht nachweisbarer DSB-Reparaturdefekt AT-heterozygoter Mäuse sichtbar wird. Auch kleine Reparaturdefekte können somit nach fraktionierter Bestrahlung von klinischer Bedeutung sein.

Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Organgeweben waren hingegen bei allen Genotypen und nach allen Fraktionen statistisch nicht signifikant.



**Abb. 10: Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung beim Dünndarm**

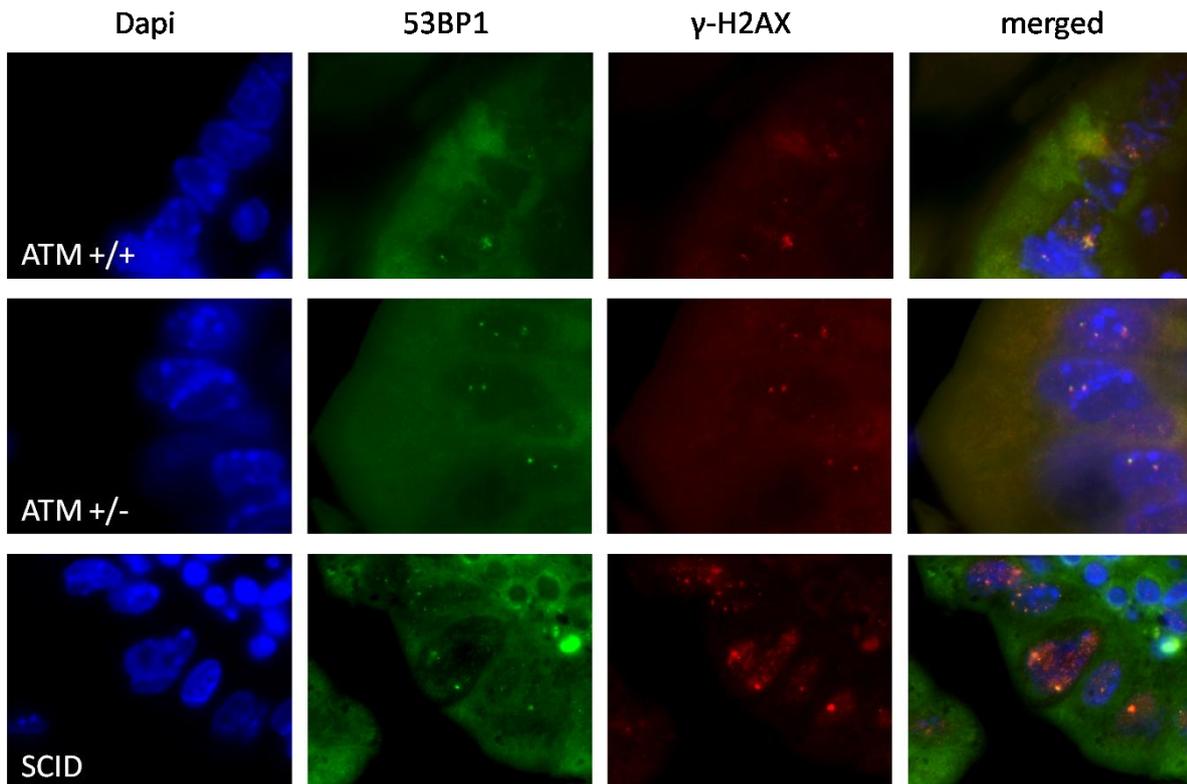
(Standardfehler bei SCID<sup>-/-</sup> 10 Gy (72h) nicht ermittelbar, da nur ein Experiment durchgeführt werden konnte)



**Abb. 11: Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung beim Herz**

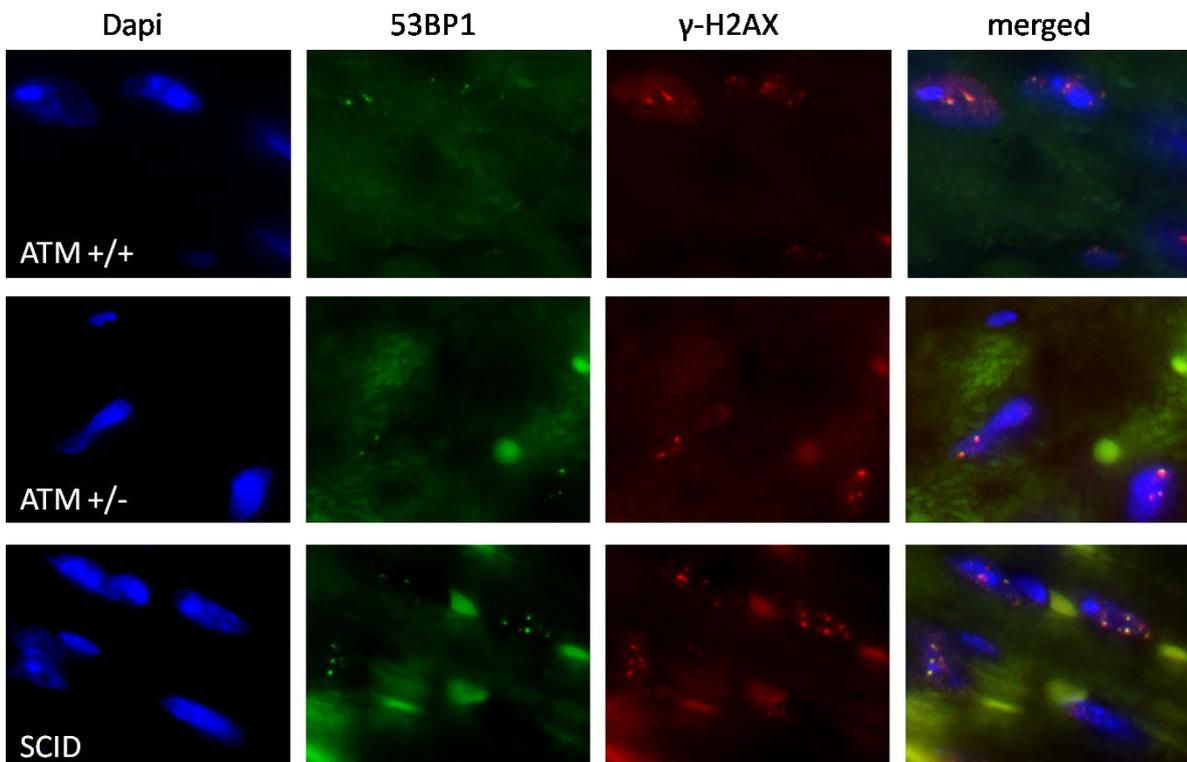
(Standardfehler bei SCID<sup>-/-</sup> 10 Gy (72h) nicht ermittelbar, da nur ein Experiment durchgeführt werden konnte)

In Abb. 12 und Abb. 13 sind Aufnahmen der Färbungen von Dünndarm und Herz nach Bestrahlung mit 10 Gy und einer Reparaturzeit von 24 h dargestellt. Dazu wurde zusätzlich zur  $\gamma$ -H2AX-Färbung eine 53BP1-Färbung durchgeführt. 53BP1 gilt ebenso wie  $\gamma$ -H2AX als signifikanter Marker für DSB (Bhogal *et al.*, 2009). Eine 1:1 Kolokalisation von  $\gamma$ -H2AX und 53BP1 soll verdeutlichen, dass es sich bei den gezählten Foci tatsächlich um DSB handelt.



**Abb. 12: DAPI-, 53BP1- und  $\gamma$ -H2AX-Färbung von Dünndarm nach 10 Gy/24h in der x100 Vergrößerung (Dünndarm)**

DAPI stellt die Zellkerne dar, auf die sich in der überlagerten Aufnahme die 53BP1- und  $\gamma$ -H2AX-Foci projizieren. Zu erkennen ist die Kolokalisation von 53BP1- und  $\gamma$ -H2AX-Foci sowie die unterschiedliche Anzahl von Foci, abhängig vom jeweiligen Genotyp.



**Abb. 13: DAPI-, 53BP1- und  $\gamma$ -H2AX-Färbung vom Herz nach 10 Gy/24h in der x100 Vergrößerung (Herz)**

DAPI stellt die Zellkerne dar, auf die sich in der überlagerten Aufnahme die 53BP1- und  $\gamma$ -H2AX-Foci projizieren. Zu erkennen ist die Kolokalisation von 53BP1- und  $\gamma$ -H2AX-Foci sowie die unterschiedliche Anzahl von Foci, abhängig vom jeweiligen Genotyp.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe eines *in vivo* Modells die DSB-Reparaturkapazität verschiedener reparaturprofizienter und –defizienter Mausstämmen nach fraktionierter Bestrahlung untersucht. Dazu wurden ein im strahlenbiologischen Sinne früh-reagierendes (Dünndarm) und spät-reagierendes (Herz) Organewebe ausgewertet. Ziel war es, den Einfluss genetisch bedingter Reparaturdefekte auf kumulative DNA-Schäden nach fraktionierter Bestrahlung zu ermitteln.

Untersucht wurden reparaturdefiziente SCID<sup>-/-</sup>-Mäuse, bei denen es nach jeder Fraktion in beiden untersuchten Organeweben zu einer signifikanten Anhäufung von DSB kam. Im Gegensatz dazu wurde bei reparaturprofizienten ATM<sup>+/+</sup>-Mäusen nur eine sehr geringe Akkumulation nach jeder Fraktion beobachtet.

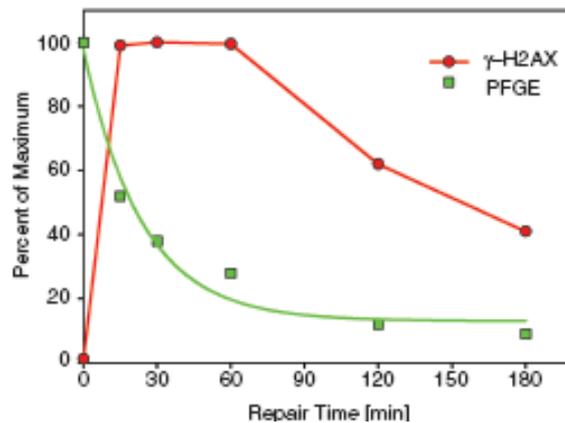
Bei ATM<sup>+/-</sup>-Mäusen, deren genetisch determinierter geringer DSB-Reparaturdefekt in der Einzeitbestrahlung nicht nachgewiesen werden konnte, akkumulierten auftretende DSB mit zunehmender Anzahl an Fraktionen in überproportionaler Weise. Ein kleiner genetisch bedingter DSB-Reparaturdefekt führt demnach im Laufe einer fraktionierter Bestrahlung zu einer starken Akkumulation von DNA-Schäden in Normalgeweben.

### 5.1 Betrachtungen zur Methodik

Im Mittelpunkt der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methodik steht die  $\gamma$ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung. Diese weist bei der Detektion von DSB zahlreiche Vorteile im Vergleich zu physikalischen Methoden, wie der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), auf. Der größte Vorteil ist, dass mittels  $\gamma$ -H2AX DSB auch bei Dosen unter 5 Gy, also Dosen, die in einem therapeutisch relevanten Bereich liegen, detektiert werden können (Rothkamm und Löbrich, 2003). Zur Messung von DSB im Gewebe ist sie die derzeit sensitivste Methode.

Allerdings weist diese Immunfluoreszenzmethode auch Nachteile auf, die bei der Betrachtung der Ergebnisse bedacht werden müssen. Im Gegensatz zu direkt induzierten, stochastisch verteilten DSB führen auch einzelsträngige DNA-Bereiche in Replikationsgabeln über eine Aktivierung von ATR zur Phosphorylierung von H2AX (Ward und Chen, 2001). Außerdem kommt es während der DNA-Fragmentation im Rahmen der Apoptose zur Phosphorylierung von H2AX (Mukherjee *et al.*, 2006). Auch im Rahmen aktiver Zellzyklus-Phasen werden  $\gamma$ -H2AX-Foci beobachtet, die nicht im Zusammenhang mit DNA-Reparaturvorgängen zu sehen sind (McManus *et al.*, 2005). Damit spiegeln  $\gamma$ -H2AX-Foci nicht in jedem Fall DSB wider.

$\gamma$ -H2AX bildet außerdem nicht immer den aktuellen Status des DSB ab, sondern stellt vielmehr metabolische Veränderungen dar, die im Rahmen der Initiierung einer optimalen DSB-Reparatur auftreten. Dies wird ersichtlich aus der Kinetik von Auftreten und Verschwinden der Foci (siehe Abb. 14).



**Abb. 14:  $\gamma$ -H2AX-Kinetik**

Vergleich der DSB-Reparaturkinetik ermittelt mit Pulsfeld-Gelelektrophorese mit der Entwicklung der  $\gamma$ -H2AX Foci anhand von Plateau-Phase A549 Zellen. Zu berücksichtigen ist die unterschiedliche Dosis von 20 Gy bei der PFGE und 1 Gy bei der  $\gamma$ -H2AX-Untersuchung. (aus Kinner et al., 2008)

$\gamma$ -H2AX-Foci können wenige Minuten nach Bestrahlung dargestellt werden. Das Maximum der Phosphorylierung wird ca. 30 min später erreicht. Bei der PFGE können DSB unmittelbar nach Bestrahlung gemessen werden. Es kommt sofort zur Abnahme der DSB, sodass nach ca. 20 min noch 50% der induzierten DSB messbar sind. Somit ergibt sich zum Zeitpunkt von 1 h nach Bestrahlung eine große Diskrepanz zwischen mit der PFGE gemessenen DSB und  $\gamma$ -H2AX-Foci. Diese Diskrepanz könnte sich durch chemische oder genetische Veränderungen, die die Phosphorylierungs-Kaskade von H2AX betrifft, vergrößern (Kinner *et al.*, 2008).

Die verzögerte  $\gamma$ -H2AX-Kinetik kann mit der benötigten Zeit zur biochemischen Ausbildung der Foci erklärt werden. Bei der Betrachtung der absoluten Ergebnisse gilt es, diese verzögerte Kinetik nach Induktion bzw. kurzen Reparaturzeitpunkten zu beachten. Nach langen Reparaturzeitpunkten ergibt sich aus diesem Sachverhalt allerdings kein Problem. Da in der vorliegenden Arbeit vor allem lange Reparaturzeiten von 24 h betrachtet wurden, ist diese Problematik von geringerer Relevanz. Es kann davon ausgegangen werden, dass jeder DSB durch je einen  $\gamma$ -H2AX-Focus dargestellt wird.

## 5.2 Diskussion der Versuchsergebnisse

Mithilfe des in dieser Arbeit gewählten Versuchsaufbaus konnten unterschiedliche DSB-Reparaturkapazitäten nach fraktionierter Bestrahlung bei verschiedenen Genotypen aufgedeckt werden.

Bei SCID<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich eine deutliche Akkumulation von DSB bereits nach 3 Fraktionen. Schon nach einmaliger Bestrahlung mit 2 Gy war ein signifikanter Unterschied in der DSB-Reparatur zwischen SCID<sup>-/-</sup>-Mäusen und den beiden anderen untersuchten Genotypen (ATM<sup>+/+</sup>; ATM<sup>+/-</sup>) erkennbar. Dies kann mit dem relativ großen Reparaturdefekt dieser Mäuse erklärt werden, der durch eine DNA-PKcs-Defizienz entsteht und betont die zentrale Stellung dieser Kinase in der DSB-Reparatur.

Interessanterweise wurde nach fraktionierter Bestrahlung auch in reparaturprofizienten ATM<sup>+/+</sup>-Mäusen eine Akkumulation von DSB nach fraktionierter Bestrahlung gezeigt. Dies erscheint zunächst erstaunlich, da in dieser Arbeit die Reparaturzeit 24 h betrug und bislang davon ausgegangen wurde, dass die meisten subletalen DNA-Schäden nach Bestrahlung innerhalb von sechs Stunden repariert werden. Allerdings zeigte sich nach einem bestrahlungsfreien 72 h-Intervall nach 5 x 2 Gy eine Erholung des Gewebes, sichtbar an einer deutlichen Reduktion residueller DSB. Die Reparatur scheint demnach auch nach 24 h noch nicht abgeschlossen zu sein.

Auch in ATM<sup>+/-</sup>-Mäusen kam es zu einer Summation nicht reparierter DSB im Rahmen einer fraktionierten Bestrahlung. Obwohl sich, verglichen mit ATM<sup>+/+</sup>-Mäusen, nach Einzeitbestrahlung mit 2 Gy kein Unterschied in der DSB-Reparatur zeigte, konnte bereits nach 3 x 2 Gy ein deutlicher, signifikanter Unterschied in der Akkumulation von DSB nachgewiesen werden.

Es konnte jedoch keine Erholung nach 72 h festgestellt werden. Diese Beobachtung wird gestützt durch vorangegangene Untersuchungen, die zeigen, dass ATM-defiziente Zellen den Großteil der auftretenden DSB normal, eine bestimmte Subgruppe jedoch nicht reparieren können (Kühne *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich vermutlich um Heterochromatin-assoziierte DSB (Goodarzi *et al.*, 2008). ATM ermöglicht über die Phosphorylierung von KAP1 (Krüppel-associated box (KRAB)-associated protein (KAP)-1) den Zugang zum Heterochromatin. Ist ATM in der Zelle nicht vorhanden, erfolgt keine Relaxation des Heterochromatins und die DSB verbleiben unrepariert. Diese unreparierten DSB addieren sich im Falle einer erneuten Bestrahlung zu neu induzierten DSB, von denen wiederum ein gewisser Anteil nicht repariert werden kann.

### 5.3 Ergebnisse im Kontext der Literatur

#### 5.3.1 Bestrahlung von ATM<sup>+/-</sup>-Mäusen

Als eine Ursache von früh- und spätauftretenden Normalgewebsreaktionen nach strahlentherapeutischer Behandlung werden zunehmend genetisch-bedingte Veränderungen von Proteinen, die an der DNA-Schadensantwort beteiligt sind, diskutiert. Genpolymorphismen, die mit einer erhöhten klinischen Strahlensensibilität assoziiert sind, sind u.a. Mutationen im XRCC1-, ATM-, TGFβ1- und NBS-Gen (Fernet und Hall, 2004).

Heterozygote Mutationen im ATM-Gen treten mit einer Prävalenz von 1 % auf (Swift *et al.*, 1991). Bei AT-heterozygoten Menschen konnte eine Neigung zur Entwicklung von Malignomen, insbesondere ein erhöhtes Brustkrebsrisiko, festgestellt werden (Swift *et al.*, 1976; Swift *et al.*, 1991). Zusätzlich wurden in AT-heterozygoten Mäusen verschiedenste Formen von abnormen Reaktionen auf ionisierende Strahlung nachgewiesen (Worgul *et al.*, 2002; Worgul *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2005; Smilenov *et al.*, 2001; Weil *et al.*, 2001). In klinischen Studien konnte bei AT-heterozygoten Patienten eine deutlich erhöhte Strahlensensibilität in Form von schweren Normalgewebsreaktionen nach strahlentherapeutischer Behandlung gezeigt werden (Ho *et al.*, 2007; Angele *et al.*, 2003).

Kato *et al.* untersuchten in einer Studie Zellen AT-heterozygoter Mäuse mit einer trunkierenden Mutation (Kato *et al.*, 2006a). Diese Zellen wurden mit einer kontinuierlichen Niedrig-Dosis-Bestrahlung von 100 mGy/h behandelt und anschließend im γ-H2AX-Assay ausgewertet. Im Vergleich zu ATM<sup>+/+</sup>-Mäusen und ATM<sup>-/-</sup>-Mäusen respektive deren Zellen, lagen die Werte für AT-heterozygote Mäuse intermediär. In einer ähnlich konzipierten Studie wurden Fibroblasten von Menschen aus AT-Familien untersucht (Kato *et al.*, 2006b). Dabei handelte es sich jeweils um einen ATM<sup>-/-</sup>-betroffenes Kind, dessen heterozygote Eltern sowie Geschwister unterschiedlichen Genotyps. Dabei zeigte sich ein DSB-Reparaturdefekt AT-heterozygoter Zellen. In beiden Untersuchungen konnte dieser Defekt nicht mittels einer 1 Gy Hoch-Dosis-Bestrahlung aufgedeckt werden.

In der vorliegenden Studie handelt es sich, verglichen mit der Mausstudie von Kato *et al.*, um die gleiche trunkierende Mutation (Kato *et al.*, 2006a). Allerdings wurde in dieser Arbeit komplexes Normalgewebe untersucht. Die Induktion und Reparatur der DSB erfolgte *in vivo*. Dies ist von Bedeutung, da Zell-Zell-Kontakte und physiologische Bedingungen in lebenden Organismen Einfluss auf die DSB-Reparatur haben können.

Während nach Einzeitbestrahlung bzw. Hoch-Dosis-Bestrahlung kein Unterschied zwischen  $ATM^{+/+}$  und  $ATM^{+/-}$  festgestellt werden konnte, ist dieses nach fraktionierter bzw. kontinuierlicher Niedrig-Dosis-Bestrahlung möglich. Die vorliegende Arbeit bekräftigt einerseits die Untersuchungen von Kato *et al.*, die einen DSB-Reparaturdefekt in AT-heterozygoten Zellen aufdecken konnten. Auf der anderen Seite dehnt unsere Arbeit diese Ergebnisse auf Gewebe aus und verdeutlicht die Auswirkungen eines solchen Reparaturdefektes auf komplexes Normalgewebe insbesondere nach fraktionierter Bestrahlung.

Eine fraktionierte Bestrahlung unter klinischen Bedingungen (Bestrahlung mit je 2 Gy, bestrahlungsfreies Intervall 24 h) führt demnach in  $ATM^{+/-}$ -Gewebe zu einer starken Akkumulation von DSB. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die beobachtete erhöhte klinische Strahlensensibilität AT-heterozygoter Menschen sein und bekräftigt die Hypothese, dass auch kleine, genetisch determinierte DNA-Reparaturdefekte, insbesondere nach fraktionierter Bestrahlung, durch eine Akkumulation von DSB Ursache schwerer Normalgewebsreaktionen und erhöhter Strahlensensibilitäten sein können.

### 5.3.2 Normalgewebsreaktionen

Die Bedeutung unreparierter DSB für die Entwicklung von Normalgewebstoxizitäten ist sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden. Zur Erklärung von frühen und späten Normalgewebsreaktionen wurde lange Zeit die sogenannte Ziel-Zell-Hypothese (*target-cell hypothesis*) herangezogen, wonach die Schwere von Normalgewebsreaktionen als Resultat direkter Zelltötungen mutmaßlicher Zielzellen zu sehen sein sollte. Diese Hypothese wurde vor allem im Zusammenhang mit späten Normalgewebsreaktionen in Frage gestellt, weil sie nicht erklären konnte, wie beispielsweise die Tötung von Fibroblasten zu einer verstärkten Kollagenproduktion im Rahmen von Fibrosierungen zu Stande kommt.

Heute geht man davon aus, dass ionisierende Strahlung eine abgestimmte biologische Antwort des Gewebes hervorruft, die vor allem aus einer Aktivierung von inflammatorischen Cytokinen und Chemokinen besteht (Rübe *et al.*, 2005; Bentzen 2006). Im Verlauf kommt es zur Zellproliferation, Zelldifferenzierung und einer komplexen interzellulären Kommunikation.

Neuere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen persistierenden DNA-Schäden und einer Sekretion von inflammatorischen Zytokinen nachweisen (Rodier *et al.*, 2009).

Während milde DNA-Schäden (hervorgerufen durch Bestrahlung mit 0.5 Gy) nur vorübergehend die DNA-Schadensantwortkaskade initiieren und zu einem transienten Zellzyklusarrest führen, führt stärkerer genotoxischer Stress (z.B. Bestrahlung mit 10 Gy) zu einer persistierenden DNA-Schadensantwort, in deren Verlauf sich nach einigen Tagen eine ATM-, NBS1- und CHK2-abhängige Zytokinantwort ausbildet.

Zu diesen inflammatorischen Zytokinen gehören u.a. Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8), die Entzündungsreaktionen hervorrufen und bei der Entstehung von Normalgewebstoxizitäten beteiligt sind (Okunieff *et al.*, 2008). Persistierende DNA-Schäden begünstigen demnach die Sekretion inflammatorischer Zytokine und ermöglichen damit einer geschädigten Zelle, ihren gefährdeten Status den Umgebungszellen mitzuteilen.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse liegt ein Vorteil der vorliegenden Arbeit darin, dass die akkumulierten DNA-Schäden, die im Verlauf der fraktionierten Bestrahlung auftraten, direkt im Normalgewebe visualisiert wurden. Dadurch konnten diese Schäden im Kontext anderer pathophysiologischer zellulärer und molekularer Prozesse, die im Rahmen von Normalgewebstoxizitäten auftreten, analysiert werden. So konnten unreparierte DSB direkt im Zusammenhang mit pathomorphologischen Veränderungen betrachtet werden. Beispielsweise zeigte sich nach einer Gesamtdosis von 10 Gy im Dünndarm von SCID<sup>-/-</sup>-Mäusen eine komplett zerstörte Mukosa mit multiplen fokalen Erosionen. Als eine Folge dieser akuten Dünndarmschädigung überlebte nur eine SCID<sup>-/-</sup>-Maus die Bestrahlung mit 5 x 2 Gy.

### 5.3.3 Organspezifische Unterschiede

In der vorliegenden Arbeit wurde die DSB-Reparatur anhand von zwei verschiedenen Organgeweben untersucht, die sich hinsichtlich ihrer Strahlenbiologie deutlich unterscheiden. Dünndarmgewebe gehört zu den früh-reagierenden Geweben, während Herzgewebe den spät-reagierenden Geweben zugerechnet wird. Es wird angenommen, dass sich diese beiden Gewebetypen sowohl hinsichtlich ihrer Reparaturkapazität als auch hinsichtlich ihrer Reparaturkinetik unterscheiden (Thames *et al.*, 1984). Spät-reagierende Gewebe sollen strahleninduzierte DNA-Schäden suffizienter, aber auch langsamer reparieren können als früh-reagierende Gewebe. Zudem weisen spät-reagierende Gewebe eine größere Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Dosis pro Fraktion auf.

In diesem *in vivo* Experiment konnten solche Unterschiede der Reparaturkapazität und -kinetik nicht bestätigt werden. Nach Einzeitbestrahlung mit 2 Gy wurde bei allen Genotypen eine nahezu identische Reparaturkinetik in beiden untersuchten Organgeweben festgestellt. Auch nach fraktionierter Bestrahlung wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der DSB-Reparatur beider Organe beobachtet. Dies bezieht sich sowohl auf reparaturprofiziente als auch –defiziente Mausstämmen.

Allerdings wird zunehmend diskutiert, dass die unterschiedliche Strahlensensibilität vor allem auf die unterschiedliche Strahlenantwort einzelner Subgruppen von Zellen, wie gewebespezifischen Stamm- und Vorläuferzellen, zurückzuführen ist. Im Dünndarm beispielsweise befinden sich diese Zellen in den Krypten und machen prozentual nur einen geringen Anteil aus. Die im Kryptengrund lokalisierten Stammzellen des Dünndarms gelten als sehr strahlensensibel, während die Vorläuferzellen strahlenresistenter sind. Nach Bestrahlung sollen die zugrundegegangenen Stammzellen durch dedifferenzierte Vorläuferzellen ersetzt werden (Harfouche und Martin, 2010).

Die identische Reparaturkapazität, die in diesem Experiment festgestellt wurde, könnte der Tatsache zugeschrieben werden, dass diese Stamm- und Vorläuferzellen bei der Auswertung nicht gesondert berücksichtigt wurden. Es wurden lediglich differenzierte, nicht-proliferierende Epithelzellen ausgewertet, die sich an der Schleimhautoberfläche befinden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung führen somit zu der Schlussfolgerung, dass eine unterschiedliche Strahlensensibilität früh- und spät- reagierender Organgewebe nicht auf eine unterschiedliche DSB-Reparatur ihrer ausdifferenzierten Zellen zurückzuführen ist.

#### 5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen den Einfluss insbesondere kleiner, genetisch determinierter DNA-Reparaturdefekte auf die DSB Reparatur nach fraktionierter Bestrahlung. Es konnte mit zunehmender Gesamtdosis eine starke Akkumulation von DSB in Normalgeweben beobachtet werden. Dabei wurden in dieser Arbeit strahlendinduzierte DNA-Schäden in ihrer physiologischen, gewebepezifischen Umgebung analysiert.

Somit kommen auch kleine Reparaturdefekte als Ursache von schweren Normalgewebsreaktionen nach strahlentherapeutischer Behandlung in Frage, da akkumulierte DSB über komplexe molekulare und zelluläre Interaktionen, wie die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, zu Normalgewebstoxizitäten führen.

Die Pathogenese von Normalgewebstoxizitäten nach strahlentherapeutischer Behandlung ist aufgrund ihrer Komplexität noch nicht ausreichend gut verstanden. Diese Arbeit soll daher einen Beitrag zum besseren Verständnis schwerer Normalgewebsreaktionen leisten, um zukünftig die Möglichkeiten zu verbessern, diese im klinischen Alltag zu vermeiden oder zu reduzieren.

**6 Literaturverzeichnis**

- (1) Abraham RT (2004) PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA repair* 3:883-887
- (2) Angele S, Romestaing P, Moullan N, Vuillaume M, Chapot B, Friesen M, Jongmans W, Cox DG, Pisani P, Gerard JP, Hall J (2003) ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: Association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res* 63:8717-8725
- (3) Araki R, Fujimori A, Hamatani K, Mita K, Saito T, Mori M, Fukumura R, Morimyo M, Muto M, Itoh M, Tatsumi K, Abe M (1997) Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc Natl Acad Sci* 94:2438-2443
- (4) Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506
- (5) Barnett GC, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PDP, Burnet NG (2009) Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer* 9:134-142
- (6) Begg AC (2006) Can the severity of normal tissue damage after radiation therapy be predicted? *PLoS Med* 3:440.
- (7) Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J (2006) Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* 173:195-206
- (8) Bentzen SM (2006) Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 6:702-713
- (9) Bentzen SM, Overgaard J (1994) Patient-to-Patient variability in the expression of radiation-induced normal tissue injury. *Semin Radiat Oncol* 4:68-80.
- (10) Bhogal N, Jalali F, Bristow RG (2009) Microscopic imaging of DNA repair foci in irradiated normal tissues. *Int J Radiat Biol* 18:1-15
- (11) Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, Smith GCM, Demengeot J, Gottlieb TM, Mizuta R, Varghese AJ, Alt FW, Jeggo PA, Jackson SP (1995) Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine *scid* mutation. *Cell* 80:813-823
- (12) Boder E, Sedgwick RP (1958) Ataxia-teleangiectasia: a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous teleangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* 21:526-554
- (13) Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:297-308

- (14) Cary RB, Peterson SR, Wang J, Bear DG, Bradbury EM, Chen DJ (1997) DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4267-4272
- (15) Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296:922-927
- (16) Chan DW, Lees-Miller SP (1996) The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 271:8936-8941
- (17) Chen G, Lee EYHP (1996) The product of the ATM gene is a 370-kDa nuclear phosphoprotein. *J Biol Chem* 271:33693-33697
- (18) Chun HH, Gatti RA (2004) Ataxia-teleangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair* 3:1187-1196
- (19) Concannon P (2002) ATM heterozygosity and cancer risk. *Nat Genet* 32:89-90
- (20) Connell PP, Hellman S (2009) Advances in radiotherapy and implications for the next century: a historical perspective. *Cancer Res* 69:383-392
- (21) De Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C (2001) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* 8:1129-1135
- (22) DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J* 21:3192-3200
- (23) Engels WR, Johnson-Schitz D, Flores C, White L, Preston CR (2007) A third link connecting aging with double strand break repair. *Cell Cycle* 6:131-135
- (24) Fernet M, Hall J (2004) Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. *DNA Repair* 3:1237-1243
- (25) Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, Malaise EP (1997) Hypersensitivity of ataxia teleangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 72:271-283
- (26) Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NGJ, Lange K, Lathrop GM, Leppert M, Nakamura Y, O'Connell P, Paterson M, Salser W, Sanal O, Silver J, Sparkes RS, Susi E, Weeks DE, Wei A, White R, Yoder F (1988) Localization of an ataxia-teleangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 336:577-580
- (27) Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Löbrich M, Jeggo PA (2008) ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* 31:167-177

- (28) Gottlieb TM, Jackson SP (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72:131–142
- (29) Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388:492–495
- (30) Hall EJ, Brenner DJ, Worgul B, Smilenov L (2005) Genetic susceptibility to radiation. *Adv Space Res* 35:249-253
- (31) Harfouche G, Martin MT (2010) Response of normal stem cells to ionizing radiation: A balance between homeostasis and genomic stability. Article in press.
- (32) Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: Ten years after. *Mol Cell* 28:739-745
- (33) Ho AY, Atencio DP, Peters S, Stock RG, Formenti SC, Cesaretti JA, Green S, Haffty B, Drumea K, Leitzin L, Kuten A, Azria D, Ozsahin M, Overgaard J, Andreassen CN, Trop CS, Park J, Rosenstein BS (2006) Genetic predictors of adverse radiotherapy effects: the Gene-PARE project. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65:646-655
- (34) Ho AY, Fan G, Atencio DP, Green S, Formenti SC, Haffty BG, Iyengar P, Bernstein JL, Stock RG, Cesaretti JA, Rosenstein BS (2007) Possession of ATM sequence variants as predictor for late normal tissue responses in breast cancer patients treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69:677-684
- (35) Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:36-374
- (36) Huyen Y, Zgheib O, Di Tullio Jr RA, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432:406-411
- (37) Karmakar P, Piotrowski J, Brosh Jr RM, Sommers JA, Lees-Miller SP, Cheng WH, Snowden CM, Ramsden DA and Bohr VA (2002) Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase in vivo and in vitro, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* 277:18291–18302
- (38) Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Genik PC, Little JB, Bedford JS (2006a) Gamma H2AX foci after low-dose-rate irradiation reveal atm haploinsufficiency in mice. *Radiat Res* 166:47-54
- (39) Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Little JB, Bedford JS (2006b) Levels of gamma-H2AX Foci after low-dose-rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two families and in another apparently normal individual. *Radiat Res* 166:443-453
- (40) Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247-254

- (41) 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
- (42) Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB (2004) Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS-BRCA1 pathway. *Genes Dev* 18:1423-1438
- (43) Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M, Tauschi H (2008) Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res* 49:93-103
- (44) Kühne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Löbrich M (2004) A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res* 64:500-508
- (45) 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
- (46) Lee JH, Paull T (2005) ATM activation by DNA double-strand-breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science* 308:551-554
- (47) Lees-Miller SP, Sakaguchi K, Ullrich SJ, Appella E, Anderson CW (1992) Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serine 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol* 12:5041-5049
- (48) Linding R, Jensen LJ, Ostheimer GJ, van Vugt MATM, Jorgensen C, Miron AM, Diella F, Colwill K, Taylor L, Elder K, Metalnikov P, Nguyen V, Pasculescu A, Jin J, Park JG, Samson LD, Woodgett JR, Russell RB, Bork P, Yaffe MB, Pawson T (2007) Systematic discovery of *in vivo* phosphorylation networks. *Cell* 129:1415-1426
- (49) Lloyd DC, Purrott PJ, Dolphin GW, Edwards AA (1976) Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by neutron irradiation. *Int Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 29:169-182
- (50) Löbrich M, Jeggo PA (2007) The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 7:861-869
- (51) Louis-Bar D (1941) Sur un syndrome progressif comprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. *Confinia Neurologica* 4:32-42
- (52) Mahaney BL, Meek K, Lees-Millers SP (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double-Strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 417:639-650
- (53) Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimimi N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316:1160-1166

- (54) McManus KJ, Hendzel MJ (2005) ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16:5013-5025
- (55) Meek K, Gupta S, Ramsden DA, Lees-Miller SP (2004) The DNA-dependent protein kinase: the director at the end. *Immunol Rev* 200:132-141
- (56) 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* 41:12706–12714
- (57) Meyn MS (1999) Ataxia-teleangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet* 55:289-304
- (58) Morgan WF, Corcoran J, Hartmann A, Kaplan MI, Limoli CL, Ponnaiya B (1998) DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutat Res* 404:125-128
- (59) Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, de Villartay JP (2001) Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105:177–186
- (60) Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi , Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S (2006) DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair* 5:575-590
- (61) O’Driscoll M, Jeggo PA (2006) The role of double-strand break repair – insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7:45-54
- (62) Okunieff O, Chen Y, Maguire DJ, Huser AK (2008) Molecular markers of radiation-related tissue toxicity. *27:363-374*
- (63) Olive PL (1998) The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res* 150:42-51
- (64) Orii KE, Lee Y, Kondo N, McKinnon PJ (2006) Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10017–10022.
- (65) Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A (2009) DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 66:1039-1056
- (66) Peterson SR, Kurimasa A, Oshimura M, Dynyn WS, Bradbury EM, Chen DJ (1995) Loss of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase in DNA double-strand-break-repair mutant mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3171-3174
- (67) Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GCM, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M

- (2004) A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to  $\gamma$ -H2AX Foci. *Mol Cell* 16:715-724
- (68) Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11:973-979
- (69) Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin involved in DNA-double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-916
- (70) Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-strand breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868
- (71) Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23:5706-5715
- (72) 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 USA* 100:5057-5062.
- (73) Rube CE, Dong X, Kühne M, Fricke A, Kästner L, Lipp P, Rube C (2008a) DNA double-strand break rejoining in complex normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14:6546-6555
- (74) Rube CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rube C (2008b) DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* 14:6546-6555
- (75) Rube CE, Uthe D, Wilfert F, Ludwig D, Yang K, König J, Palm J, Schuck A, Willich N, Remberger K, Rube C (2005) The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61:1482-1492
- (76) Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM (2002) Quantitative detection of <sup>125</sup>IIdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158:486-492
- (77) Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA (2008) Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18:134-147
- (78) Smilenov LB, Brenner DJ, Hall EJ (2001) Modest increased sensitivity to radiation oncogenesis in ATM heterozygous versus wild-type mammalian cells. *Cancer Res* 61:5710-5713
- (79) 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

- 
- (80) Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123:1213-1226
- (81) Stucki M, Jackson SP (2004) MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair* 3:953-957
- (82) Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL (1991) Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-teleangiectasia. *N Engl J Med* 325:1831-1826
- (83) Swift M, Sholman L, Perry M, Chase C (1976) Malignant neoplasms in the families of patients with Ataxia-teleangiectasia. *Cancer Res* 36:209-215
- (84) Syllaba L, Henner K (1926) Contribution à l'étude de l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique. *Revue neurologique* 1:541-560
- (85) Thames HD Jr. (1984) Effect-independent measures of tissue responses to fractionated irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 45:1-10
- (86) Thames HD Jr., Withers HR, Peters LJ (1984) Tissue repair capacity and repair kinetics deduced from multifractionated or continuous irradiation regimens with incomplete repair. *Br J Cancer Suppl* 6:263-269.
- (87) van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2:196-206
- (88) Wang J, Boerma M, Fu Q, Hauer-Jensen M (2007) Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *World J Gastroenterol* 13:3047-3055
- (89) Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276:47759-47762
- (90) Weil MM, Kittrell FS, Yu Y, Mc Carthy M, Zabriskie RC, Ullrich RL (2001) Radiation induces genomic instability and mammary ductal dysplasia in *Atm* heterozygous mice. *Oncogene* 20:4409-4411
- (91) Worgul BV, Smilenov L, Brenner DJ, Junk A, Zhou W, Hall EJ (2002) *Atm* heterozygous mice are more sensitive to radiation-induced cataracts than are their wild-type counterparts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9836-9839
- (92) Worgul BV, Smilenov L, Brenner DJ, Vazquez M, Hall EJ (2005) Mice heterozygous for the *ATM* gene are more sensitive to both X-ray and heavy ion exposure than are wildtypes. *Adv Space Res* 35:254-259
- (93) Wyman C, Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 40:363-383

- 
- (94) Yoo S, Dynan WS (1999) Geometry of a complex formed by double-strand break repair proteins at single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* 27:4679-4685

## 7 Publikationen/ Dank

Rübe CE, Fricke A, Wendorf J, **Stützel A**, Kühne M, Ong MF, Lipp P, Rübe C (2010)  
Accumulation of DNA double-strand breaks in normal tissues after fractionated irradiation.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 76:1206-1213

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Herrn Prof. Dr. med. Ch. Rübe, sowie der Leiterin des Labors für molekulare Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Frau PD Dr. med. C. E. Rübe, für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Förderung von wissenschaftlichem Interesse.

Weiterhin danke ich Dr. rer. nat. Andreas Fricke für die engagierte Betreuung und große Hilfsbereitschaft. Vielen Dank auch an Dr. rer. nat. Martin Kühne für die Mitbetreuung der Arbeit und das Wecken des Interesses am Thema.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Mei Fang Ong vom Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und medizinische Informatik des Universitätsklinikums des Saarlandes für das Erstellen der statistischen Analyse sowie Daniela Ludwig und Ma Hong für die Unterstützung im Labor. Außerdem bedanke ich mich bei Juliane Wendorf für die Motivation und Hilfestellung beim praktischen Teil der Arbeit.

Der wohl größte Dank gilt meiner Familie. Danke für das Ermöglichen des Studiums und die andauernde Unterstützung in allen Bereichen meines Lebens.

Ich danke außerdem meinem Freund Thorsten Keßler für die Hilfe beim Umgang mit Excel und die moralische Begleitung während dieses Studiums. Vielen Dank auch an meine Freunde und Kommilitonen, die während dieser Zeit ein offenes Ohr für mich hatten.

**8 Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: DSB-Reparaturmechanismen (Pardo *et al.*, 2009)
- Abbildung 2: Schematische Darstellung von ATM (modifiziert nach Lavin, 2008)
- Abbildung 3: ATM-Aktivierung und Signalkaskade (modifiziert nach Lavin, 2008)
- Abbildung 4: CT-Plan für Ganzkörperbestrahlung
- Abbildung 5: Isodosenverteilung
- Abbildung 6a: Poisson-Verteilung/ Verteilung der Anzahl der Zellen auf die Anzahl der Foci pro Zelle (Dünndarm)
- Abbildung 6b: Poisson-Verteilung/ Verteilung der Anzahl der Zellen auf die Anzahl der Foci pro Zelle (Herz)
- Abbildung 7: Ergebnisse der Einzeitbestrahlung (Dünndarm)
- Abbildung 8: Ergebnisse der Einzeitbestrahlung (Herz)
- Abbildung 9: DAPI-/ $\gamma$ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung muriner Organgewebe nach 2 Gy/ 24h
- Abbildung 10: Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung beim Dünndarm
- Abbildung 11: Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung beim Herz
- Abbildung 12: DAPI-, 53BP1- und  $\gamma$ -H2AX-Färbung von Dünndarm nach 10 Gy/24 h in der x100 Vergrößerung (Dünndarm)
- Abbildung 13: DAPI-, 53BP1- und  $\gamma$ -H2AX-Färbung von Dünndarm nach 10 Gy/24 h in der x100 Vergrößerung (Herz)
- Abbildung 14:  $\gamma$ -H2AX-Kinetik (Kinner *et al.*, 2008)

**9 Lebenslauf**

Name: Stützel

Vorname: Annika Birte

Adresse: Kaiserstraße 73  
66424 Homburg

Geburtsdatum: 24.08.1985

Geburtsort: Filderstadt

Familienstand: ledig

Eltern: Prof. Dr. Hartmut Stützel  
Annemarie Weiner-Stützel, geb. Weiner

Schulbildung: 1991-1993 Grundschule Kirchheim/ Teck  
1993-1995 Grundschule Otternhagen  
1995-1997 Orientierungsstufe Süd, Neustadt am Rübenberge  
1997-2004 Gymnasium Neustadt am Rübenberge,  
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Abitur) Juni 2004

Praktikum: Juni 2004 - September 2004  
Pflegepraktikum im Krankenhaus Neustadt a. Rbge. der Region  
Hannover

Studium: seit Oktober 2004  
Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes  
August 2006  
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
seit März 2007  
Promotion an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

seit August 2009  
Praktisches Jahr  
1. Tertial: Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, SHG Klinikum  
Merzig  
2. Tertial: Klinik für Innere Medizin, Länssjukhuset Ryhov, Jönköping,  
Schweden  
3. Tertial: Klinik für Chirurgie und Unfallchirurgie, SHG Klinikum  
Merzig