

Aus dem Institut für Strahlentherapie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof Dr. med C. Rube

**Nachweis von geringen DNA-Reparaturdefekten mittels
 γ -H2AX-Immunfluoreszenz**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von: Karin Eva Simon
geboren am: 21.09.1983 in Trier

| | |
|--|-----------|
| I. Verzeichnis der Abkürzungen | 5 |
| II. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen | 6 |
| 1. Zusammenfassung/Summary | 8 |
| 2. Einleitung | 10 |
| 2.1. Strahlenbiologische Grundlagen | 12 |
| 2.1.1. Direkte und Indirekte Strahlenschäden | 12 |
| 2.1.2. DNA-Doppelstrangbrüche | 13 |
| 2.2. Die Zelluläre Stressantwort | 14 |
| 2.2.1. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) | 15 |
| 2.2.2. DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) | 18 |
| 2.2.3. γ -H2AX | 19 |
| 2.3. DNA-Doppelstrangbruch-Reparatursysteme | 21 |
| 2.3.1. Homologe Rekombination | 22 |
| 2.3.2. Nicht-homologe End-Verknüpfung | 23 |
| 2.4. Tumor-Prädispositionssyndrome | 25 |
| 2.4.1. Ataxia teleangiectasia (Louis-Bar-Syndrom) | 25 |
| 2.4.1.1. Heterozygote ATM-Mutationen | 28 |
| 2.4.2. Ataxia-teleangiectasia-like-Disorders (ATLD) | 28 |
| 2.4.3. Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) und Ligase IV-Defizienz | 29 |
| 2.5. Fragestellung | 31 |
| 3. Material und Methoden | 33 |
| 3.1. Geräte und Materialien | 33 |
| 3.2. Chemikalien und Zusammensetzung verwendeter Lösungen | 34 |
| 3.2.1. Chemikalien | 34 |
| 3.2.2. Lösungen | 34 |
| 3.2.3. Antikörper | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3. Probanden | 36 |
| 3.4. Methoden | 37 |
| 3.4.1. Blutentnahme | 37 |
| 3.4.2. Röntgenbestrahlung | 37 |
| 3.4.3. Lymphozytenisolierung und Zellkultur | 38 |
| 3.4.3.1. PBMC | 38 |
| 3.4.3.2. Zellkultur | 38 |
| 3.4.4. γ -H2AX-Immunofluoreszenz-Färbung | 38 |
| 3.4.5. Auswertung der γ -H2AX-Foci | 39 |
| 3.4.6. Statistische Auswertung | 39 |
| 4. Ergebnisse | 40 |
| 4.1. Nachweis eines DNA-DSB-Reparaturdefektes bei heterozygoter ATM-Mutation | 40 |
| 4.1.1. DNA-DSB-Reparaturkinetiken in Lymphozyten nach Bestrahlung von Vollblut | 41 |
| 4.1.2. DNA-DSB-Reparaturkinetiken in Lymphozyten nach Bestrahlung isolierter Lymphozyten | 42 |
| 5. Diskussion | 48 |
| 5.1. Klinische Relevanz der untersuchten Fragestellung | 48 |
| 5.2. Betrachtungen zur Methodik | 50 |
| 5.2.1. γ -H2AX-Immunfluoreszenz zum Nachweis erhöhter Strahlensensibilität | 50 |
| 5.2.2. Vergleich der beiden Versuchsansätze | 52 |
| 5.3. Kritische Betrachtung der Ergebnisse | 53 |
| 5.4. Ergebnisse im Kontext der Literatur | 55 |
| 5.4.1. Erhöhte Strahlensensibilität bei Trägern heterozygoter ATM-Mutationen? | 55 |
| 5.5. Schlussfolgerung | 57 |

| | |
|--------------------------------|-----------|
| 6. Literaturverzeichnis | 58 |
| 7. Publikation | 78 |
| 8. Danksagung | 79 |
| 9. Lebenslauf | 80 |

I. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| Art | Artemis-Protein |
| AT | Ataxia Teleangiectasia |
| ATLD | <i>Ataxia Teleangiectasia-like disease</i> |
| ATM | <i>Ataxia teleangiectasia mutated</i> |
| ATR | <i>Ataxia teleangiectasia mutated-rad3-related</i> |
| CT | Computertomographie |
| DNA | <i>desoxiribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure) |
| DNA-PK | DNA-abhängige Proteinkinase |
| DNA-PKcs | katalytische Untereinheit der DNA-PK |
| DSB | DNA-Doppelstrangbruch |
| G1-Phase | erste <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus |
| G2-Phase | zweite <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus |
| Gy | Gray |
| HR | Homologe Rekombination |
| LIG | Ligase |
| MRN | MRE11-RAD50-NBS1 |
| NBS | Nijmegen-Breakage-Syndrom |
| NHEJ | Nicht-homologes End-Joining |
| PFGE | Pulsfeld-Gelelektrophorese |
| PIKK | <i>Phosphatidyl-inositol-3-kinase-like-kinase</i> |
| SCID | <i>Severe combined immunodeficiency</i> |
| S-Phase | Synthese-Phase im Zellzyklus |
| Ser1981 | Serin 1981 |
| XRCC | <i>X-Ray repair cross complementing</i> |

II. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb.1: Darstellung der Aktivierung von Signal-Transduktionskaskaden nach dem Auftreten von DNA-DSBs.

Abb.2: Übersicht über die zellulären Substrate von ATM und deren Wirkung auf die Zelle (aus: Shiloh et al., 2004)

Abb.3: Schematische Darstellung des Anteils von HR und NHEJ an der Reparatur strahleninduzierter DSBs in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus.

Abb. 4: Schematische Darstellung der Homologen Rekombination.

Abb. 5: Schematische Darstellung der Nicht-homologen End-Verknüpfung.

Abb. 6: DNA-DSB-Reparaturkinetik in Lymphozyten von Trägern homozygoter ($ATM^{-/-}$) und heterozygoter ATM-Mutationen ($ATM^{+/-}$) verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$) nach Bestrahlung des Vollblutes mit 1Gy.

Abb. 7: DNA-DSB-Reparaturkinetik in Lymphozyten von Trägern homozygoter ($ATM^{-/-}$) und heterozygoter ATM-Mutationen ($ATM^{+/-}$) verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$) nach Bestrahlung der zuvor isolierten Lymphozyten mit 1Gy.

Abb. 8: Anzahl der γ -H2AX-Foci 8h und 24h nach Bestrahlung mit 1Gy sowie 24h nach Bestrahlung mit 2Gy.

Abb. 9: Vergleich der DNA-DSB-Reparaturkinetik in Lymphozyten nach Bestrahlung von Vollblut und Bestrahlung isolierter Lymphozyten.

Tabelle 1: AT-Mutationen der heterozygoten Patienten.

Tabelle 2: AT-Mutationen der homozygoten Patienten.

Tabelle 3: Übersicht der Versuchsreihe.

1. Zusammenfassung/Summary

Fragestellung: Die Strahlentherapie ist eine der wichtigsten Therapieoptionen in der Behandlung maligner Erkrankungen. Trotz sorgfältiger Planungsprozesse und evaluierter Therapieprotokolle gibt es Patienten, die mit schwersten strahlenbedingten Nebenwirkungen auf diese Therapieform reagieren. Durch ionisierende Strahlung induzierte DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) gelten als eine der schwerwiegendsten Formen der DNA-Schädigung. Als Ursache für die zum Teil extrem unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit verschiedener Individuen werden genetische Faktoren diskutiert, die zu einer Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparaturmechanismen führen. Ataxia telangiectasia (AT) ist ein autosomal-rezessiv vererbtes Krankheitsbild, welches infolge einer defekten DNA-Reparatur eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit aufweist. Bei Trägern heterozygoter ATM-Mutationen vermutet man eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit. Als Ziel dieser Studie galt der Nachweis geringer DNA-DSB-Reparaturdefekte und somit erhöhter Radiosensitivität mit Hilfe der γ -H2AX-Foci-Analyse.

Material und Methoden: Die DNA-DSB-Reparaturkapazität von Trägern heterozygoter ATM-Mutationen wurde mit der Reparaturkapazität an AT erkrankter Probanden und einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die DSB-Reparaturkapazität wurde mittels γ -H2AX-Foci-Analyse in peripheren Lymphozyten zu definierten Zeitpunkten nach Bestrahlung von Blutproben untersucht.

Ergebnisse: Bei Trägern heterozygoter ATM-Mutationen verbleibt zu späteren Zeitpunkten (8h und 24h post-radiatio) eine signifikant höhere Anzahl unreparierter DSBs als bei gesunden Probanden. Dies ist als Hinweis auf einen Defekt im DNA-DSB-Reparaturmechanismus und eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit der Zellen zu werten.

Schlussfolgerung: Die γ -H2AX-Immunfluoreszenzmethode eignet sich als eine im klinischen Alltag durchführbare Screening-Untersuchung auf das Vorliegen geringer DSB-Reparaturdefekte. In Kenntnis der erhöhten Strahlenempfindlichkeit bestimmter Patienten ist es möglich, bestehende Therapiekonzepte vor Therapiebeginn so zu modifizieren, dass sie an die individuelle Therapietoleranz des Einzelnen angepasst sind. Unerwünschte Wirkungen können vermindert und somit langfristige Therapieerfolge verbessert werden.

Purpose: Radiation therapy is one of the most important therapeutic strategies in the treatment of cancer diseases. Despite accurate planning processes and evaluated treatment guidelines, some patients are suffering unexpected severe side effects after radiotherapy. DNA-double-strand-breaks (DSBs) are considered one of the most deleterious forms of DNA lesions induced by ionizing radiation. Genetic alterations in proteins participating in the DNA-damage response systems are discussed as cause for the variability of radiosensitivity in different individuals. Ataxia telangiectasia (AT) is an autosomal recessive inherited disease with increased radiosensitivity due to a defect DNA-DSB-damage response system. Increasing evidence suggests carriers of monoallelic ATM mutations to have an increased radiosensitivity. This study was performed to proof even slight defects in DNA-DSB-damage response systems and increased radiosensitivity via γ -H2AX-foci approach.

Methods and Materials: The DSB repair capacity of ATM heterozygote probands was analyzed compared to ATM homozygote probands and normal individuals. DSB repair was investigated by counting γ -H2AX-foci in blood lymphocytes at defined points of time after irradiation of blood samples.

Results: Carriers of monoallelic ATM mutations show a significant increased level of remaining γ -H2AX-foci at the later points of time (8h, 24h post-radiatio). This is evaluated as impairment of DSB repair capacity and increased radiosensitivity.

Conclusions: γ -H2AX-analysis of blood samples allows one to detect even slight DSB repair deficiencies in the clinical setting. Individuals at risk for severe side effects can be identified before starting a therapy and therapeutic strategies can be modified and adapted to the individual risk of the patient. Side effects can be avoided and the long-term outcome will be improved.

2. Einleitung

Die Strahlentherapie ist neben chirurgischer Behandlung sowie Chemo- und Antihormontherapie eine der wichtigsten Therapieoptionen in der Behandlung von Krebserkrankungen. Etwa jeder zweite an einem Malignom erkrankte Patient unterzieht sich im Laufe seines Lebens mindestens einmal einer Strahlentherapie (DKFZ, 2009). Sowohl in Form alleiniger Radiotherapie als auch als kombinierte Radio-Chemotherapie ist die Bestrahlung in vielen Fällen ein äußerst effektives Therapiekonzept.

Im Rahmen der Strahlentherapie wird durch die Exposition des Körpers mit ionisierender Strahlung eine Vielzahl an Schädigungen des Erbgutes induziert. Dabei gelten DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) als eine der schwerwiegendsten Formen der DNA-Schädigung. Überschreitet die Art und Anzahl der Schädigungen die DNA-Reparaturfähigkeit der Zelle, wird diese an der Teilung gehindert und gegebenenfalls direkt zur Apoptose gebracht. Da Tumorzellen in der Regel eine schlechtere DNA-Reparaturfähigkeit als gesunde Zellen haben, kann man durch die gezielte Bestrahlung der erkrankten Areale unter Schutz des umliegenden, gesunden Gewebes den gewünschten Effekt in Form von Proliferationshemmung und Elimination entarteter Zellen erzielen.

Dank komplexer, sorgfältiger Planungsprozesse im Vorfeld sowie einer Vielzahl evaluierter Therapiekonzepte für die unterschiedlichen Arten und Lokalisationen der Tumore ist die Strahlentherapie in vielen Fällen eine gut verträgliche Behandlungsmethode. Es gibt jedoch immer wieder Patienten, die mit schwersten strahlenbedingten Nebenwirkungen auf diese Therapieform reagieren, welche tödlich enden können. Als Ursache für die zum Teil extrem unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit verschiedener Individuen werden genetische Faktoren diskutiert.

Im Rahmen von Erkrankungen die mit einem Defekt der DNA-Reparaturkapazität einhergehen kommt es zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit der betroffenen Patienten. Ataxia telangiectasia (Louis-Bar-Syndrom) und Nijmegen-Breakage-Syndrom sind zwei Beispiele für solche Krankheitsbilder. Ihnen gemeinsam auf genetischer Ebene sind eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit und ein DNA-Reparaturdefekt, welche neben der erhöhten Strahlensensibilität auch für ein erhöhtes Malignomrisiko und einen Immundefekt der

Betroffenen verantwortlich sind. Generell scheinen Mutationen oder Polymorphismen in Genen, deren Genprodukte an der durch strahleninduzierte DNA-Schädigungen ausgelösten Signal- und/oder Reparaturkaskaden beteiligt sind, zu einer erhöhten Strahlensensibilität zu führen.

Bei Patienten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit ist mit einer deutlich verminderten Therapietoleranz zu rechnen, welche sich im häufigeren Auftreten schwerer strahlenbedingter Nebenwirkungen und Spätfolgen sowie strahleninduzierter Zweitmalignome verglichen mit der Normalbevölkerung äußert. Wäre man in der Lage, Patienten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit vor Beginn der Therapie einer Krebserkrankung zu identifizieren, würde man möglicherweise andere Therapieoptionen bevorzugen oder bestehende Therapiekonzepte frühzeitig modifizieren und somit an die individuelle Therapietoleranz des Patienten anpassen können. Das Risiko des Auftretens schwerer therapiebedingter Nebenwirkungen oder Zweittumore könnte minimiert und die langfristigen Therapieerfolge verbessert werden.

Ataxia telangiectasia (AT) ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Sie äußert sich in einem Symptomenkomplex aus gesteigerter Radiosensitivität, Immundefekt, progressiver cerebellärer Ataxie und erhöhtem Risiko für Malignome, welche in den meisten Fällen das lymphoretikuläre System betreffen. Die Inzidenz der Erkrankung beträgt 1:40000 bis 1:300000. Schätzungsweise 1% der Bevölkerung sind heterozygote Träger einer der bisher identifizierten, die Krankheit auslösenden Mutationen im *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) -Gen. Bei autosomal rezessivem Erbgang sollten diese heterozygoten Träger der Mutationen phänotypisch gesund sein. In jüngster Vergangenheit häuften sich jedoch die Anhalte dafür, dass heterozygote Träger der Mutationen verglichen mit der gesunden Bevölkerung häufiger an bestimmten Malignomen, z.B. Brustkrebs, erkranken und auch bei ihnen ein geringer DNA-DSB-Reparaturdefekt besteht. Prinzipiell ist eine kurative Therapie der in diesem Rahmen auftretenden Malignome möglich. Aufgrund des DNA-Reparaturdefektes ist mit einer verminderten Therapietoleranz und somit einem häufigeren Auftreten von Nebenwirkungen und Strahlenspätfolgen sowie therapiebedingten Zweitmalignomen zu rechnen.

Die Tatsache, dass diese heterozygoten Mutationen bei etwa einer von einhundert Personen bestehen, bedeutet, dass ein erheblicher Anteil unserer Bevölkerung davon betroffen ist. In dieser Arbeit wurde die DNA-DSB-Reparaturkapazität bei Individuen mit bekannten

heterozygoten ATM-Mutationen mittels der γ -H2AX-Immunfluoreszenzmethode untersucht. Ziel war der Nachweis selbst geringer DNA-DSB-Reparaturdefekte mit dieser Methode. Die Untersuchung wurde im Hinblick auf die Etablierung der γ -H2AX-Immunfluoreszenzmethode als prädiktiven Test für eine erhöhte Strahlensensibilität im klinischen Alltag durchgeführt.

2.1. Strahlenbiologische Grundlagen

Die Bevölkerung ist ionisierender Strahlung im täglichen Leben ausgesetzt. Natürliche Strahlenquellen umfassen zum einen die kosmische Strahlung der Sonne und des Weltalls, zum anderen natürliche radioaktive Substanzen welche in der Erde und im menschlichen Körper vorkommen.

Der zunehmende medizinische Gebrauch ionisierender Strahlen im Rahmen der diagnostischen Radiologie, der Nuklearmedizin, der interventionellen Radiologie und der Strahlentherapie ist die größte vom Menschen selbst verursachte Strahlenbelastung für den Körper. Dabei ist die Computertomographie-Untersuchung mit einem nur geringen Anteil von wenigen Prozent an insgesamt durchgeführten Untersuchungen für fast 50% der Strahlenexposition im medizinischen Bereich verantwortlich (UNSCEAR, 2000).

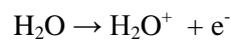
2.1.1. Direkte und Indirekte Strahlenschäden

Prinzipiell lässt sich ionisierende Strahlung unterteilen in elektromagnetische Wellen und Teilchenstrahlung. Elektromagnetische Strahlung wird weiter unterteilt in Röntgen- und γ -Strahlung, bei der Teilchenstrahlung unterscheidet man Strahlung aus Elektronen, Protonen, α -Teilchen und schweren Ionen. Die Absorption von sowohl elektromagnetischer als auch Teilchenstrahlung führt im Gewebe zu Ionisierungen. Die daraus resultierenden DNA-Schäden lassen sich einteilen in direkte und indirekte Strahlenschäden (Friedberg *et al.*, 2006).

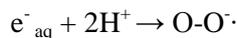
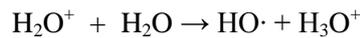
Bei direkten Strahlenschäden wird die Strahlungsenergie direkt auf die DNA übertragen und führt zur Ionisierung von Basen oder Zuckerphosphaten. Das kann zur Spaltung kovalenter

Bindungen z.B. im Zucker-Phosphat-Rückgrat und somit auf direktem Wege zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führen (Löbrich *et al.*, 1996).

Die indirekte Schädigung der DNA erfolgt zum größten Teil durch Zwischenprodukte der Radiolyse von Wasser, d.h. der Zerlegung chemischer Bindungen des Wassermoleküls unter Einwirkung ionisierender Strahlung. Ca. 99% der Strahlenenergie entfällt auf die Radiolyse von Wasser, deren Verlauf durch die Entstehung freier Elektronen sowie Hydroxyl- und Wasserstoffradikale gekennzeichnet ist. In diesem Zusammenhang entsteht zunächst ein kurzlebiges und hochreaktives Wasser- Radikalkation:



Im Anschluss kommt es zur Bildung verschiedener, langlebigerer Substanzen, u.a. Wasserstoffperoxid, welche mit der DNA interagieren können:



Obwohl 99% der insgesamt absorbierten Energie ionisierender Strahlung auf die Radiolyse des Wassers entfällt, entstehen nur ca. $\frac{2}{3}$ der durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Schäden auf indirektem Wege. $\frac{1}{3}$ wird verursacht durch die direkte Strahlenwirkung auf die DNA im Zellkern (Riley, 1994; Friedberg *et al.*, 2006).

2.1.2. DNA-Doppelstrangbrüche (DSB)

DNA-DSBs gelten als eine der schwerwiegendsten Formen der DNA-Schädigung. DSBs werden verursacht durch exogene Einflüsse wie ionisierende Strahlung und bestimmte chemische Agenzien und Chemotherapeutika. Sie entstehen aber auch gezielt im Rahmen endogener Prozesse wie der meiotischen Rekombination, der V(D)J- Rekombination - dem Mechanismus zur Generierung der großen Vielfalt an Antigen-Bindungsstellen von

Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren - und des Immunglobulin-Klassenwechsels (Scott und Pandita, 2006). Des Weiteren entstehen sie durch den schädigenden Einfluss der im Rahmen des oxidativen Stoffwechsels auftretenden freien Radikale (Riley, 1994).

Die Fähigkeit zur Reparatur von DSBs stellt eine der wichtigsten biochemischen Funktionen für das Überleben der Zelle dar (Giaccia *et al.*, 1985). Unreparierte DSBs können durch den Verlust genetischen Materials in permanentem Zellzyklusarrest, Apoptose oder mitotischem Zelltod enden (Olive, 1998). Infolge fehlerhafter DSB-Reparatur kann es zur Karzinogenese durch chromosomale Translokationen, Inversionen oder Deletionen kommen (Lengauer *et al.*, 1998; van Gent *et al.*, 2001). Deshalb sind eine funktionierende Zellantwort und die Fähigkeit zur Reparatur von DSBs für die Erhaltung der genomischen Integrität und das Überleben der Zelle von essentieller Bedeutung.

2.2. Die Zelluläre Stressantwort

Das Auftreten von DSBs innerhalb einer Zelle führt zur Aktivierung verschiedener Signal-Transduktionskaskaden mit dem Ziel, die DNA-Schädigung zu beseitigen.

Zu Beginn einer klassischen Signalkaskade stehen Sensor-Proteine, welche entweder die DNA-Schädigung direkt oder mögliche Chromatin-Veränderungen als Folge der DNA-Schädigung erkennen. Diese Sensor-Proteine übermitteln ein Signal an Proteine, welche ihrerseits das Signal verstärken und, abhängig von der Art der DNA-Schädigung, an die entsprechenden Effektor-Proteine weiterleiten. Diese sogenannten „Transducer“ starten innerhalb kürzester Zeit eine Vielzahl an Signalwegen und leiten somit die zelluläre Stressantwort ein. Die zelluläre Stressantwort besteht entweder in der Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen oder, im Falle einer zu schwerwiegenden DNA-Schädigung, in der Eliminierung der Zelle durch die Apoptose - den programmierten Zelltod (Shiloh Y., 2003; Bakkenist und Kastan, 2004).

Um mehr Zeit für die Reparatur zur Verfügung zu stellen und um zu verhindern, dass fehlerhafte DNA in der Zelle repliziert wird bzw. die Zelle mit geschädigter DNA in die Mitose eintritt, muss durch Zellzyklusarrest über die Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten die Progression vorübergehend gestoppt werden (Abb.1).

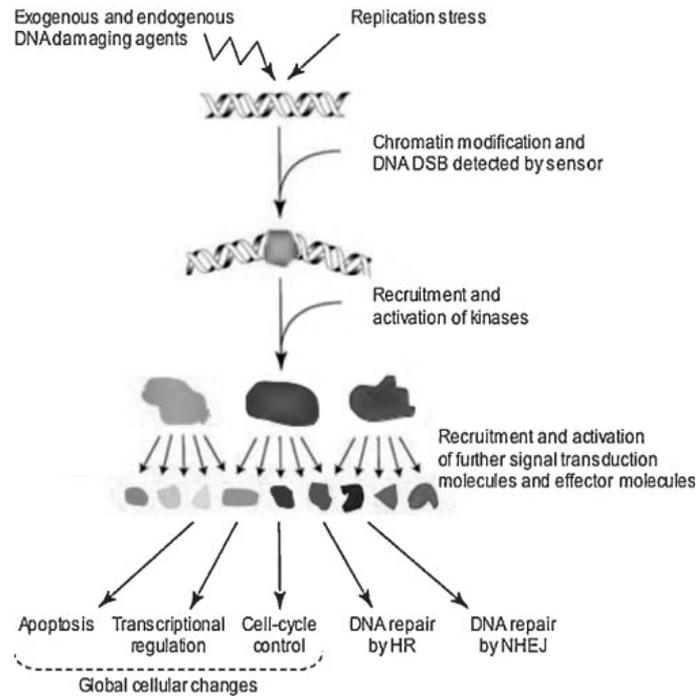


Abb.1 Darstellung der Aktivierung von Signal-Transduktionskaskaden nach dem Auftreten von DNA-DSBs.

Sensor-Proteine erkennen die Läsion direkt oder die dadurch bedingten Chromatin-Veränderungen. Unterschiedliche an der Zellantwort beteiligte Kinasen werden rekrutiert und aktiviert, welche wiederum nachgeschaltete Moleküle aktivieren. Es kommt zur Aktivierung verschiedener Effektor-Proteine, welche den Zellzyklusarrest und die Reparaturmechanismen einleiten. Bei zu schwerwiegender DNA-Schädigung wird die Apoptose eingeleitet (aus: Scott und Pandita, 2006).

2.2.1. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)

Eines der wichtigsten Sensor- und „Transducer“- Proteine in dieser Signalkaskade ist die Proteinkinase ATM - *Ataxia telangiectasia mutated*.

Die genetische Information für ATM ist lokalisiert auf Chromosom 11q22-23, erstreckt sich über etwa 150 Kilobasen genetischer DNA und beinhaltet 66 Exons (Gatti *et al.*, 1988). Dieses Gen codiert eine 350kDa (3056 Aminosäuren) große Proteinkinase, welche in der Nähe des Carboxyl (C)-Terminus eine PI3-Kinase-Domäne besitzt und somit der PIKK-Familie zugeordnet werden kann (Savitsky *et al.*, 1995; Lavin *et al.*, 1995; Brown *et al.*,

1997). Diese Gruppe von Lipid- und Proteinkinasen ist beteiligt an der Kontrolle des Zellzyklus und der Erkennung von DNA-Schäden. ATM besitzt Serin/Threonin-Kinase-Aktivität und spielt die zentrale Rolle im Anstoß von Signalkaskaden nach dem Kontakt der Zelle mit ionisierender Strahlung oder anderen DSB-induzierenden Agenzien (Watters *et al.*, 1997; Canman *et al.*, 1998; Kastan und Lim, 2000).

In unbestrahlten Zellen liegt ATM in Form inaktiver Dimere oder höher geordneter Multimere vor, bei welchen jeweils die Kinase-Domäne mit einer inneren Domäne des benachbarten ATM-Moleküls interagiert. Diese Interaktion ist notwendig für die korrekte Faltung der Moleküle zu stabilen Strukturen in der Zelle; gleichzeitig ist es ATM so nicht möglich, andere zelluläre Substrate zu phosphorylieren.

Infolge der Exposition mit ionisierender Strahlung kommt es zu einem rapiden Anstieg der Kinase-Aktivität um ein Vielfaches. Zu keinem Zeitpunkt erfolgt jedoch ein Konzentrationsanstieg der ATM-Moleküle in der Zelle (Lakin *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997). Die Aktivierung erfolgt zum einen über intermolekulare Autophosphorylierung von ATM-Molekülen, welche auf diesem Weg zu aktiven ATM-Monomeren gespalten werden (Bakkenist und Kastan, 2003). Dabei phosphoryliert die Kinase-Domäne eines ATM-Moleküls das unweit des C-Terminus lokalisierte Serin 1981 des mit ihm interagierenden ATM-Moleküls. Die Phosphorylierung an Ser1981 bewirkt die Abspaltung des entsprechenden ATM-Moleküls, wodurch sämtlichen zellulären Substraten der Zugang zu dessen Kinase-Domäne ermöglicht wird. Unlängst konnten weitere Autophosphorylierungsstellen an Ser1893 und Ser367 identifiziert werden, welche ebenfalls im Rahmen der Autophosphorylierung an der Aktivierung von ATM beteiligt zu sein scheinen (Kozlov *et al.*, 2006).

Die Aktivierung von ATM geschieht jedoch nur zu einem geringen Teil durch direktes Erkennen und Binden des DSBs. Bereits 5 min nach Bestrahlung einer Zelle mit 0,5Gy, einer Dosis, die in einer Säugetierzelle nur ca. 18 DSBs induziert, liegen 50% der in der Zelle vorhandenen ATM-Moleküle in phosphorylierter d.h. aktivierter Form vor. Die hohe Geschwindigkeit dieser Reaktion nach Auftreten der DSBs ist ein Zeichen dafür, dass weitere Sensoren an Rekrutierung und Aktivierung von ATM beteiligt sein müssen.

Der primäre Sensorkomplex für DSBs ist der Mre11-Rad50-NBS1/XRS2 (in *S. cerevisiae*)-Komplex. Der MRN-Komplex akkumuliert als erstes an Stellen geschädigter DNA, bindet diese und bearbeitet mittels Nuclease-Aktivität die Bruchenden (D'Amours und Jackson,

2002). Der MRN-Komplex spielt die zentrale Rolle in der Rekrutierung und Aktivierung von ATM (Uziel *et al.*, 2003) sowie der Einleitung der DSB-Reparaturmechanismen, insbesondere der homologen Rekombination (Yang *et al.*, 2006). Die im Rahmen der DNA-Schädigung auftretenden Chromatinveränderungen sind ebenfalls beteiligt an der ATM-Aktivierung (Bakkenist und Kastan, 2003).

Aktiviertes ATM unterliegt im weiteren Verlauf über Phosphorylierung und Acetylierung dem ständigen modulierenden Einfluss weiterer Faktoren, wie z.B. die PP2A-vermittelte Dephosphorylierung, welche zur ATM-Hemmung führt (Goodarzi *et al.*, 2004), die PP5-vermittelte ATM-Aktivierung (Ali *et al.*, 2004) oder die Tip60-vermittelte Acetylierung (Sun *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006).

Es beginnt eine Signalkaskade über die ATM-vermittelte Phosphorylierung verschiedener Substrate zur Einleitung der Zellantwort. Wichtige bisher identifizierte ATM-Substrate umfassen u.a. p53, Mdm2 und c-Abl zur Beeinflussung des G1-Kontrollpunktes; NbsS1, Rad51, BRCA1 und FANCD2 zur Aktivierung des strahleninduzierten S-Phase-Arrestes; BRCA1, Chk1 und Chk2 zur Regulation des G2-Kontrollpunktes des Zellzyklus sowie Histon H2AX zur Rekrutierung von Reparaturfaktoren an den Ort der DNA-Schädigung. Die Substrate von ATM haben somit wichtige Funktionen in der Regulation des Zellzyklusarrestes, der Einleitung von DSB-Reparaturkaskaden und der Apoptose (Shiloh Y., 2003; 2006) (Abb.2).

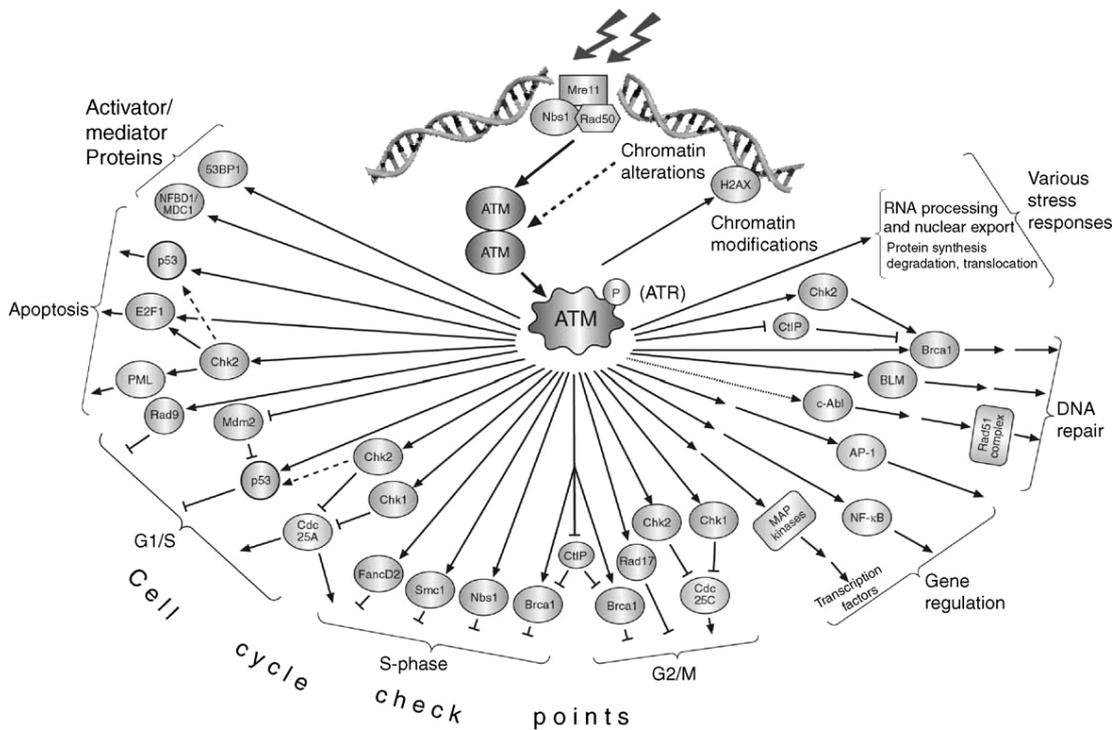


Abb.2: Übersicht über die zellulären Substrate von ATM und deren Wirkung auf die Zelle (aus: Shiloh *et al.*, 2004)

2.2.2. DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK)

Die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) setzt sich zusammen aus der 469kDa großen katalytischen Untereinheit DNA-PKcs, welche der PIKK-Familie zugeordnet wird und Serin-Threonin-Kinase-Aktivität besitzt, und einer regulatorischen Untereinheit bestehend aus dem Ku70/Ku80-Heterodimer-Protein. Die DNA-PK ist das zentrale Molekül im *Non-homologous End-Joining* (NHEJ), dem in Säugetierzellen vorherrschenden Mechanismus zur Reparatur von DNA-DSBs. Des Weiteren induziert die DNA-PK die Phosphorylierung von Histon H2AX zu γ -H2AX und leitet somit die Rekrutierung von Signal- und Reparaturfaktoren an den Ort der DNA-Schädigung ein (Park *et al.*, 2003). Defekte einzelner Komponenten dieses Moleküls führen zu einer unzureichenden DSB-Reparatur und somit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit des Organismus (Weterings und Chen, 2007).

Das Ku70/Ku80-Heterodimerprotein bindet die freien Bruchenden von DNA-DSBs und rekrutiert die DNA-PKcs zur Formierung des funktionsfähigen DNA-PK-Moleküls. Dieses ist ein dreidimensionaler Komplex aus je zwei freien DNA-Enden, zwei DNA-PKcs Molekülen und zwei Ku70/Ku80-Proteinen (Spagnolo *et al.*, 2006). Durch Formierung dieses Komplexes werden die beiden DNA-Enden in räumliche Nähe zueinander gebracht - die Grundvoraussetzung für eine später mögliche Ligation. Die Serin/Threonin-Kinase-Aktivität der katalytischen Untereinheit wird erst aktiv, wenn eine Bindung an Ku70/Ku80 und die DNA-Bruchenden stattgefunden hat. Die DNA-PKcs ist auch in Abwesenheit von Ku70/Ku80 dazu in der Lage DSBs zu erkennen und zu binden, dies jedoch nur mit ca. 100fach schwächerer Affinität als in Anwesenheit von Ku70/Ku80 (Yaneva *et al.*, 1997).

Die Bindung der DNA-PKcs an die DNA verhindert den Zugang modulierender Enzyme und Ligasen zu den Bruchenden und hat somit eine schützende Funktion für die DNA. Befinden sich die beiden DNA-Enden in ausreichender räumlicher Nähe zueinander kommt es durch Autophosphorylierung der DNA-PKcs-Moleküle zu Konformationsänderungen, welche den prozessierenden Enzymen und Ligasen den Zugang zu den freien DNA-Enden ermöglichen (Chan *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2003; Block *et al.*, 2004; Meek *et al.*, 2007). Bisher konnten mehrere Autophosphorylierungsstellen im DNA-PKcs-Molekül identifiziert werden. Mutationen dieser Stellen führen zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit und DNA-DSB-Reparaturdefekten (Chan *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2003; Douglas *et al.*, 2002).

Unabhängig von der Autophosphorylierung scheinen weitere Substrate wie z.B. ATM an der Phosphorylierung der DNA-PKcs beteiligt zu sein und somit einen kontrollierenden und modulierenden Einfluss auf den Ablauf des NHEJ zu haben (Chen *et al.*, 2006).

2.2.3. γ -H2AX

Unmittelbar im Anschluss an die Exposition humaner Zellen mit ionisierender Strahlung oder anderen DSB-induzierenden Agenzien kommt es, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, zur Phosphorylierung von Histon H2AX. Phosphoryliertes H2AX bezeichnet man als γ -H2AX (Rogakou *et al.*, 1998).

In eukaryotischen Zellen liegt die DNA in komprimierter Form als Chromatin vor, einer höher geordneten Struktur zusammengesetzt aus DNA und Proteinen. Die elementare Einheit

von Chromatin ist das Nukleosom, ein Oktamer aus je zwei Histonen der Klassen H2A, H2B, H3 und H4, um welches sich ein etwa 147bp langer DNA-Abschnitt wickelt (Kornberg und Thomas, 1974; van Holde *et al.*, 1980). Die Histon-Klassen H2B, H3 und H4 unterscheiden sich untereinander, wenn überhaupt, nur in sehr kurzen Aminosäure-Sequenzen (Baxevanis *et al.*, 1996). Histon H2A wird unterteilt in die Subgruppen H2A1-H2A2, H2AZ und H2AX, welche charakteristische Aminosäure-Sequenzen enthalten, die im Laufe der Evolution konstant geblieben sind (Thatcher *et al.*, 1994; West *et al.*, 1980). H2AX unterscheidet sich von H2A1-H2A2 und H2AZ in der Sequenz der C-terminalen Region SQ(D/E)(I/L/Y)-(end). Das Serin in dieser Sequenz an Stelle 139 wird in humanen Zellen als Reaktion auf DSBs phosphoryliert und führt somit zur Bildung von γ -H2AX in unmittelbarer Nähe der DSBs (Rogakou *et al.*, 1998; Redon *et al.*, 2002).

Die Bildung von γ -H2AX ist einer der ersten Schritte in der zellulären Antwort auf DSBs und spielt eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Signal- und Reparaturfaktoren wie z.B. BRCA1, RAD50 und RAD51 an den Ort der DNA-Schädigung (Paull *et al.*, 2000). γ -H2AX-defiziente Zellen sind genetisch instabil und erhöht strahlenempfindlich (Bassing *et al.*, 2002; Celeste *et al.*, 2002). Die H2AX-Phosphorylierung erfolgt durch ATM (Burma *et al.*, 2001; Shiloh, 2003), ATR und die DNA-PK (Furuta *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003).

Pro DSB werden 0.03% des zellulären H2AX phosphoryliert. In humanen G1-Zellen verursacht jedes Gy ionisierender Strahlung 35-39 DSBs (Rothkamm *et al.*, 2003). Zum Zeitpunkt des Maximums der H2AX-Phosphorylierung liegt pro Gy Strahlendosis also schätzungsweise 1% des Gesamt-H2AX als γ -H2AX über eine Region von etwa 2×10^6 bp DNA vor (Rogakou *et al.*, 1999).

Ein fluoreszenzmarkierter Phosphoserin-Antikörper, welcher spezifisch an das phosphorylierte Ser139 bindet und so γ -H2AX-Foci bildet, ermöglicht den direkten Nachweis und somit die Beobachtung von Entstehung und Reparatur der DSBs. Durch Induktion einer definierten Anzahl an DSBs mittels Zerfall von ^{125}I konnte in Korrelation zur Anzahl der γ -H2AX-Foci bewiesen werden, dass pro DSB ein γ -H2AX-Focus gebildet wird, und somit ein Focus einem DSB entspricht (Sedelnikova *et al.*, 2002). Das gleiche Ergebnis wurde mittels Vergleich von γ -H2AX-Immunfluoreszenz und PFGE erhalten (Rothkamm *et al.*, 2003).

Die Messung von γ -H2AX-Foci ist eine außergewöhnlich sensitive Methode zur Quantifizierung von DSBs bereits nach minimalen Strahlendosen (1mGy) (Rothkamm *et al.*,

2003). γ -H2AX-Foci formieren sich gleichermaßen nach letalen und nicht-letalen Strahlendosen. Die γ -H2AX-Formation findet unabhängig von der Zellzyklusphase statt.

2.3. DNA-Doppelstrangbruch-Reparatursysteme

Der eukaryotischen Zelle stehen 2 Hauptreparaturmechanismen für DSBs zur Verfügung: die Homologe Rekombination (HR) und die Nicht-Homologe End-Verknüpfung (*Non-homologous end-joining*, NHEJ) (reviewed in Kanaar *et al.*, 1998; Khanna und Jackson, 2001; Karagiannis und El-Osta, 2004). Beide Mechanismen sind durch die Fähigkeit zur Reparatur strahleninduzierter DSBs essentiell für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität und ergänzen sich gegenseitig; sie sind jedoch in Abhängigkeit von der jeweiligen Zellzyklusphase zu einem unterschiedlichen Anteil an der Reparatur von DSBs beteiligt (Takata *et al.*, 1998; Rothkamm *et al.*, 2003) (Abb.3).

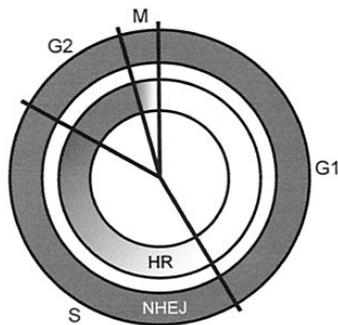


Abb.3: Schematische Darstellung des Anteils von HR und NHEJ an der Reparatur strahleninduzierter DSBs in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Während das NHEJ in der G1/frühen S-Phase den vorherrschenden Reparaturweg darstellt, sind während der späten S/G2-Phase sowohl HR als auch NHEJ maßgeblich an der Reparatur von DSBs beteiligt (aus: Rothkamm *et al.*, 2003).

Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal dieser beiden Reparaturwege besteht darin, dass das NHEJ nur eine fehlerhafte Reparatur gewährleisten kann, während die HR als sehr akkurat gilt. Dieser Unterschied ist in den unterschiedlichen Reparaturmechanismen begründet.

2.3.1. Homologe Rekombination

Die charakteristische Eigenschaft der HR ist die Verwendung homologer Sequenzen als Vorlage für eine sehr präzise und weitestgehend fehlerfreie DSB-Reparatur. In niederen Eukaryoten, z.B. Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*, ist die HR der Hauptreparaturweg für DSBs und findet in allen Zellzyklusphasen statt, wohingegen in höheren Eukaryoten wie Säugetieren die HR nur in der späten S- und G2-Phase stattfinden kann (Takata *et al.*, 1998).

Die Hauptfaktoren der HR in humanen Zellen sind die Komponenten der Rad52-Epistasisgruppe. Dazu gehören die Homologen der *S. cerevisiae*-Proteine Rad51, Rad52 und Rad54, sowie die Rad51-Paraloge XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C und Rad51D (Wood *et al.*, 2001).

Der primäre Sensorkomplex für DSBs ist der MRN-Komplex, welcher als erstes an Stellen geschädigter DNA akkumuliert, die Bruchenden bindet und bearbeitet und zur Einleitung der HR führt. Das Protein Mre11 bearbeitet mittels nukleolytischer Spaltung die Bruchenden in 5'-3'-Richtung und führt somit zur Bildung von 3'-Einzelstrang-Überhängen. Das Rad51-Protein bindet diese ssDNA mit Hilfe von RPA (Replication-Protein A), Rad54 und Rad52 und katalysiert nach Lokalisation homologer DNA-Sequenzen auf einem ungeschädigten DNA-Strang wie z.B. dem homologen Chromosom oder der Schwesterchromatide die Invasion des Einzelstranges in den homologen DNA-Strang (Jackson, 2002). Die in humanen Zellen identifizierten Rad51-Paraloge Rad51B, Rad51C und Rad51D sowie XRCC2 und XRCC3 vereinfachen vermutlich diesen Vorgang (Rodrigue *et al.*, 2006). Die Schwesterchromatide ist sowohl in Hefen als auch in höheren Eukaryoten für die HR die bevorzugte Matrize (Kadyk *et al.*, 1992; Dronkert *et al.*, 2000).

So werden die aus vier DNA-Einzelsträngen bestehenden Holliday-Strukturen gebildet, die entlang der DNA verschieblich sind. Am freien 3'-Ende der DNA kann DNA-Synthese stattfinden, wobei der intakte homologe Strang als Vorlage dient und die DNA-Synthese mit Hilfe der DNA-Polymerase 1 stattfindet. Im nächsten Schritt erfolgt nach Ligation der freien Enden durch die DNA-Ligase 1 die Auflösung der Holliday-Strukturen. Dabei können *Crossover* zwischen den beiden DNA-Strängen auftreten (Abb.4).

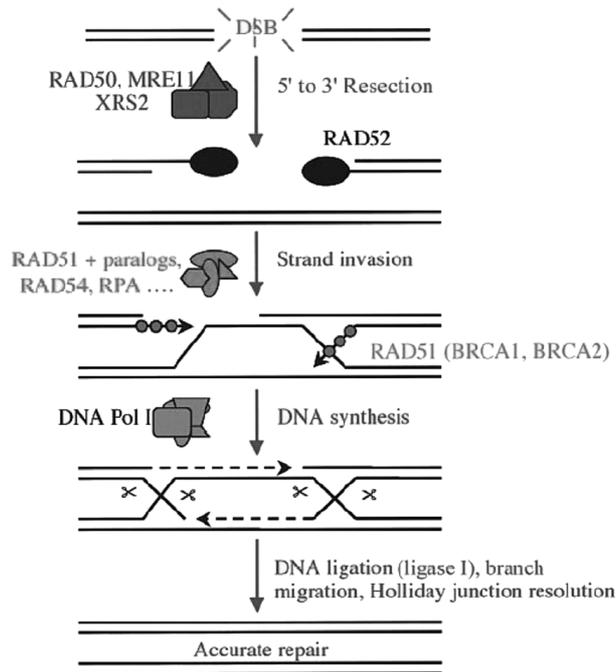


Abb. 4: Schematische Darstellung der homologen Rekombination. Der DSB wird durch den MRN-Komplex erkannt und prozessiert. Die Stranginvasion in den homologen DNA-Bereich wird u.a. von Rad51 katalysiert. Anschließend werden die freien Enden durch Neusynthese der DNA entlang der homologen Matrize verlängert. Nach Ligation der Enden werden die Holliday-Strukturen aufgelöst. (aus: Jackson, 2002)

2.3.2. Nicht-homologe End-Verknüpfung

Der vorherrschende DSB-Reparaturweg in höheren Eukaryoten wie Säugetierzellen ist die Nicht-homologe End-Verknüpfung (NHEJ) (Jeggo *et al.*, 1998). Es ist in der G0/G1-Phase des Zellzyklus der einzige DSB-Reparaturweg, spielt allerdings auch in allen anderen Zellzyklusphasen eine wichtige Rolle (Takata *et al.*, 1998; Lieber *et al.*, 2003; Rothkamm *et al.*, 2003). Beim NHEJ erfolgt die direkte End-zu-End-Verknüpfung zweier DNA-Bruchenden miteinander, ohne dass homologe DNA-Sequenzen als Vorlage benötigt werden. Dies kann in vielen Fällen zu einem Verlust von genetischer Information führen.

Das NHEJ erfolgt in 3 Schritten:

- (i) Bindung der freien Enden und Überbrückung des Bruchspaltes
- (ii) Bearbeitung der Bruchenden
- (iii) Ligation

(Pastwa E. und Blasiak J., 2003).

Die Bindung der beiden DNA-Bruchenden erfolgt durch das Ku70/Ku80-Heterodimer-Protein, welches freie DNA-Enden unabhängig von deren Nukleotidsequenz erkennt und bindet (Mimori und Hardin, 1986). Damit die DNA-Enden bearbeitet werden können, müssen sie in unmittelbare räumliche Nähe zueinander gebracht und diese Nähe während der gesamten Bearbeitungsschritte durch Nukleasen, Polymerasen und Ligasen aufrechterhalten werden. Das Zusammenführen der DNA-Bruchenden mit Hilfe des DNA-PK-Komplexes bezeichnet man als Synapsis (Lieber *et al.*, 2003). Dazu rekrutiert das Ku70/Ku80 Heterodimer-Protein die 469kDA große katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase - DNA-PKcs - zum DSB. Diese bildet zusammen mit dem Ku70/Ku80-Heterodimer und den DNA-Bruchenden das aktivierte DNA-PK Holoenzym.

Die DNA-PKcs ist eine Serin/Threoninkinase, welche ein DNA-Ende als Cofaktor binden muss um aktiviert zu werden. Unlängst wurde mit Artemis ein Protein mit Nuklease-Aktivität identifiziert, welches nach Phosphorylierung durch die DNA-PKcs mit dieser einen Komplex eingeht und der Entfernung von Einzelstrang-Überhängen dient (Ma *et al.*, 2002). Die Erkenntnis, dass Artemis-DNA-PKcs-lose Zellen eine extreme Strahlensensitivität nach Exposition mit ionisierender Strahlung aufweisen, lässt vermuten, dass außer diesen beiden keine weiteren Nukleasen im Verlauf des NHEJ beteiligt sind (Rooney *et al.*, 2003).

Um den DSB reparieren zu können müssen die freien DNA-Enden durch Nukleasen und/oder Polymerasen soweit bearbeitet werden, dass die Einzelstrangenden komplementäre Sequenzen aufweisen. Die Ligation der beiden Stränge kann prinzipiell an jeder komplementären Stelle erfolgen. Es besteht eine Neigung dazu, diese Verbindung an Orten zu erstellen, an denen sich 1-4 komplementäre Nukleotide zwischen den beiden Einzelsträngen befinden (Roth und Wilson, 1986). Die Einzelstränge werden mit Hilfe des XRCC4-DNA-Ligase4-Komplexes ligiert, höchstwahrscheinlich in Verbindung mit dem unlängst entdeckten XLF (Xrcc4-like factor)/ Cerunnos Protein (Ahnesorg *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass der XRCC4-DNA-Ligase4-Komplex in Abwesenheit der Ku-Proteine keinen stabilen Komplex mit der DNA bildet lässt vermuten, dass Ku an der Rekrutierung des Ligase-Komplexes an die Orte der DSBs maßgeblich beteiligt ist (Nick McElhinny *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000) (Abb.5).

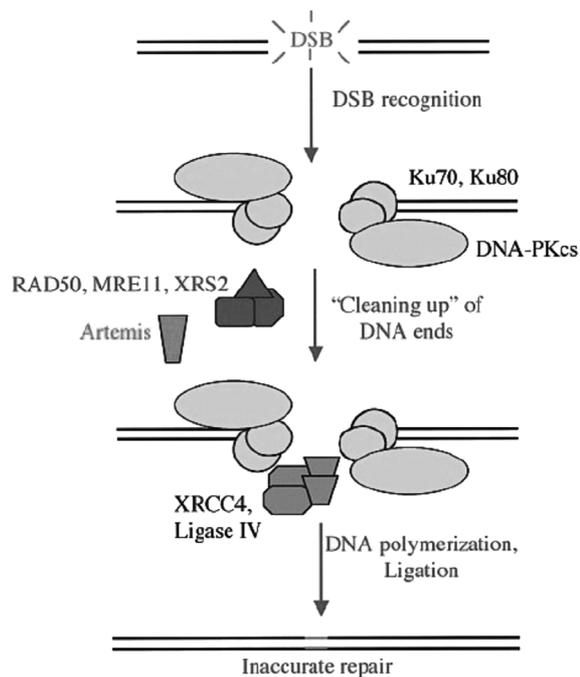


Abb. 5: Schematische Darstellung der Nicht-homologen End-Verknüpfung. An die Bruchenden binden das Ku70/Ku80-Heterodimer sowie die katalytische Untereinheit der DNA-PK und bilden das DNA-PK-Holoenzym. Nach Prozessierung der Enden rekrutieren diese den LigaseIV/XRCC4-Komplex, welcher die Enden verbindet (aus: Jackson, 2002).

2.4. Tumor-Prädispositionssyndrome

2.4.1. Ataxia telangiectasia (Louis-Bar-Syndrom)

Ataxia telangiectasia (AT, Louis-Bar-Syndrom) ist eine seltene hereditäre neurodegenerative Erkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang. Das erste Mal 1926 im Rahmen eines „case report“ beschrieben von Syllaba und Henner, wurde die Bezeichnung „Ataxia telangiectasia“ im Rahmen der klinisch-pathologischen Erkenntnisse 1957 von Boder und Sedgwick eingeführt, nachdem die klinischen Charakteristika bereits im Jahre 1941 durch Louis-Bar beschrieben worden waren.

Die Inzidenz der Erkrankung liegt weltweit bei 1:40000 bis 1:300000 (Woods *et al.*, 1990; Shiloh, 1997) und schätzungsweise 1% der Bevölkerung sind heterozygote Träger einer der die Krankheit auslösenden Mutationen.

Homozygote bzw. zusammengesetzt-heterozygote Mutationen im ATM-Gen führen zum klinischen Krankheitsbild von AT, welche neben erhöhter Strahlenempfindlichkeit, einem Immundefekt und Neurodegeneration gekennzeichnet ist durch chromosomale Instabilität und eine Prädisposition für Tumorerkrankungen, hauptsächlich des lymphoretikulären Systems.

Klinisch manifestiert sich die Erkrankung bereits im frühen Kindesalter in einer Symptomatik bestehend aus unkoordinierten (ataktischen) Bewegungen, welche auffallen sobald die Kinder zu laufen beginnen (12.-18. Lebensmonat), häufig assoziiert mit okularen Teleangiectasien welche typischerweise im Alter zwischen 2 und 8 Jahren offensichtlich werden und sich zunächst von den Augäpfeln über die periorbitale Hautregion bis zum Ohrbereich ausbreiten. Später können die Teleangiectasien am gesamten Körper auftreten. Die Betroffenen sind häufig bereits im 10./11. Lebensjahr rollstuhlpflichtig (McKinnon, 2004). Weitere Symptome umfassen eine Hyper- oder Hypopigmentierung der Haut, Choreoathetose und gonadale Sterilität.

Die Neurodegeneration ist gekennzeichnet durch den unaufhaltsamen Verlust der Kleinhirnfunktion, welcher sich klinisch neben progredienter Ataxie in Nystagmus und progressiver Dysarthrie äußert. Das pathologisch-anatomische Korrelat ist eine diffuse, progressive cerebelläre Atrophie, insbesondere des Vermis cerebelli, welche auf einer Degeneration der Purkinje- und Körnerzellschicht beruht (Farina *et al.*, 1994; Tavani *et al.*, 2003).

Der Immundefekt zeigt variable Ausprägungen und betrifft sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort. In den meisten Fällen liegt eine Verminderung oder komplette Abwesenheit der Antikörper IgA, IgE und IgG2 vor (Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2004). Der Thymus ist in vielen Fällen hypoplastisch oder nicht angelegt. Klinisch äußert sich die Defizienz des Immunsystems hauptsächlich in wiederkehrenden Sinusitiden, Otitiden, Bronchitiden und Pneumonien. Infektionen der unteren Atemwege stellen neben den Malignomen die häufigste Todesursache der Patienten dar. Trotz des Immundefektes sind systemische bakterielle oder schwere virale sowie opportunistische Infektionen ungewöhnlich.

Das Risiko eines homozygoten AT-Patienten, im Laufe seines Lebens an einem Malignom zu erkranken, beträgt etwa 20–30%; das relative Risiko für Malignome ist somit um den Faktor 61 gegenüber der Normalbevölkerung erhöht. Es erkranken etwa ein Drittel aller AT-

Patienten an Krebs, und die Mortalität durch Malignome ist verglichen mit einer gesunden pädiatrischen Population um mehr als das 100fache erhöht (Morrell *et al.*, 1986). Die vorherrschenden Malignome sind Lymphome wie Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome sowie lymphatische Leukämien von sowohl B- als auch T-zellulärer Genese. Durch den Defekt des ATM-Proteins können die im Rahmen der Maturation des Immunsystems entstehenden physiologischen DSBs nicht repariert werden.

Bislang sind mehr als 400 verschiedene Mutationen im ATM-Gen als Ursache für AT nachgewiesen worden. Man unterscheidet 2 Gruppen von Mutationen - *missense mutations* (ATM^{mis}) und *truncating mutations* (ATM^{trunc}) (Concannon *et al.*, 1997, Stankovic *et al.*, 1998, Gatti *et al.*, 1999). Die meisten führen zum kompletten Funktionsausfall von ATM; bei inkomplettem Funktionsausfall besteht eine Korrelation zwischen verbleibender ATM-Funktion und Ausprägungsgrad der Krankheit (Lakin *et al.*, 1996).

1967 beobachteten Gotoff *et al.* während der Bestrahlung eines an einem Lymphom erkrankten AT-Patienten eine „unpassende Reaktion“ auf die konventionelle Strahlendosis im Verlauf der Strahlentherapie (Gotoff *et al.*, 1967). In darauf folgenden Experimenten zeigten Fibroblasten von AT-Patienten eine außergewöhnliche Empfindlichkeit für ionisierende Strahlung (Taylor *et al.*, 1975). AT-Zellen fehlt einerseits die Fähigkeit, nach Exposition mit ionisierender Strahlung den Zellzyklus zu stoppen und somit die Replikation geschädigter DNA zu verhindern (Painter and Young, 1980). Des Weiteren verbleibt unabhängig vom initialen Schädigungsgrad immer eine bestimmte Anzahl unreparierter DSBs, welche zur erhöhten Strahlenempfindlichkeit der Patienten beiträgt (Kühne *et al.*, 2004).

Laborchemisch besteht eine Erhöhung des α -Fetoproteins, welche einen wichtigen Parameter in der klinischen Diagnostik darstellt und vermutlich bedingt ist durch die abnorme Regulation der RNA-Transkription in Abwesenheit von ATM (Lavin *et al.*, 2007).

Es treten gehäuft spontane chromosomale Translokationen auf (Stumm *et al.*, 2001), von denen die häufigsten Translokationen zwischen Chromosom 7 und 14 stattfinden (Aurias *et al.*, 1980).

Die Prognose ist sehr schlecht; die Patienten versterben häufig bereits vor dem 20. Lebensjahr. Die häufigsten Todesursachen sind Infektionen der unteren Atemwege und Malignome.

2.4.1.1. Heterozygote ATM- Mutationen

Ein kausaler Zusammenhang zwischen heterozygoten ATM-Mutationen und Tumorprädisposition wird kontrovers diskutiert (Procopova *et al.*, 2007). Trägerinnen heterozygoter ATM-Mutationen scheinen ein zwei- bis fünffach erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Mammakarzinoms im Vergleich zur Normalbevölkerung zu haben (Swift *et al.*, 1987; Athma *et al.*, 1996; Inskip *et al.*, 1999; Geoffrey-Perez *et al.*, 2001; Thorstenson *et al.*, 2003, Olsen *et al.*, 2005, Renwick *et al.*, 2006). Dabei scheint keine Korrelation zwischen dem Typ der Mutation (*truncating* vs. *missense mutation*) und der Prädisposition für Krebserkrankungen zu bestehen (Thompson *et al.*, 2005). Des Weiteren scheint eine Assoziation zwischen ATM-Heterozygotie und dem Auftreten von Tumoren des lymphatischen Systems zu bestehen (Stankovic *et al.*, 1998; Stankovic *et al.*, 2002; Gumy-Pause *et al.*, 2006; Gumy-Pause *et al.*, 2008). Mutationen im ATM-Gen und Defekte der ATM-Proteinkinase wurden auch bei nicht erkrankten Personen in Verbindung mit B-CLL, Mantelzelllymphom (MCL), T-Zell-prolymphatischer Leukämie (T-PLL) und Hodgkin-Lymphom in der Kindheit gebracht (Stankovic *et al.*, 2002).

Mögliche Ursache für das gehäufte Auftreten von Krebserkrankungen ist ein bei heterozygoten Trägern geringer als bei Erkrankten ausgeprägter DSB-Reparaturdefekt, welcher auch bei diesen Personen zu einer leicht erhöhten Strahlensensibilität führt (Kato *et al.*, 2006). In einigen Studien konnte eine erhöhte Rate an unerwünschten Strahlenspätfolgen bei heterozygoten Trägerinnen von ATM-Mutationen mit Mammakarzinomen und adjuvanter Radiatio nach brusterhaltender Operation beobachtet werden (Ianuzzi *et al.*, 2002). Insbesondere Patientinnen mit heterozygoter 5557 G→A Mutation zeigten hier signifikant häufiger Strahlenspätfolgen in Form subkutaner Fibrose im Bestrahlungsbereich (Andreassen *et al.*, 2006, Ho *et al.*, 2007). Ein Nachweis für eine erhöhte Radiosensitivität bei heterozygoter ATM-Mutation konnte bislang jedoch im Rahmen anderer Studien nicht erbracht werden (Weissberg *et al.*, 1998, Bremer *et al.*, 2003, Chargari *et al.*, 2009).

2.4.2. Ataxia-telangiectasia-like-disorders (ATLD)

Als Ataxia-telangiectasia-like-disorders wird eine sehr seltene heterogene Gruppe von Erkrankungen bezeichnet, die symptomatisch der AT ähneln, jedoch auf genetischer Ebene

eine andere Ursache aufweisen und sich im klinischen Verlauf von der klassischen AT unterscheiden. Bislang sind in der Literatur weniger als 20 Fälle beschrieben (Hernandez *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 2001; Delia *et al.*, 2004; Fernet *et al.*, 2005).

Die genetische Ursache für diese Erkrankung liegt in einer hypomorphen Mutation im Mre11-Gen, welches auf Chromosom 11q21, unweit der Codierungsstelle für ATM (11q23) lokalisiert ist (Petrini *et al.*, 1995, Steward *et al.*, 1999, Alsbeigh *et al.*, 2008).

In aller Regel repräsentieren die Patienten mildere Formen des klassischen AT Phänotyps, bei welchen sich die klinische Symptomatik später manifestiert. Die Erkrankung ist meist langsamer progredient, die Überlebenszeit länger und die Ausmaße der chromosomalen Instabilität und zellulären Strahlenempfindlichkeit geringer (Hernandez *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 2001). Bei den bisher beobachteten Patienten konnte kein Immundefekt nachgewiesen werden. Obwohl bislang keine Assoziation einer Mutation von Mre11 und Tumorprädisposition bekannt ist liegt nahe, dass eine Funktionseinschränkung des MRN-Komplexes durch Mutationen im Mre11-Gen, analog zum Nijmegen-breakage-Syndrom mit Mutationen im NBS1-Gen, mit der Entstehung maligner Tumore assoziiert sein könnte.

2.4.3. Nijmegen-breakage-Syndrom (NBS) und Ligase IV-Defizienz

Weitere Beispiele für Tumor-Prädispositionssyndrome und eine damit verbundene erhöhte Strahlensensibilität sind das Nijmegen-breakage-Syndrom (NBS) und die Ligase IV-Defizienz.

Das seltene, autosomal-rezessiv vererbte Nijmegen-breakage-Syndrom (NBS) beruht auf Mutationen im NBS1-Gen, dessen Genprodukt - Nibrin, NBS1 oder p95 - ein Bestandteil des Mre11-Rad50-NBS1-Komplexes ist. Die geschätzte Inzidenz beträgt weniger als 1:100000 (The International NBS Study Group, 2000).

Das NBS1-Gen ist lokalisiert auf Chromosom 8q21, erstreckt sich über 50 kb genetische DNA und codiert eine 95kDa (754 Aminosäuren) große Proteinkinase (Varon *et al.*, 1998, Matsuura *et al.*, 1998).

Es erkranken vorrangig Menschen slawischer Abstammung. Diese tragen zu über 90% die homozygote Mutation 657del5 (Chrzanowska *et al.*, 1995, Varon *et al.*, 2000), welche zur

Synthese eines verkürzten, nicht funktionsfähigen Proteins führt (Maser *et al.*, 2001). Die Häufigkeit heterozygoter Träger dieser Mutation in Tschechien liegt bei 1:150.

Die klinische Symptomatik ist gekennzeichnet eine erhöhte Strahlensensibilität, einen Immundefekt, genetische Instabilität und Prädisposition für Krebserkrankungen. Die Betroffenen zeigen keine Kleinhirnsymptomatik wie AT-Patienten, dafür jedoch andere Symptome wie Microcephalie, eine typische fasziale Dysmorphie (*bird-like face*), Minderwuchs und Hauterscheinungen (Vitiligo, Café-au-lait-Flecke). Angeborene Fehlbildungen, wie z.B. Syndaktylie/Clinodaktylie, treten bei 50% der Erkrankten auf. Bei etwa 60% der Patienten liegt eine meist geringe Intelligenzminderung vor. Infektionen der Atemwege sowie des Harntraktes sind üblich, in aller Regel handelt es sich um gewöhnliche und nicht um opportunistische Keime. Das Serum-alpha-Fetoprotein befindet sich im Gegensatz zur AT im Normbereich (The International NBS Study Group, 2000).

Ca. 40% der an NBS erkrankten Patienten entwickeln ein Malignom, in den meisten Fällen lymphoretikulären Ursprunges. Heterozygote Träger der Mutation 657del5 scheinen ein 2-3fach erhöhtes Risiko für Brustkrebs zu haben (Steffen *et al.*, 2004, Steffen *et al.*, 2006, Bogdanova *et al.*, 2008). Die 657del5-Mutation stellt in Populationen nicht-slawischen Ursprunges eine äußerste Rarität dar. Ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs bei heterozygoten Trägern anderer NBS1-Mutationen in diesen Populationen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Carlomagno *et al.*, 1999).

Hypomorphe Mutationen im DNA-Ligase4-Gen lösen das seltene, autosomal rezessiv vererbte Ligase4-Syndrom aus, bei welchem ein Defekt des NHEJ vorliegt.

Unter den bisher beschriebenen 6 Fällen befinden sich sowohl zusammengesetzt heterozygote (Riballo *et al.*, 1999, O`Driscoll *et al.*, 2001) als auch homozygote Mutationen (O`Driscoll *et al.*, 2001; Ben-Omran *et al.*, 2005). Die homozygote Mutation R278H führte in Kombination mit bekannten Polymorphismen des Lig4-Gens zu einer stärkeren klinisch-symptomatischen Ausprägung (Girard *et al.*, 2004).

Bei der Erkrankung ist die Ligase4 nur eingeschränkt funktionsfähig, was zu einem Defekt im NHEJ und somit zu genetischer Instabilität und einer defekten V(D)J-Rekombination führt (O`Driscoll *et al.*, 2001). Die Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten funktioniert normal. Der komplette Funktionsausfall von Lig4 ist nicht mit dem Leben vereinbar (Barnes

et al., 1998) und der Ausprägungsgrad der Erkrankung ist abhängig vom Ausmaß der verbleibenden Lig4-Funktion (Girard *et al.*, 2004).

Phänotypisch bestehen große Übereinstimmungen zum NBS. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch erhöhte Strahlenempfindlichkeit, einen Immundefekt, Panzytopenie, Entwicklungs- und Wachstumsverzögerung, Microcephalie und fasziale Dysmorphie. Bei 2 der bisher 6 berichteten Fälle entwickelte sich eine T-lymphoblastische Leukämie, was vermuten lässt, dass es sich auch hierbei um ein Tumor-Prädispositionssyndrom handelt (Ben-Omran *et al.*, 2005).

2.5. Fragestellung

Untersucht wurde die DSB-Reparaturkapazität junger Patienten mit Ataxia telangiectasia ($ATM^{-/-}$) und ihrer Verwandten ersten Grades als obligat heterozygote Träger der ATM-Mutationen ($ATM^{+/-}$) im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$). Das Ziel war, nicht nur den ausgeprägten DSB-Reparaturdefekt ($ATM^{-/-}$), sondern auch den gering ausgeprägten DSB-Reparaturdefekt bei den heterozygoten Trägern der ATM-Mutationen ($ATM^{+/-}$) mit Hilfe der γ -H2AX-Immunfluoreszenzmethode nachzuweisen.

Die Untersuchung erfolgte im Hinblick auf die Evaluation der γ -H2AX-Immunfluoreszenzmethode als eine im klinischen Alltag durchführbare Screening-Untersuchung auf das Vorliegen von DSB-Reparaturdefekten.

Es gibt eine ganze Reihe hereditärer Erkrankungen in der Bevölkerung, welche mit DSB-Reparaturdefekten einhergehen. Die damit häufig assoziierte Prädisposition für bestimmte Tumorerkrankungen sowie die erhöhte Radiosensitivität wirft die Notwendigkeit auf, Patienten als Träger von DSB-Reparaturdefekten vor Beginn einer Radio- und/oder Chemotherapie zu identifizieren. Bei diesen Patienten ist mit einer deutlich verminderten Therapietoleranz zu rechnen, welche sich im Auftreten zum Teil schwerster strahlenbedingter Nebenwirkungen und Spätfolgen äußert. In Einzelfällen können diese bis zum Tod führen.

Daher ist es notwendig, bestehende Therapiekonzepte in Kenntnis der DSB-Reparaturdefekte sowie der erhöhten Strahlenempfindlichkeit so zu modifizieren, dass sie an die individuelle Therapietoleranz des Einzelnen angepasst sind. Somit könnte man den

Betroffenen dieser Erkrankungen adäquate Behandlungsmöglichkeiten anbieten. Das Auftreten therapiebedingter unerwünschter Wirkungen und Spätfolgen könnte minimiert und langfristige Therapieerfolge verbessert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Materialien

| | |
|--|--------------|
| Aspirationssystem Monovette® | Sarstedt |
| Brutschrank HeraCell (37°C, 5% CO ₂) | Heraeus |
| Deckgläschen | Roth |
| E600-Fluoreszenz-Mikroskop | Nikon |
| Falcons 15ml (120*17ml) | Sarstedt |
| Falcons 4,5ml | Nunc |
| Isoliergefäß | KGW Isotherm |
| Kamerasystem | Zeiss |
| KryoTubes | Nunc |
| Kühlschrank +4°C | Bosch |
| Kühlschrank -20°C | Bosch |
| Kühlschrank -80°C | Sanyo |
| Objektträger Super Frost | Roth |
| Pipetten | Eppendorf |
| Pipettenspitzen | Eppendorf |
| Röntgenröhre PW2 184/00 | Philips |
| Sterilwerkbank HeraSafe | Heraeus |
| Zellkultur-Flaschen | Nunc |
| Zellkultur-Schaber | Nunc |
| Zellkultur-Schalen | Nunc |
| Zentrifuge | Eppendorf |
| Zentrifuge Biofuge 13 | Heraeus |

3.2. Chemikalien und Zusammensetzung verwendeter Lösungen

3.2.1. Chemikalien

| | |
|---|-------------------------------------|
| Acetonum | Hedinger (benzolfrei) |
| Dulbecco`s Medium (DMEM) | PAA Laboratories GmbH, |
| Formaldehyd (FA) 37% | Merck |
| (stabilisiert mit etwa 10% Methanol) | |
| Fötale Kälberserum | ICN Biomedicals |
| Lymphocyte Separation Medium (LSM)1077 | PAA Laboratories GmbH |
| Methanol 100% | VWR International |
| Normalserum Ziege (NS) | ICN Biomedicals |
| Phosphate-buffered Saline (PBS) | Universitätsklinikum des Saarlandes |
| Penicillin-Streptomycin | Biochrom AG (10.000U / 10.000µg/ml) |
| Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) | |
| Vectorshield Mounting Medium | VectorLaboratories |
| -for Fluorescence | |
| -for Fluorescence with 4',6- diamidino- 2-phenylindole | |

3.2.2. Lösungen

| | |
|--------------------|---|
| Formaldehyd-Lösung | PBS 4% FA |
| Nährmedium (1) | RPMI 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin |

| | |
|------------------------|--|
| Nährmedium (2) | RPMI 5% FCS 1% Penicillin-Streptomycin |
| Pufferlösung | PBS 1% NS |
| Mounting Medium + Dapi | 500 µl Mounting Medium 100 µl Mounting Medium with Dapi |

3.2.3. Antikörper

| | |
|--|-----------------------|
| Anti- phospho- histone- H2AX (ser 139) clone JBW103 Mouse monoclonal IgG1 | Upstate Biotechnology |
| Alexa Fluor 488 Goat-anti-mouse IgG | Invitrogen |

3.3. Probanden

Untersucht wurden 3 verschiedene, nicht blutsverwandte Familien mit 4 an AT erkrankten Patienten mit bekannten ATM-Mutationen im Alter von 16-33 Jahren (Tabelle 1). Als obligat heterozygote Träger der entsprechenden Mutationen wurden 5 Elternteile in die Versuchsreihe eingeschlossen (Tabelle 2). 3 gesunde, erwachsene Probanden dienten als Kontrollgruppe.

Tabelle 1. AT-Mutationen der heterozygoten Patienten.

| Patient ID (status) | Mutation | Nukleotidaustausch | Lokalisation | Proteindefekt |
|---------------------|------------------|-----------------------|--------------|---------------------------|
| SMHN (het) | 5441insT | Insertion T nach 5441 | Exon 38 | Trunkierende Mutation |
| SMAE (het) | 6095G→A (R2032K) | G→A in 6095 | Exon 43 | Aberrierende Spleißstelle |
| MRIS (het) | Q1579X | C→T in 4635 | Exon 33 | Trunkierende Mutation |
| MRMS (het) | 5977insA | Insertion A nach 5977 | Exon 42 | Trunkierende Mutation |
| SKEN (het) | 6198G→A | G→A in 6198 | Exon 44 | Aberrierende Spleißstelle |

Tabelle 2. AT-Mutationen der homozygoten Patienten.

| Patient ID (status) | Mutation | Nukleotidaustausch | Lokalisation | Proteindefekt |
|---------------------|------------------|-----------------------|--------------|---------------------------|
| SMMA (comp. het) | 5441insT | Insertion T nach 5441 | Exon 38 | Trunkierende Mutation |
| | 6095G→A (R2032K) | G→A in 6095 | Exon 43 | Aberrierende Spleißstelle |
| SMVA (comp. het) | 5441insT | Insertion T nach 5441 | Exon 38 | Trunkierende Mutation |
| | 6095G→A (R2032K) | G→A in 6095 | Exon 43 | Aberrierende Spleißstelle |
| MRSN (comp.het) | Q1579X | C→T in 4635 | Exon 33 | Trunkierende Mutation |
| | 5977insA | Insertion A nach 5977 | Exon 42 | Trunkierende Mutation |
| SKRR (comp. het) | 6198G→A | G→A in 6198 | Exon 44 | Aberrierende Spleißstelle |
| | 8307G→A | G→A in 8307 | Exon 59 | Trunkierende Mutation |

3.4. Methoden

Die Versuchsreihe lässt sich in 2 Abschnitte gliedern:

Versuch 1: *ex vivo*-Bestrahlung von Vollblut der Patienten

Versuch 2: *ex vivo*-Bestrahlung isolierter Lymphozyten aus dem Blut der Patienten

Tabelle 3. Übersicht der Versuchsreihe.

| Kollektiv | Anzahl | Strahlendosis | Untersuchte Zeitpunkte |
|-----------|--------|---------------|---|
| ATM-/- | n=4 | 1Gy 2Gy | Kontrolle 0.5/ 2.5/ 5/ 8/ 24h 24h |
| ATM+/- | n=5 | 1Gy 2Gy | Kontrolle 0.5/ 2.5/ 5/ 8/ 24h 24h |
| ATM+/+ | n=3 | 1Gy 2Gy | Kontrolle 0.5/ 2.5/ 5/ 8/ 24h 24h |

3.4.1. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte bei allen Patienten über Punktion der Vena mediana cubiti. Es wurden 8ml venöses Blut in Ammonium-Heparin-Monovetten aspiriert und bis zu Beginn des Versuches in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂-Anteil gelagert.

3.4.2. Röntgenbestrahlung

Für die Bestrahlung der Zellen wurde eine Röntgenröhre des Typs PW2 184/00 mit einer Wolframanode verwendet. Die Bestrahlung wurde bei einer Beschleunigungsspannung von 90kV und einer Stromstärke von 25mA bei einer Filterung mit 0,1mm Aluminium durchgeführt. Im Abstand von 30cm zum Beryllium-Austrittsfenster ergab sich somit eine Dosisleistung von 1,22 Gy/min. Die Dosisleistungen wurden mittels Fricke-Dosimetrie und durch Messung mit einem PTW-Weichstrahlkammer-Dosimeter bestimmt.

3.4.3. Lymphozytenisolierung und Zellkultur

3.4.3.1. PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)

Die PBMCs wurden aus dem Blut oben genannter Patientenpopulationen mittels Dichtegradientenzentrifugation mit LSM 1077 isoliert. LSM 1077 basiert auf Ficoll400, einem ungeladenen Sucrose-Polymer, dessen Dichte so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficoll-Schicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficoll-Schicht ein, während Lymphozyten und Monozyten sich in der Interphase ansammeln. Die Thrombozyten verbleiben in der oberhalb der Interphase gelegenen Plasmaphase.

Das Vollblut der Versuchsgruppen wurde im Verhältnis 1:2 mit Nährmedium (1) verdünnt und in einem sterilen Röhrchen auf 2,3ml LSM1077 geschichtet. Nach Zentrifugation (20min, 1200g, ohne Bremse) wurde die Interphase mittels Pipette abgenommen, in 1ml reines PBS überführt und 10min bei 300g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1ml PBS 10min lang bei 240g gewaschen.

3.4.3.2. Zellkultur

In Abschnitt 2 der Versuchsreihe wurden die Lymphozyten nach Isolation in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂-Anteil in Nährmedium (2) kultiviert. Zur Loslösung der adhärenen Zellen vom Boden des Zellkultur-Gefäßes wurde ein Zellschaber verwendet. Die Zellen wurden im Nährmedium in 15ml Falcons überführt und bei Raumtemperatur 10 min bei 300g abzentrifugiert.

3.4.4. γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung

Nach Isolierung der PBMCs wurden die gelatinisierten Deckgläschen in einer Feuchtkammer auf Parafilm ausgelegt. Das Lymphozytenpellet wurde in 100 μ l reinen PBS gelöst, auf die Deckgläschen aufgetragen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Fixierung in 100% Methanol bei -20°C für 30 min in 6-well-Platten. Die Zellen wurden 1 min bei -20°C in 100% Aceton permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen der Deckgläschen in Pufferlösung (3 ml, 10 min) auf dem Schüttler blockten die

Deckgläschen ca. 30 min in 4 ml Pufferlösung bei Raumtemperatur. Nach Auslegen in einer Feuchtkammer wurden die Deckgläschen mit 40 µl primärer Antikörperlösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei +4°C.

Am nächsten Morgen wurden die Deckgläschen zweimal auf dem Schüttler in 3ml Pufferlösung für je 10min gewaschen. Es folgten 2 Waschschrte in 4ml reinem PBS zu einmal 5 min und einmal 10min, bevor die Zellen für 15min in 3ml 2,5%iger Formaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert wurden. Im Anschluss wurden die Deckgläschen einmalig 10min in 3ml reinem PBS und zweimal je 10min in 3ml Pufferlösung auf dem Schüttler gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit 80 µl sekundärer Antikörper-Lösung überschichtet und 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen viermal für je 10min in 3ml reinem PBS gewaschen.

Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mittels 3 µl Mounting Medium mit Dapi (6:1), welches auf die Objektträger aufgetragen wurde. Die Deckgläschen wurden auf das Mounting Medium mit Dapi gelegt, über Nacht bei +4°C im Dunkeln getrocknet und anschließend mit Nagellack versiegelt. Die weitere Lagerung erfolgte im Dunkeln bei +4°C.

3.4.5. Auswertung der γ -H2AX-Foci

Zur Quantifizierung der DSBs und somit zur Bestimmung des Reparaturvermögens wurde die Abnahme der DSBs über die Zeit mit Hilfe eines Nikon E600-Fluoreszenz-Mikroskops bestimmt. Die Auswertung erfolgte bei 60facher oder 100facher Vergrößerung direkt am Mikroskop. Dabei mussten bei jedem Präparat zwei Bedingungen erfüllt sein: es mussten sowohl mindestens 80 Zellen als auch mindestens 40 Foci gezählt werden. Die Auswertung jedes Objektträgers erfolgte blind.

3.4.6. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Ergebnisse wurde der Kruskal-Wallis-Test als rangvarianzanalytischer Test zur Beurteilung der statistischen Signifikanz angewendet. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis eines DSB-Reparaturdefektes bei heterozygoter ATM-Mutation

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde der Nachweis auch geringer DSB-Reparaturdefekte bei Menschen im klinischen Setting etabliert. Eine eingeschränkte DSB-Reparaturkapazität wird als Hinweis auf eine erhöhte Radiosensitivität beim Menschen gewertet (Kühne *et al.*, 2004). Zu diesem Zweck wurden Lymphozyten von Patienten mit Ataxia telangiectasia ($ATM^{-/-}$) und obligat heterozygoten Trägern der Mutationen ($ATM^{+/-}$) im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$) untersucht.

Zur Induktion von DSBs wurde zunächst das Vollblut der Probanden mit einer Strahlendosis von 1Gy bestrahlt. Die Lymphozytenisolierung und Aufarbeitung der Proben erfolgte zu genau definierten Zeitpunkten von 0,5h/2,5h/5h/8h/24h nach Bestrahlung. Analog dazu wurden isolierte Lymphozyten aus denselben Patientenproben im Nährmedium bestrahlt und zu den entsprechenden Zeitpunkten aufgearbeitet. Unbestrahlte Kontrollen dienten als Referenzproben. Zusätzliche Proben dieser Probanden wurden mit der doppelten Strahlendosis (2 Gy) bestrahlt und nach 24 Stunden ausgewertet.

Durch den Vergleich der verbleibenden γ -H2AX-Foci in Lymphozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung konnte die DSB-Reparatur in der Zelle erfasst werden. Die Reparaturkinetiken der drei Patientenkollektive wurden miteinander verglichen.

4.1.1. DSB-Reparaturkinetiken in Lymphozyten nach Bestrahlung von Vollblut

Abb. 6 stellt die DSB-Reparaturkinetiken der Lymphozyten der drei Patientenpopulationen $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und $ATM^{-/-}$ nach Bestrahlung des Vollblutes mit 1 Gy dar.

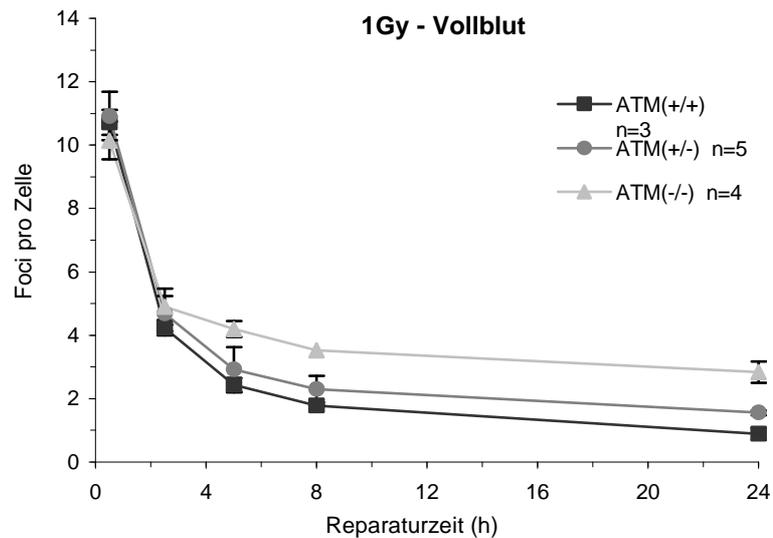


Abb. 6: DSB-Reparaturkinetiken in Lymphozyten von Trägern homozygoter ($ATM^{-/-}$) und heterozygoter ATM -Mutationen ($ATM^{+/-}$) verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$) nach Bestrahlung des Vollblutes mit 1Gy.

Nach 30min liegen bei $ATM^{+/+}$ $10,71 \pm 0,23$ Foci/Zelle, bei $ATM^{-/-}$ $10,15 \pm 0,3$ Foci/Zelle und bei $ATM^{+/-}$ $10,92 \pm 0,34$ Foci/Zelle vor.

In der gesunden Kontrollgruppe $ATM^{+/+}$ zeigt sich im Verlauf der schnellste Abfall der γ -H2AX-Foci. Nach 24h verbleiben $0,89 \pm 0,11$ Foci/Zelle (1Gy) und $2,03 \pm 0,34$ Foci/Zelle (2Gy) und somit nur ein geringes Ausmaß einer DNA-Schädigung.

In den Lymphozyten der erkrankten Patientenpopulation ($ATM^{-/-}$) verläuft die DSB-Reparatur initial ähnlich der gesunden Kontrollgruppe. Im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe besteht jedoch im weiteren Verlauf ein langsamerer Abfall der γ -H2AX-Foci als Zeichen einer defizienten DSB-Reparatur. Zu den späteren Zeitpunkten ($\geq 5h$) verbleibt ein deutlich erhöhtes Niveau an γ -H2AX-Foci und somit an unreparierten DSBs. Nach 24h bestehen mit $2,84 \pm 0,17$ Foci/Zelle (1Gy) und $4,44 \pm 1,65$ Foci/Zelle (2Gy) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$) deutlich mehr DSBs, d.h. ein größeres Ausmaß einer verbleibenden DNA-Schädigung.

Die DSB-Reparaturkapazität in den Lymphozyten der heterozygoten Mutationsträger ($ATM^{+/-}$) liegt auf einem Niveau zwischen dem der erkrankten ($ATM^{-/-}$) und dem der gesunden Probanden ($ATM^{+/+}$).

Der Abfall der γ -H2AX-Foci erfolgt in den Zellen der heterozygoten Probanden ($ATM^{+/-}$) schneller als in den Lymphozyten der erkrankten Patienten ($ATM^{-/-}$). Nach 8h liegen mit $2,3 \pm 0,24$ Foci/Zelle und nach 24h mit $1,55 \pm 0,04$ Foci/Zelle (1Gy) und $2,54 \pm 0,49$ Foci/Zelle (2Gy) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$) mehr γ -H2AX-Foci und somit DSBs vor.

4.1.2. DSB-Reparaturkinetiken in Lymphozyten nach Bestrahlung isolierter Lymphozyten

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Lymphozyten aus dem Blut der Probanden initial isoliert und analog der ersten Versuchsreihe bestrahlt und aufgearbeitet.

Abb. 7 stellt die DSB-Reparaturkinetiken der Lymphozyten der drei Patientenpopulationen $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$ und $ATM^{-/-}$ nach Bestrahlung der isolierten Lymphozyten mit 1Gy dar.

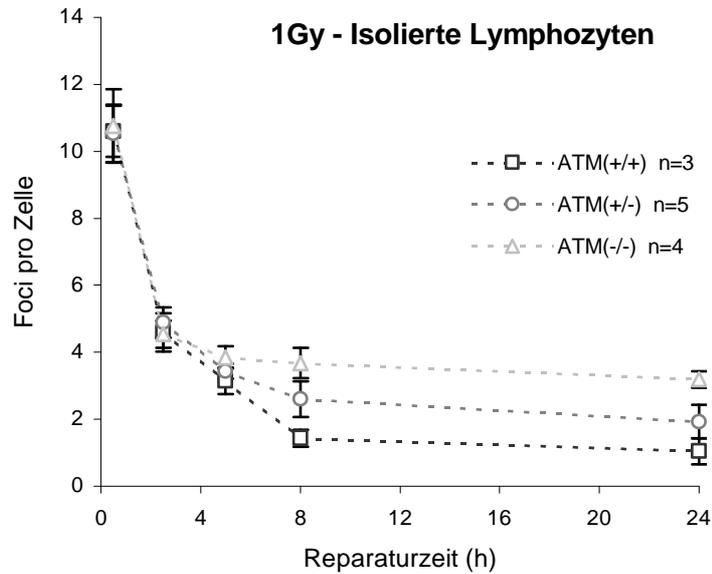


Abb. 7: DSB-Reparaturkinetiken in Lymphozyten von Trägern homozygoter ($ATM^{-/-}$) und heterozygoter ATM-Mutationen ($ATM^{+/-}$) verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$) nach Bestrahlung der zuvor isolierten Lymphozyten mit 1 Gy.

Erwartungsgemäß liegen initial bei allen Versuchsreihen ähnliche Foci-Zahlen vor. Es liegen bei $ATM^{+/+}$ $10,6 \pm 0,44$ Foci/Zelle, bei $ATM^{-/-}$ $10,76 \pm 0,55$ Foci/Zelle und bei $ATM^{+/-}$ $10,54 \pm 0,38$ Foci/Zelle vor.

Die effizienteste DSB-Reparatur weisen die Zellen der gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$) auf. Es besteht der schnellste Abfall an γ -H2AX-Foci bis auf $1,04 \pm 0,22$ Foci/Zelle (1Gy) und $2,42 \pm 0,42$ Foci/Zelle (2Gy) nach 24h.

Eine deutlich erhöhte Anzahl an DSBs in der erkrankten Patientenpopulation ($ATM^{-/-}$) lässt sich 8h nach Bestrahlung mit $3,68 \pm 0,32$ Foci/Zelle im Vergleich zu $1,43 \pm 0,15$ Foci/Zelle nach 8h in der gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$) nachweisen. Nach 24h erscheinen in den

Zellen der erkrankten Probanden ($ATM^{-/-}$) noch $3,19 \pm 0,12$ Foci/Zelle (1Gy) und $6,43 \pm 0,79$ Foci/Zelle (2Gy) als Zeichen der defekten DNA-Reparaturkapazität.

Die Gruppe der heterozygoten Mutationsträger ($ATM^{+/-}$) zeigt auch nach Bestrahlung der isolierten Lymphozyten analog zur Bestrahlung des Vollblutes eine intermediär verlaufende DSB-Reparaturkinetik. Diese liegt auf einem Niveau zwischen der der gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$) und der der erkrankten Patienten ($ATM^{-/-}$).

8h nach Radiatio sind verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe erhöhte Werte der γ -H2AX-Foci mit $2,6 \pm 0,24$ Foci/Zelle nachweisbar. Nach 24h verbleiben mit $1,93 \pm 0,22$ Foci/Zelle (1Gy) und $4,22 \pm 0,3$ Foci/Zelle (2Gy) deutlich mehr DSBs als in der gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$). Der Abfall der γ -H2AX-Foci im Verlauf gestaltet sich langsamer als in der gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$). Er weist insgesamt jedoch eine bessere Reparaturkapazität als die der erkrankten Patienten ($ATM^{-/-}$) auf.

Statistisch besteht bei den isolierten Lymphozyten zu den Zeitpunkten 8h (1Gy) und 24h (1Gy+2Gy) im Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied der γ -H2AX-Foci-Werte der heterozygoten Mutationsträger ($ATM^{+/-}$) gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ($ATM^{+/+}$). Dabei liegt das Signifikanzniveau zum Zeitpunkt 8h nach Bestrahlung bei $p=0,036$. Nach 24h (1Gy) beträgt es $p=0,043$ und nach 24h (2Gy) $p=0,036$ (Abb. 8). Bei festgelegtem statistischen Signifikanzniveau von $p<0,05$ sind somit die Kriterien für eine statistische Signifikanz erfüllt.

Ergebnisse

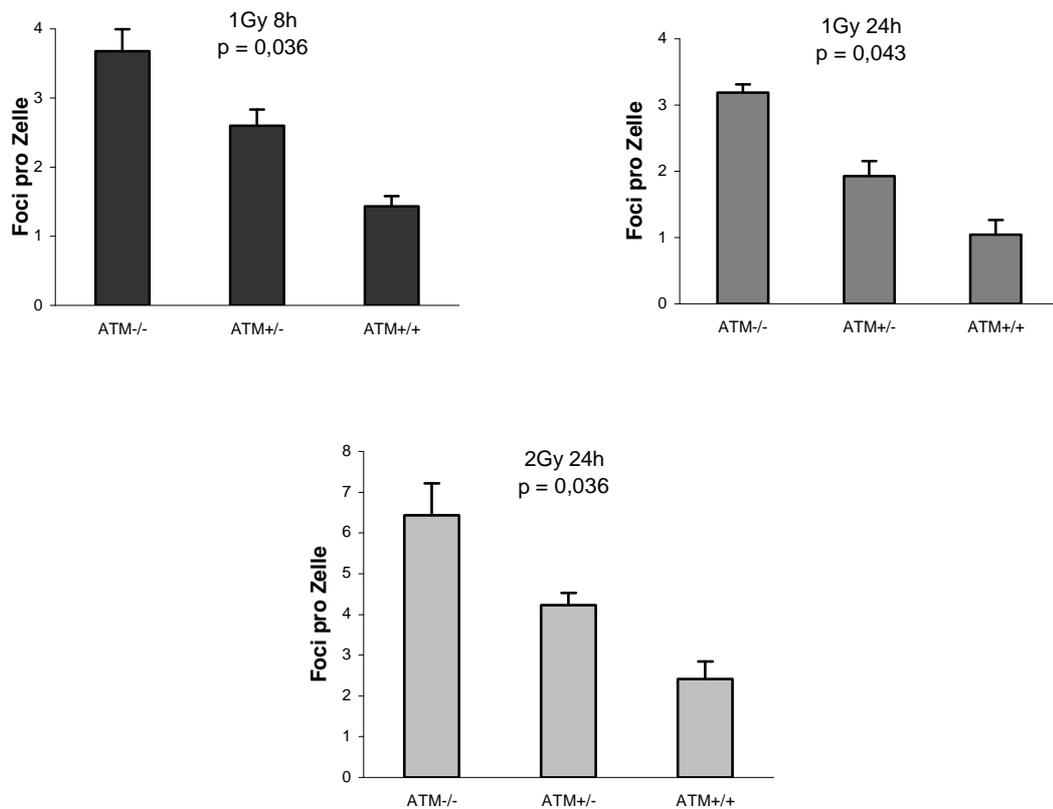


Abb. 8: Anzahl der γ -H2AX-Foci 8h und 24h nach Bestrahlung mit 1Gy sowie 24h nach Bestrahlung mit 2Gy.

Abb. 8 zeigt die Anzahl der γ -H2AX-Foci in Zellen nach sofortiger Lymphozytenisolierung unter Angabe des Signifikanzniveaus zum jeweiligen Zeitpunkt nach Bestrahlung.

Es wird deutlich, dass nach Bestrahlung der Zellen mit 1Gy zu den Zeitpunkten 8h und 24h eine signifikante Differenz in der Anzahl der verbleibenden γ -H2AX-Foci besteht. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch die ebenfalls signifikante Differenz zum Zeitpunkt 24h nach Bestrahlung mit der doppelten Strahlendosis von 2Gy.

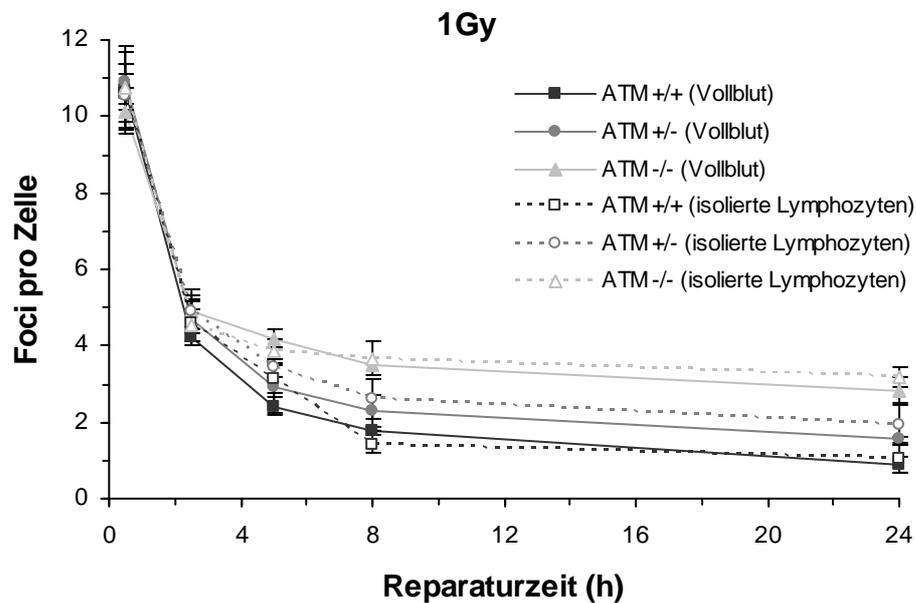


Abb. 9: Vergleich der DSB-Reparaturkinetiken in Lymphozyten nach Bestrahlung von Vollblut und Bestrahlung isolierter Lymphozyten.

Der Vergleich der DSB-Reparaturkapazitäten der im Vollblut bestrahlten und der vor Bestrahlung isolierten Lymphozyten ist in Abb. 9 dargestellt.

In beiden Versuchsreihen werden die unterschiedlichen Reparaturkapazitäten der Zellen der gesunden ($ATM^{+/+}$) und der erkrankten Probanden ($ATM^{-/-}$) sowie der obligat heterozygoten Mutationsträger ($ATM^{+/-}$) deutlich.

Gesunde Probanden zeigen eine effiziente DSB-Reparatur. 24h nach Bestrahlung ist nur noch eine geringe Anzahl an γ -H2AX-Foci nachweisbar.

Bei den erkrankten Patienten besteht eine deutlich eingeschränkte DSB-Reparaturkapazität mit erhöhten γ -H2AX-Foci ab 5h nach Bestrahlung. Nach 24h verbleibt eine erhebliche Anzahl unreparierter DSBs als Zeichen einer insuffizienten Reparatur.

Ergebnisse

Obligat heterozygote Träger einer Mutation im ATM-Gen zeigen ein intermediäres Muster der DSB-Reparatur mit leicht erhöhten γ -H2AX-Foci-Werten bei 8h und 24h nach Bestrahlung.

Die vor Bestrahlung isolierten Lymphozyten weisen zu fast allen Zeitpunkten geringfügig höhere γ -H2AX-Foci-Werte auf als die im Vollblut bestrahlten Lymphozyten.

5. Diskussion

5.1. Klinische Relevanz der untersuchten Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphozyten von Probanden mit homozygoten und heterozygoten Mutationen im ATM-Gen mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung untersucht. Als Ziel galt der Nachweis von DSB-Reparaturdefekten als Hinweis auf eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit der Zellen mit dieser Methode, und die Untersuchung von Zellen mit homo- und heterozygoter ATM-Mutation erfolgte exemplarisch für weitere Erkrankungen, die mit einer defekten DSB-Reparatur assoziiert sind.

Die Untersuchung erfolgte im Hinblick auf die Entwicklung eines prädiktiven Tests für erhöhte Strahlensensibilität im klinischen Alltag.

Bei homozygoten Trägern von Mutationen im ATM-Gen und somit an Ataxia telangiectasia erkrankten Patienten konnte eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit der Zellen nachgewiesen werden (Taylor *et al.*, 1975). Die Ursache für die erhöhte Radiosensitivität scheint in einer gestörten DSB-Reparatur zu liegen (Kühne *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass es im Rahmen dieser Erkrankung gehäuft zum Auftreten von Malignomen, hauptsächlich des lymphoretikulären Systems, kommt (McKinnon, 2004). Im Falle einer Radiatio als Therapie dieser Malignome tragen die Betroffenen somit ein höheres Risiko, schwere strahlenbedingte Nebenwirkungen zu erleiden und benötigen daher an die individuellen Bedingungen angepasste Therapieschemata (Abadir *et al.*, 1983; Tamminga *et al.*, 2002).

Heterozygote Träger von Mutationen im ATM-Gen sind prädisponiert für verschiedene Tumorentitäten, insbesondere Mamma-Karzinome (Renwick *et al.*, 2006). Betroffene scheinen ein zwei- bis fünffach erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Mammakarzinoms im Vergleich zur Normalbevölkerung zu haben (Thompson *et al.*, 2005). Athma *et al.*

stellten 1996 in einer Studie die Hypothese auf, dass das Brustkrebs-Risiko mit zunehmendem Alter ansteige. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die mit steigendem Alter zunehmende Exposition mit ionisierender Strahlung durch Untersuchungen aus dem Bereich der diagnostischen Radiologie darstellen. Dies würde dazu passen, dass auch bei Trägern heterozygoter ATM-Mutationen eine gesteigerte Strahlensensibilität vorliegt. Einige weitere Studien, unter anderem die größte Kohortenstudien mit den bislang größten Fallzahlen von Thompson *et al.* 2005, konnten diese Hypothese nicht bestätigen und zeigten im Gegenteil, dass das Brustkrebs-Risiko bei jungen Patientinnen <50J. verglichen mit älteren Patientinnen stärker erhöht ist (Olsen *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005, Andrieu *et al.*, 2005).

Die Strahlentherapie ist eine wichtige Therapieoption in der Behandlung bösartiger Erkrankungen. Bei Mamma-Karzinomen ist die adjuvante perkutane Strahlentherapie der gesamten verbliebenen Brust bei R0-Resektion nach brusterhaltender Operation oder bei R1-Resektion und fehlender Möglichkeit zur Nachresektion nach Mastektomie indiziert. Die Strahlentherapie senkt die Rate an nichtinvasiven Brust-Rezidiven und invasiven Mammakarzinomen nach regelgerechtem operativen Verfahren signifikant (Organgruppe Mammakarzinom der DEGRO 2005). Bei Trägern heterozygoter ATM-Mutationen kam es in der Vergangenheit gehäuft zum Auftreten unerwünschter Strahlenspätfolgen wie der subkutanen Fibrose im Bestrahlungsbereich (Andreassen *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte bei Patienten, die eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit im Rahmen einer therapeutischen Radiatio aufwiesen, ein erniedrigtes Level an funktionsfähigem ATM-Protein nachgewiesen werden (Clarke *et al.*, 2002). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass entnommene Epithelzellen der Mamma von Mäusen mit heterozygoter ATM-Mutation nach Bestrahlung ein erhöhtes Entartungsrisiko aufzeigen (Weil *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang könnte das gehäufte Auftreten von Mammakarzinomen bei Trägern heterozygoter ATM-Mutationen als Folge einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit zu werten sein. Mao *et al.* konnten 2008 in ihrer Studie keinen Zusammenhang zwischen Strahlenexposition und Anfälligkeit für das Auftreten von Malignomen bei AT-heterozygoten Mäusen nachweisen.

Die Studienlage zum Thema erhöhter Strahlenempfindlichkeit bei Patienten mit heterozygoter ATM-Mutation zeigt viele kontroverse Ergebnisse auf und es bleibt unklar, inwiefern heterozygote Mutationen im ATM-Gen bei den phänotypisch gesunden Betroffenen zu einer defekten DSB-Reparatur und in diesem Zusammenhang zu einer gesteigerten Radiosensitivität beiträgt.

Es ist bekannt, dass Patienten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit im Rahmen einer Strahlentherapie häufiger schwere Komplikationen erleiden (Löbrich *et al.*, 2005) und ein erhöhtes Risiko haben, infolge der Behandlung an strahleninduzierten Zweitmalignomen zu erkranken (Chistiakov *et al.*, 2008). Es besteht die Notwendigkeit, Patienten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit vor Beginn einer Radiotherapie zu identifizieren, damit bestehende Behandlungsschemata an die individuelle Konstitution der Patienten angepasst und therapiebedingte unerwünschte Folgen verhindert werden können. Nur so verhindert man die unnötige Schädigung des Patienten durch eine Therapie und verbessert langfristige Therapieerfolge.

5.2. Betrachtungen zur Methodik

5.2.1. γ -H2AX-Immunfluoreszenz zum Nachweis erhöhter Strahlensensibilität

Das Histon H2AX wird im Anschluss an die Exposition humaner Zellen mit ionisierender Strahlung in unmittelbarer Nähe der DSBs phosphoryliert und als γ -H2AX bezeichnet (Rogakou *et al.*, 1998). Die Markierung des phosphorylierten Histons γ -H2AX mit einem spezifischen, fluoreszenzmarkierten Phosphoserin-Antikörper ermöglicht die direkte Quantifizierung von γ -H2AX-Foci und somit, bei Betrachtung der Abnahme der γ -H2AX-Foci zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung, die Beobachtung der DSB-Reparaturfähigkeit der Zelle. Sedelnikova *et al.* erbrachten 2002 mit Hilfe des Zerfalls von ^{125}I den Beweis, dass ein γ -H2AX-Focus einem DSB entspricht. Die Beobachtung der

Abnahme von γ -H2AX-Foci zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung ermöglicht das Erstellen von DSB-Reparaturkinetiken und somit eine Aussage über die DSB-Reparaturkapazität der Zellen.

Es gibt eine Reihe verschiedener Methoden zur Quantifizierung von DSBs. Der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), dem Comet Assay und der TUNEL-Methode ist gemeinsam, dass sie nicht sensitiv im Bereich von nur wenigen DSBs sind und deshalb keine Methode zur Quantifizierung von DSBs bei therapeutisch relevanten Dosen darstellen. Verglichen dazu ist die γ -H2AX-Immunfluoreszenzmethode ein Verfahren, welches auch im mGy-Bereich eine hohe Sensitivität in der Detektion von DSBs aufweist (Rothkamm *et al.*, 2003).

In früheren Untersuchungen wurde anhand von γ -H2AX-Foci die Reparaturkapazität für strahleninduzierte DSBs in isolierten Lymphozyten aus dem Vollblut verglichen mit der DSB-Reparaturkapazität verschiedener Organe (Darm, Lunge, Herz, Hirn). Hierzu verwendet wurden die Zellen reparatur-defizienter Mausstämmen mit bekannten, unterschiedlich stark ausgeprägten DSB-Reparaturdefekten (SCID, Balb/c, AT) im Vergleich zu einem reparatur-profizienten Mausstamm (C57BL/6). Diese Untersuchung wurde nach Bestrahlung mit therapeutischen Strahlendosen von 0,1-2Gy durchgeführt. Verglichen wurde des weiteren die *in vivo* stattfindende DSB-Reparatur mit der *ex vivo* stattfindenden Reparatur zuvor isolierter und außerhalb des Körpers bestrahlter Lymphozyten aus dem Vollblut. In reparatur-profizienten Zellen wurden innerhalb von 24h nahezu alle durch die Bestrahlung induzierten DNA-Schädigungen repariert. Bei defizienter DSB-Reparatur erschien nach 24h eine erhöhte Anzahl γ -H2AX-Foci.

Es konnte gezeigt werden, dass in isolierten Lymphozyten aus dem Vollblut nahezu identische DSB-Reparaturkinetiken wie in komplexen Geweben ablaufen (Rübe *et al.*, 2008), und dass selbst geringe DSB-Reparaturdefekte auch nach *ex vivo*-Bestrahlung analog zur *in vivo* nachgewiesenen DSB-Reparaturkapazität auffindbar sind. Somit ist davon auszugehen, dass die Untersuchung der Lymphozyten mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenz für die DNA-Reparaturkapazität des Organismus aussagekräftig ist (Rübe *et al.*, 2008).

Dies ist für die klinische Anwendung vorteilhaft, da Lymphozyten wenig invasiv im Rahmen einer einfachen Blutentnahme aus dem Körper gewonnen werden und somit eine größere Belastung des Patienten vermieden werden kann. Die Untersuchung peripherer Lymphozyten auf einen DSB-Reparaturdefekt kann innerhalb von 24h durchgeführt werden. Es wäre somit möglich, diese Untersuchung vor Beginn einer Strahlentherapie durchzuführen mit der Konsequenz, dass ein nachgewiesener DSB-Reparaturdefekt und somit eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit vor Therapiebeginn die Anpassung des geplanten Therapieschemas an die individuellen Bedingungen ermöglicht.

5.2.2. Vergleich der beiden Versuchsansätze

In der vorliegenden Arbeit wurden die Reparaturkapazitäten von im Vollblut bestrahlten Lymphozyten und zuvor isoliert im Nährmedium bestrahlten Lymphozyten miteinander verglichen.

Es wurden einige Vorteile der sofortigen Lymphozytenisolierung deutlich. Diese bezogen sich hauptsächlich auf die praktische Anwendung im klinischen Alltag und auf die Qualität der auszuwertenden Zellen. Die Anwendung im klinischen Alltag lässt sich durch die sofortige Lymphozytenisolierung optimieren. Isolierte Lymphozyten, welche anschließend im Nährmedium verweilen, weisen verglichen mit Lymphozyten im Vollblut eine längere Haltbarkeit auf. Es entfällt die Notwendigkeit der sofortigen Aufarbeitung nach Blutentnahme. Die Aufarbeitung der Zellen lässt sich somit besser in den klinischen Alltag integrieren. Einen weiteren Vorteil birgt die Möglichkeit einer Kryokonservierung der isolierten Lymphozyten mit sehr viel längerer Haltbarkeit der Zellen. Diese würde auch eine Aufarbeitung noch nach Monaten ermöglichen. DSB-Reparaturdefekte lassen sich auch nach dem Auftauen noch in den Zellen nachweisen.

Die Qualität der auszuwertenden Lymphozyten nach Aufarbeitung zeigt einen deutlichen Unterschied zugunsten der sofortigen Lymphozytenisolierung. Vor allem zu den späteren Zeitpunkten (>8h post-radiatio) besteht eine färbetechnisch bedingte bessere Qualität der Lymphozyten und die γ -H2AX-Foci schärfer umschrieben.

Eine schlechte Qualität der auszuwertenden Zellen resultiert in Über- oder Unterschätzung der tatsächlichen Anzahl an γ -H2AX-Foci. Die Entwicklung einer objektivierten Methode zur Auswertung der γ -H2AX-Foci erweist sich bis heute aufgrund der Dreidimensionalität der Zellen und der großen Variabilität in der Größe der γ -H2AX-Foci als schwierig. Eine gute Qualität der auszuwertenden Zellen ist eine Grundvoraussetzung für die verlässliche Auswertung und somit die Anwendbarkeit in der klinischen Routine.

5.3. Kritische Betrachtung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die DSB-Reparaturkapazitäten von im Vollblut bestrahlten Lymphozyten und isoliert im Nährmedium bestrahlten Lymphozyten nach Exposition mit ionisierender Strahlung verglichen. Als Ziel galt es, einen DSB-Reparaturdefekt bei heterozygoten Trägern von Mutationen im ATM-Gen als Hinweis auf eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit mittels der γ -H2AX-Immunfluoreszenzmethode nachzuweisen.

In beiden Versuchsansätzen ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Sowohl eine Dosis- als auch eine Zeitabhängigkeit des Auftretens von γ -H2AX-Foci konnte beobachtet werden. Definierte Strahlendosen induzierten in allen Zellen unabhängig von der individuellen Radiosensitivität eine identische Anzahl an DSBs. Die Kinetik der Abnahme der γ -H2AX-Foci ließ auf die unterschiedliche DSB-Reparaturkapazität der Zellen schließen.

Sowohl bei den im Vollblut als auch bei den im Nährmedium bestrahlten Lymphozyten bestand zu allen späteren Zeitpunkten (≥ 5 h post-radiatio) eine deutliche Differenz der DSB-Reparaturkapazität gesunder Zellen (ATM^{+/+}) verglichen mit den Zellen der an AT erkrankten Patienten (ATM^{-/-}). In Analogie zu früheren Untersuchungen kam es bei ATM^{-/-} nach initial unauffällig verlaufener Reparaturkinetik zu einer Abnahme der DSB-Reparatur zu späteren Zeitpunkten und einer erhöhten Anzahl residualer γ -H2AX-Foci (Kühne *et al.*, 2004). Der Vergleich der Expression der γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung mit 1Gy und 2Gy

nach 24h zeigte, dass das Ausmaß der DNA-Schädigung dosisabhängig ist. Die bei $ATM^{-/-}$ defiziente Reparaturkinetik verlief unabhängig vom Ausmaß der initialen DNA-Schädigung.

Die DSB-Reparaturkapazität der Lymphozyten der heterozygoten Mutationsträger ($ATM^{+/-}$) lag auf einem Niveau zwischen dem der erkrankten ($ATM^{-/-}$) und dem der gesunden ($ATM^{+/+}$) Probanden.

Eine heterozygote Mutation des ATM-Gens führt bei autosomal-rezessivem Erbgang zu keiner phänotypischen Ausprägung des Krankheitsbildes AT mit den typischen klinischen Charakteristika. Eine durch Mutationen bedingte Verminderung funktionsfähigen ATM-Proteins stellt die Ursache für die Tumor-Prädisposition und für eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit der Mutationsträger dar. Im Rahmen des Krankheitsbildes AT liegt eine große Variabilität der klinischen Ausprägung bei verschiedenen homozygoten oder zusammengesetzt heterozygoten Mutationen vor. Eine unterschiedlich starke Ausprägung der Strahlenempfindlichkeit in Abhängigkeit von der jeweiligen Mutation ist somit auch bei Heterozygotie anzunehmen. Im Einklang damit fiel während der Auswertung dieser Studie ein Träger einer heterozygoten ATM-Mutation auf, welcher in beiden Versuchsreihen eine DSB-Reparaturkapazität aufwies, die im Bereich der Reparaturkapazität der gesunden Kontrollgruppe lag. Somit zeigte sich trotz genetischer Heterozygotie im ATM-Gen keine Auffälligkeit bezüglich einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit bei diesem Probanden.

Die untersuchten Zeitpunkte von 0,5h/2,5h/5h/8h/24h nach Bestrahlung sind bei den Zellen, die bereits vor Strahlenexposition aus dem Vollblut isoliert wurden, genauer definiert. Es muss keine zeitaufwendige Isolation der Zellen mehr erfolgen, während welcher die DSB-Reparatur weiter fortschreiten kann. Dies und die bessere Qualität der auszuwertenden Lymphozyten liefern eine potenzielle Begründung für die zu beinahe jedem Zeitpunkt geringfügig höhere Anzahl der γ -H2AX-Foci in den sofort isolierten verglichen mit den im Vollblut bestrahlten Lymphozyten.

Ein statistisch signifikanter Unterschied der Reparaturfähigkeit von $ATM^{+/-}$ zur gesunden Kontrollgruppe $ATM^{+/+}$ ergab sich nur nach sofortiger Lymphozytenisolierung. Dies könnte auf einer besseren Auswertbarkeit der isoliert und im Nährmedium bestrahlten Lymphozyten sowie einer genaueren Definierung der Zeitpunkte zur Aufarbeitung beruhen.

Es wurden in früheren Studien Fälle berichtet, in denen Zellen von vermeintlich gesunden Individuen eine milde Strahlenüberempfindlichkeit aufwiesen. Diese befand sich im Bereich der für ATM-Heterozygotie vermuteten Radiosensitivität (Nagasawa *et al.*, 1988). Vor diesem Hintergrund verbleibt die dringende Notwendigkeit, die Ergebnisse dieser Pilotstudie zur Evaluation eines prädiktiven Tests für erhöhte Strahlenempfindlichkeit in weiteren Untersuchungen mit größeren Fallzahlen zu belegen.

5.4. Ergebnisse im Kontext der Literatur

5.4.1. Erhöhte Strahlensensibilität bei Trägern heterozygoter ATM-Mutationen?

Als Ursachen für die unterschiedliche individuelle Strahlenempfindlichkeit werden Mutationen und Polymorphismen in DNA-Reparaturgenen diskutiert (Gutierrez-Enriquez *et al.*, 2004, Fernet und Hall, 2004). Seltene hereditäre Erkrankungen wie AT, NBS oder das Ligase4-Syndrom, deren Ursachen in einer defekten DNA-DSB-Reparatur begründet sind, gehen klinisch mit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit einher. Diese wird häufig erst durch das Auftreten schwerer strahleninduzierter Nebenwirkungen im Rahmen einer Strahlentherapie auffällig (Rothkamm *et al.*, 2003).

Eine sehr großen Vielfalt von, zum Teil sehr seltenen, Mutationen im ATM-Gen führt zur Auslösung des Krankheitsbildes AT. In Abhängigkeit von der Art der Mutation herrscht eine große Variabilität bezüglich der klinischen Ausprägung des Krankheitsbildes vor. Des Weiteren existieren sehr viele Polymorphismen im ATM-Gen. Somit gestaltete sich bislang der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen diesem Gen und einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit bei Heterozygotie als schwierig. Ebenso konnte keine sichere kausale Verbindung strahleninduzierter Malignome mit ATM-Heterozygotie als Hinweis auf erhöhte Strahlenempfindlichkeit hergestellt werden (Christiakov *et al.*, 2008).

Heterozygote Träger von Mutationen im ATM-Gen, welche bei autosomal-rezessivem Erbgang phänotypisch unauffällig sein sollten, haben ein erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen, insbesondere Mamma-Karzinome (Broeks *et al.*, 2000, Thorstenson *et al.*, 2003, Renwick *et al.*, 2006). In Patientenkollektiven, in welchen es nach Langzeitexposition mit niedrigdosierter ionisierender Strahlung zum Auftreten von malignen Erkrankungen kam, lag die Häufigkeit der heterozygoten ATM-Mutationsträger mit bis zu 10% signifikant höher als die geschätzte Prävalenz heterozygoter Mutationsträger in der Allgemeinbevölkerung mit ca. 0,5-1% (Fernet und Hall, 2004).

Viele Studien befassten sich bislang mit der Vermutung, dass sich unter Brustkrebs-Patientinnen, die im Rahmen einer Strahlentherapie mit konventioneller Strahlendosis schwere unerwünschte Nebenwirkungen erlitten, eine erhöhte Anzahl an Trägerinnen heterozygoter ATM-Mutationen befinden könnte. Somit würde die heterozygote Mutation neben der Tumorprädisposition im Einklang mit der erhöhten Strahlensensibilität an AT erkrankter Patienten auch zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit der heterozygoten Träger/innen führen.

Es ist wahrscheinlich, dass ein reduziertes Maß funktionsfähigen ATM-Proteins bei Heterozygotie zu einer intermediär erhöhten Strahlenempfindlichkeit führt. In einigen Studien konnte unter solchen Patientinnen eine gehäuftes Auftreten bestimmter ATM-Mutationen, sowohl *missense mutations* als auch einfache Insertionen und Deletionen, beobachtet werden (Angele *et al.*, 2003, Andreassen *et al.*, 2006, Ianuzzi *et al.*, 2002). Vielen anderen Studien ist es jedoch bislang nicht gelungen, den Zusammenhang zwischen AT-Heterozygotie und erhöhter Strahlenempfindlichkeit herzustellen (Appleby *et al.*, 1997, Weissberg *et al.*, 1998, Bremer *et al.*, 2003).

2006 publizierten Kato und Coautoren eine Studie, in welcher mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit bei ATM-Heterozygotie sowohl in Fibroblasten als auch Lymphozyten nach kontinuierlicher, 24-stündiger niedrigdosierter Bestrahlung mit 10cGy/h nachgewiesen werden konnte. Eine signifikante Differenz von ATM^{+/-} und ATM^{+/+} nach einmaliger, hochdosierter Bestrahlung mit 1Gy wurde in Fibroblasten nicht nachgewiesen.

Die vorliegende Studie, in welcher mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenz nach einmaliger, hochdosierter Bestrahlung mit 1Gy und 2 Gy DNA-DSB-Reparaturkinetiken erstellt wurden, erlaubt eine eindeutige Unterscheidung zwischen Lymphozyten von gesunden Probanden ($ATM^{+/+}$), erkrankten Patienten ($ATM^{-/-}$) und deren Verwandten als obligat heterozygote Träger der Mutationen ($ATM^{+/-}$).

5.5. Schlussfolgerung

Der entscheidende Vorteil der γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung liegt darin, dass die funktionelle Integrität der DSB-Reparatur unabhängig vom genetischen Hintergrund des Patienten beurteilt werden kann. Ein breites Spektrum genetischer Variationen, welche die DSB-Reparatur beeinflussen, kann untersucht und die individuelle DSB-Reparaturkapazität in Folge von Exposition mit DNA-schädigenden Agenzien evaluiert werden.

Die Zielsetzung dieser Studie war eine orientierende Untersuchung auf den Nachweis erhöhter Strahlenempfindlichkeit bei heterozygoten Trägern von ATM-Mutationen mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenz. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass γ -H2AX-Immunfluoreszenz eine Identifizierung solcher Patienten, die genetisch prädisponiert für die Entwicklung schwerer Strahlenkomplikationen sind, erlaubt.

6. Literaturverzeichnis

1. **Abadir R, Hakami N.** (1983) Ataxia-telangiectasia with cancer: An indication for reduced radiotherapy and chemotherapy doses. *Br J Radiol* 56:343-345.
2. **Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP.** (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 12:301-13.
3. **Ali A, Zhang J, Bao S, Liu I, Otterness D, Dean NM, Abraham RT, Wang XF.** (2004) Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes Dev* 18:249-54.
4. **Alsbeih G, Al-Hadyan K, Al-Harbi N.** (2008) Assessment of Carriers' Frequency of a Novel MRE11 Mutation Responsible for the Rare Ataxia Telangiectasia-Like Disorder. *Genet Test* 12:387-9.
5. **Andreassen CN, Overgaard J, Alsner J, Overgaard M, Herskind C, Cesaretti JA, Atencio DP, Green S, Formenti SC, Stock RG, Rosenstein BS.** (2006) ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64:776-83.
6. **Andrieu N, Cavaciuti E, Laugé A, Ossian K, Janin N, Hall J, Stoppa-Lyonnet D.** (2005) Ataxia-telangiectasia genes and breast cancer risk in a French family study. *J Dairy Res* 72:73-80.
7. **Angèle S, Romestaing P, Moullan N, Vuillaume M, Chapot B, Friesen M, Jongmans W, Cox DG, Pisani P, Gérard JP, Hall J.** (2003) ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res* 63:8717-25.

8. **Appleby JM, Barber JB, Levine E, Varley JM, Taylor AM, Stankovic T, Heighway J, Warren C, Scott D.** (1997) Absence of mutations in the ATM gene in breast cancer patients with severe responses to radiotherapy. *Br J Cancer* 76:1546-9.
9. **Athma P, Rappaport R, Swift M.** (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 92:130-4.
10. **Aurias A, Dutrillaux B, Buriot D, Lejeune J.** (1980) High frequencies of inversions and translocations of chromosomes 7 and 14 in ataxia-telangiectasia. *Mutat Res* 69:369-74.
11. **Bakkenist CJ, Kastan MB.** (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506.
12. **Bakkenist CJ, Kastan MB.** (2004) Initiating cellular stress responses. *Cell* 118:9-17. Review.
13. **Barnes DE, Stamp G, Rosewell I, Denzel A, Lindahl T.** (1998) Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr Biol* 8:1395-8.
14. **Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW.** (2002) Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8173-8.
15. **Baxevanis AD, Landsman D.** (1996) Histone Sequence Database: a compilation of highly-conserved nucleoprotein sequences. *Nucleic Acids Res* 24:245-7.

- 16. Ben-Omran TI, Cerosaletti K, Concannon P, Weitzman S, Nezarati MM.** (2005) A patient with mutations in DNA Ligase IV: clinical features and overlap with Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet A.* 137:283-7.
- 17. Block WD, Yu Y, Merkle D, Gifford JL, Ding Q, Meek K, Lees-Miller SP.** (2004) Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucleic Acids Res* 32:4351-7.
- 18. Boder E, Sedgwick RP.** (1957) Ataxia telangiectasia. A familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. A preliminary report on 7 children, an autopsy, and a case history. *Univ S Calif Med Bull* 9:15–28.
- 19. Bogdanova N, Feshchenko S, Schürmann P, Waltes R, Wieland B, Hillemanns P, Rogov YI, Dammann O, Bremer M, Karstens JH, Sohn C, Varon R, Dörk T.** (2008) Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer. *Int J Cancer* 122:802-6.
- 20. Bremer M, Klöpper K, Yamini P, Bendix-Waltes R, Dörk T, Karstens JH.** (2003) Clinical radiosensitivity in breast cancer patients carrying pathogenic ATM gene mutations: no observation of increased radiation-induced acute or late effects. *Radiother Oncol* 69:155-60.
- 21. Broeks A, Urbanus JH, Floore AN, Dahler EC, Klijn JG, Rutgers EJ, Devilee P, Russell NS, van Leeuwen FE, van 't Veer LJ.** (2000) ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. *Am J Hum Genet* 66:494-500.
- 22. Brown KD, Ziv Y, Sadanandan SN, Chessa L, Collins FS, Shiloh Y, Tagle DA.** (1997) The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1840–5.

- 23. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ.** (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276:42462-7.
- 24. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD.** (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281:1677-9.
- 25. Carlomagno F, Chang-Claude J, Dunning AM, Ponder BA.** (1999) Determination of the frequency of the common 657Del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 25:393-5.
- 26. 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, Olaru 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* 296:922-7.
- 27. Chan DW, Chen BP, Prithivirajasingh S, Kurimasa A, Story MD, Qin J, Chen DJ.** (2002) Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev* 16:2333-8.
- 28. Chargari C, Kirova YM, Even C, Monnier L, Dendale R, Campana F, Fourquet A.** (2009) Adjuvant irradiation in breast cancer patients with ATM gene heterozygous mutations: Special focus on clinical efficacy/toxicity. *Cancer Radiother* 13:164-72.
- 29. Chen BP, Uematsu N, Kobayashi J, Lerenthal Y, Krempler A, Yajima H, Löbrich M, Shiloh Y, Chen DJ.** (2007) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J Biol Chem* 282:6582-7.

- 30. Chen L, Trujillo K, Sung P, Tomkinson AE.** (2000) Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275:26196-205.
- 31. Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA.** (2008) Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncol* 47:809-24. Review.
- 32. Chrzanowska KH, Kleijer WJ, Krajewska-Walasek M, Bialecka M, Gutkowska A, Goryluk-Kozakiewicz B, Michalkiewicz J, Stachowski J, Gregorek H, Lysón-Wojciechowska G** et al. (1995) Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet* 57:462-71.
- 33. Clarke RA, Fang ZH, Marr PJ, Lee CS, Kearsley JH, Papadatos G.** (2002) ATM induction insufficiency in a radiosensitive breast-cancer patient. *Australas Radiol* 46:329-35.
- 34. Concannon P, Gatti RA.** (1997) Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat* 10:100-7. Review.
- 35. D'Amours D, Jackson SP.** (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:317-27.
- 36. Delia D, Piane M, Buscemi G, Savio C, Palmeri S, Lulli P, Carlessi L, Fontanella E, Chessa L.** (2004) MRE11 mutations and impaired ATM-dependent responses in an Italian family with ataxia-telangiectasia-like disorder. *Hum Mol Genet* 13:2155-63.
- 37. Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie e.V.** (2005) Leitlinie zur Radiotherapie des Mamacarcinoms.

- 38. Deutsches Krebsforschungszentrum.** (2009) Millionenförderung für bessere Umgebung und Strahlentherapie bei Krebs.
- 39. Ding Q, Reddy YV, Wang W, Woods T, Douglas P, Ramsden DA, Lees-Miller SP, Meek K.** (2003) Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 23:5836-48.
- 40. Douglas P, Sapkota GP, Morrice N, Yu Y, Goodarzi AA, Merkle D, Meek K, Alessi DR, Lees-Miller SP.** (2002) Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Biochem J* 368:243-51.
- 41. Dronkert ML, Beverloo HB, Johnson RD, Hoeijmakers JH, Jasin M, Kanaar R.** (2000) Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* 20:3147-56.
- 42. Farina L, Uggetti C, Ottolini A, Martelli A, Bergamaschi R, Sibilla L, Zappoli F, Egitto MG, Lanzi G.** (1994) Ataxia-telangiectasia: MR and CT findings. *J Comput Assist Tomogr* 18:724-7.
- 43. Fernet M, Gribaa M, Salih MA, Seidahmed MZ, Hall J, Koenig M.** (2005) Identification and functional consequences of a novel MRE11 mutation affecting 10 Saudi Arabian patients with the ataxia telangiectasia-like disorder. *Hum Mol Genet* 14:307-18.
- 44. Fernet M, Hall J.** (2004) Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. *DNA Repair* 3:1237-43. Review.
- 45. Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T.** (2006) DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C., USA: ASM Press.

- 46. Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM, Pommier Y.** (2003) Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278:20303-12.
- 47. Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, 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 S, White R, Yoder F.** (1988) Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 336:577-80.
- 48. Gatti RA, Tward A, Concannon P.** (1999) Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab* 68:419-23.
- 49. Geoffroy-Perez B, Janin N, Ossian K, Laugé A, Croquette MF, Griscelli C, Debré M, Bressac-de-Paillerets B, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Andrieu N.** (2001) Cancer risk in heterozygotes for ataxia-telangiectasia. *Int J Cancer* 93:288-93.
- 50. Giaccia A, Weinstein R, Hu J, Stamato TD.** (1985) Cell cycle-dependent repair of double-strand DNA breaks in a gamma-ray-sensitive Chinese hamster cell. *Somat Cell Mol Genet* 11:485-91.
- 51. Girard PM, Kysela B, Härer CJ, Doherty AJ, Jeggo PA.** (2004) Analysis of DNA ligase IV mutations found in LIG4 syndrome patients: the impact of two linked polymorphisms. *Hum Mol Genet* 13:2369-76.
- 52. Goodarzi AA, Jonnalagadda JC, Douglas P, Young D, Ye R, Moorhead GB, Lees-Miller SP, Khanna KK.** (2004) Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J* 23:4451-61.

- 53. Gotoff SP, Amirmokri E, Liebner EJ.** (1967) Ataxia telangiectasia. Neoplasia, untoward response to x-irradiation, and tuberous sclerosis. *Am J Dis Child* 114:617-25.
- 54. Gumy-Pause F, Wacker P, Maillet P, Betts DR, Sappino AP.** (2006) ATM alterations in childhood non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 166:101-11.
- 55. Gumy-Pause F, Ozsahin H, Khoshbeen-Boudal M, Betts DR, Maillet P, Sappino AP.** (2008) Detection of ATM gene deletion/duplication by multiplex ligation-dependant probe amplification in childhood lymphoid malignancies: a report from the Children's Oncology Group. *Leuk Res* 32:1207-13.
- 56. Gutiérrez-Enríquez S, Fernet M, Dörk T, Bremer M, Lauge A, Stoppa-Lyonnet D, Moullan N, Angèle S, Hall J.** (2004) Functional consequences of ATM sequence variants for chromosomal radiosensitivity. *Genes Chromosomes Cancer* 40:109-19.
- 57. Hernandez D, McConville CM, Stacey M, Woods CG, Brown MM, Shutt P, Rysiecki G, Taylor AM.** (1993) A family showing no evidence of linkage between the ataxia telangiectasia gene and chromosome 11q22-23. *J Med Genet* 30:135-40.
- 58. 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* 69:677-84.
- 59. Iannuzzi CM, Atencio DP, Green S, Stock RG, Rosenstein BS.** (2002) ATM mutations in female breast cancer patients predict for an increase in radiation-induced late effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52:606-13.
- 60. Inskip HM, Kinlen LJ, Taylor AM, Woods CG, Arlett CF.** (1999) Risk of breast cancer and other cancers in heterozygotes for ataxia-telangiectasia. *Br J Cancer* 79:1304-7.

- 61. Jackson SP.** (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23:687-96. Review.
- 62. Jeggo PA.** (1998) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* 150:80-91. Review.
- 63. Jiang X, Sun Y, Chen S, Roy K, Price BD.** (2006) The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM. *J Biol Chem* 281:15741-6.
- 64. Kadyk LC, Hartwell LH.** (1992) Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 132:387-402.
- 65. Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC.** (1998) Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* 8:483-9. Review.
- 66. Karagiannis TC, El-Osta A.** (2004) Double-strand breaks: signaling pathways and repair mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 61:2137-47. Review.
- 67. Kastan, M. B. & Lim, D.-S.** (2000) The many substrates and functions of ATM. *Nature Rev. Mol. Cell Biol* 1:179–186.
- 68. Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Little JB, Bedford JS.** (2006) Levels of gamma-H2AX Foci after low-dose-rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two at families and in another apparently normal individual. *Radiat Res* 166:443-53.
- 69. Khanna KK, Jackson SP.** (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247-54. Review.

- 70. Klein C, Stewart GS, Quinn NP, Taylor AMR.** (2001) Ataxia without telangiectasia revisited: Update on genetic findings in two brothers with an ataxia-telangiectasia-like disorder *Mov Disord* 16:788-9.
- 71. Kornberg RD, Thomas JO.** (1974) Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184:865-8.
- 72. Kozlov SV, Graham ME, Peng C, Chen P, Robinson PJ, Lavin MF.** (2006) Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J* 25:3504-14.
- 73. 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* 64:500-8.
- 74. Lakin ND, Weber P, Stankovic T, Rottinghaus ST, Taylor AM, Jackson SP.** (1996) Analysis of the ATM protein in wild-type and ataxia telangiectasia cells. *Oncogene* 13:2707-16.
- 75. Lavin MF, Khanna KK, Beamish H, Spring K, Watters D, Shiloh Y.** (1995) Relationship of the ataxia-telangiectasia protein ATM to phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem Sci* 20:382-3.
- 76. Lavin MF, Gueven N, Bottle S, Gatti RA.** (2007) Current and potential therapeutic strategies for the treatment of ataxia-telangiectasia. *Br Med Bull* 81-82:129-47. Review.
- 77. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.** (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-9. Review.
- 78. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K.** (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:712-20. Review.

- 79. Louis Bar, D.** (1941) Sur un syndrome progressif comprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. *Confin neurol (Basel)* 4:32.
- 80. Löbrich M, Cooper PK, Rydberg B.** (1996) Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int J Radiat Biol* 70:493-503.
- 81. Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, Uder M.** (2005) In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8984-9.
- 82. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR.** (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108:781-94.
- 83. Mao JH, Wu D, DelRosario R, Castellanos A, Balmain A, Perez-Losada J.** (2008) Atm heterozygosity does not increase tumor susceptibility to ionizing radiation alone or in a p53 heterozygous background. *Oncogene* 27:6596-600.
- 84. Maser RS, Zinkel R, Petrini JH.** (2001) An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet* 27:417-21.
- 85. Matsuura S, Tauchi H, Nakamura A, Kondo N, Sakamoto S, Endo S, Smeets D, Solder B, Belohradsky BH, Der Kaloustian VM, Oshimura M, Isomura M, Nakamura Y, Komatsu K.** (1998) Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* 19:179-81.
- 86. McKinnon PJ.** (2004) ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep* 5:772-6. Review.

- 87. Meek K, Douglas P, Cui X, Ding Q, Lees-Miller SP.** (2007) Trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. *Mol Cell Biol* 27:3881-90.
- 88. Mimori T, Hardin JA.** (1986) Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* 261:10375-9.
- 89. Mirzayans R, Severin D, Murray D.** (2006) Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66:1498-505.
- 90. Morrell D, Cromartie E, Swift M.** (1986) Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia. *J Natl Cancer Inst* 77:89-92.
- 91. Nagasawa H, Little JB.** (1988) Radiosensitivities of ten apparently normal human diploid fibroblast strains to cell killing, G2-phase chromosomal aberrations, and cell cycle delay. *Cancer Res* 48:4535-8.
- 92. Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA.** (2000) Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 20:2996-3003.
- 93. Nowak-Wegrzyn A, Crawford TO, Winkelstein JA, Carson KA, Lederman HM.** (2004) Immunodeficiency and infections in ataxia-telangiectasia. *J Pediatr* 144:505-11.
- 94. O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, Hirsch B, Gennery A, Palmer SE, Seidel J, Gatti RA, Varon R, Oettinger MA, Neitzel H, Jeggo PA, Concannon P.** (2001) DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell* 8:1175-85.
- 95. Olive, PL.** (1998) The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res* 150:42-51.

- 96. Olsen JH, Hahnemann JM, Børresen-Dale AL, Tretli S, Kleinerman R, Sankila R, Hammarström L, Robsahm TE, Kääriäinen H, Bregård A, Brøndum-Nielsen K, Yuen J, Tucker M.** (2005) Breast and other cancers in 1445 blood relatives of 75 Nordic patients with ataxia telangiectasia. *Br J Cancer* 93:260-5.
- 97. Painter RB, Young BR.** (1980) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7315-7.
- 98. Park EJ, Chan DW, Park JH, Oettinger MA, Kwon J.** (2003) DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Res* 31:6819-27.
- 99. Pastwa E, Blasiak J.** (2003) Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol* 50:891-908. Review.
- 100. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM.** (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10:886-95.
- 101. Petrini JH, Walsh ME, DiMare C, Chen XN, Korenberg JR, Weaver DT.** (1995) Isolation and characterization of the human MRE11 homologue. *Genomics* 29:80-6.
- 102. Prokopcova J, Kleibl Z, Banwell CM, Pohlreich P.** (2007) The role of ATM in breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat* 104:121-8. Review.
- 103. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W.** (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12:162-9. Review.

- 104. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, North B, Jayatilake H, Barfoot R, Spanova K, McGuffog L, Evans DG, Eccles D; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N.** (2006) ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 38:873-5.
- 105. Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B, Kysela B, Beamish H, Plowman N, Arlett CF, Lehmann AR, Jackson SP, Jeggo PA.** (1999) Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol* 9:699-702.
- 106. Riley, PA.** (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65:27-33.
- 107. Rodrigue A, Lafrance M, Gauthier MC, McDonald D, Hendzel M, West SC, Jasin M, Masson JY.** (2006) Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *EMBO J* 25:222-31.
- 108. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM.** (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-68.
- 109. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM.** (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-16.
- 110. Rooney S, Alt FW, Lombard D, Whitlow S, Eckersdorff M, Fleming J, Fugmann S, Ferguson DO, Schatz DG, Sekiguchi J.** (2003) Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J Exp Med* 197:553-65.
- 111. Roth DB, Wilson JH.** (1986) Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol Cell Biol* 6:4295-304.

- 112. 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* 100:5057-62.
- 113. Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M.** (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23:5706-15.
- 114. Rube CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rube C.** (2008) DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* 14:6546-55.
- 115. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y.** (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268:1749-53.
- 116. Scott SP, Pandita TK.** (2006) The cellular control of DNA double-strand breaks. *J Cell Biochem* 99:1463-75.
- 117. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM.** (2002) Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158:486-92.
- 118. Shiloh Y.** (1997) Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* 31:635-62. Review.
- 119. Shiloh Y.** (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3:155-68. Review.

- 120. Shiloh Y, Andegeko Y, Tsarfaty I.** (2004) In search of drug treatment for genetic defects in the DNA damage response: the example of ataxia-telangiectasia. *Semin Cancer Biol* 14:295-305.
- 121. Shiloh Y.** (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 31:402-10.
- 122. Spagnolo L, Rivera-Calzada A, Pearl LH, Llorca O.** (2006) Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Mol Cell* 22:511-9.
- 123. Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, Bedenham T, Bradwell AR, Easton DF, Lennox GG, Haites N, Byrd PJ, Taylor AM.** (1998) ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet* 62:334-45.
- 124. Stankovic T, Stewart GS, Byrd P, Fegan C, Moss PA, Taylor AM.** (2002) ATM mutations in sporadic lymphoid tumours. *Leuk Lymphoma* 43:1563-71.
- 125. Steffen J, Varon R, Mosor M, Maneva G, Maurer M, Stumm M, Nowakowska D, Rubach M, Kosakowska E, Ruka W, Nowecki Z, Rutkowski P, Demkow T, Sadowska M, Bidziński M, Gawrychowski K, Sperling K.** (2004) Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. *Int J Cancer* 111:67-71.
- 126. Steffen J, Nowakowska D, Niwińska A, Czapczak D, Kluska A, Piatkowska M, Wiśniewska A, Paszko Z.** (2006) Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland. *Int J Cancer* 119:472-5.

- 127. Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM.** (1999) The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99:577-87.
- 128. Stumm M, Neubauer S, Keindorff S, Wegner RD, Wieacker P, Sauer R.** (2001) High frequency of spontaneous translocations revealed by FISH in cells from patients with the cancer-prone syndromes ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 92:186-91.
- 129. Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD.** (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13182-7.
- 130. Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL.** (1987) Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 316:1289-94.
- 131. Syllaba K, Henner K.** (1926) Contribution`a l'indépendance de l'athtose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe de réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique. *Rev. Neurol* 1:541-62.
- 132. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S.** (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17:5497-508.
- 133. Tamminga RY, Dolsma WV, Leeuw JA, Kampinga HH.** (2002) Chemo- and radiosensitivity testing in a patient with ataxia telangiectasia and Hodgkin disease. *Pediatr Hematol Oncol* 19:163-71.

- 134. Tavani F, Zimmerman RA, Berry GT, Sullivan K, Gatti R, Bingham P.** (2003) Ataxia-telangiectasia: the pattern of cerebellar atrophy on MRI. *Neuroradiology* 45:315-9.
- 135. Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA.** (1975) Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 258:427-9.
- 136. Thatcher TH, Gorovsky MA.** (1994) Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res* 22:174-9.
- 137. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group.** (2000) Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child* 82:400-6. Review.
- 138. Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, Byrd P, Taylor M, Easton DF.** (2005) Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 97:813-22.
- 139. Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, Jenkins MA, Yu KM, Bachrich T, Muhr D, Wayne TL, Chu G, Davis RW, Wagner TM, Oefner PJ.** (2003) Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 63:3325-33.
- 140. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation Sources and effects of ionizing radiation UNSCEAR.** (2000) Report to the General Assembly, with scientific annexes .
- 141. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y.** (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22:5612-21.
- 142. Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R.** (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2:196-206. Review.

- 143. Van Holde KE, Allen JR, Tatchell K, Weischet WO, Lohr D.** (1980) DNA-histone interactions in nucleosomes. *Biophys J* 32:271-82.
- 144. Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A.** (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93:467-76.
- 145. Varon R, Seemanova E, Chrzanowska K, Hnateyko O, Piekutowska-Abramczuk D, Krajewska-Walasek M, Sykut-Cegielska J, Sperling K, Reis A.** (2000) Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur J Hum Genet* 8:900-2.
- 146. Watters D, Khanna KK, Beamish H, Birrell G, Spring K, Kedar P, Gatei M, Stenzel D, Hobson K, Kozlov S, Zhang N, Farrell A, Ramsay J, Gatti R, Lavin M.** (1997) Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene* 14:1911–21.
- 147. Weil MM, Kittrell FS, Yu Y, McCarthy M, Zabriskie RC, Ullrich RL.** (2001) Radiation induces genomic instability and mammary ductal dysplasia in *Atm* heterozygous mice. *Oncogene* 20:4409-11.
- 148. Weissberg JB, Huang DD, Swift M.** (1998) Radiosensitivity of normal tissues in ataxia telangiectasia heterozygotes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42:1133-6.
- 149. West MH, Bonner WM.** (1980) Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* 19:3238-45.
- 150. Weterings E, Chen DJ.** (2007) DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys? *J Cell Biol* 179:183-6. Review.

- 151. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T.** (2001) Human DNA repair genes. *Science* 291:1284-9.
- 152. Woods CG, Bunday SE, Taylor AM.** (1990) Unusual features in the inheritance of ataxia telangiectasia. *Hum Genet* 84:555-62.
- 153. Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR.** (1997) Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* 16:5098-112.
- 154. Yang YG, Saidi A, Frappart PO, Min W, Barrucand C, Dumon-Jones V, Michelon J, Herceg Z, Wang ZQ.** (2006) Conditional deletion of Nbs1 in murine cells reveals its role in branching repair pathways of DNA double-strand breaks. *EMBO J* 25:5527-38.

7. Publikation

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

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für molekulare Strahlenbiologie der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie am Universitätsklinikum des Saarlandes unter der Leitung von Frau PD Dr. med Rüge durchgeführt. Der Leiterin dieses Labors, Frau PD Dr. med Rüge, möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Bereitstellung des Themas danken und dafür, dass sie es mir ermöglicht hat, mit der vorliegenden Arbeit nähere Einblicke in die moderne medizinische Forschung und Wissenschaft zu erlangen.

Ein besonders herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Martin Kühne für die gute Betreuung in der Anfangszeit meiner Versuchsreihe sowie die Einweisung in die Arbeitstechniken. Mit seiner außerordentlichen fachlichen Kompetenz trug er entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit bei. Er hatte mit seiner freundlichen Art immer ein offenes Ohr für Probleme und konnte mich selbst in schwierigen Situationen motivieren.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Ruth Schneider für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ihre warmherzige Art und Motivation in schwierigen Zeiten hat entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Stephan Flache danke ich für alles und noch viel mehr.

Bei Daniela Ludwig möchte ich mich herzlich für die Einweisung in die unterschiedlichen Arbeitstechniken bedanken. Ihr sowie Dr. rer. nat. Andreas Fricke danke ich für die ständige Unterstützung im Laboralltag. Sie standen mir für offene Fragen und Probleme stets mit Rat und Tat zur Seite.

Zuallerletzt gilt mein größter Dank wohl meiner Familie für ihre liebevolle und bedingungslose Unterstützung. Durch den ständigen Rückhalt, ganz besonders meines Vaters, und nicht zuletzt durch die finanzielle Unterstützung wurden mir die Durchführung meines Medizinstudiums sowie die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht.

9. Lebenslauf

Name Karin Eva Simon

Geburtsdatum 21.09.1983

Geburtsort Trier

Konfession römisch-katholisch

Familienstand ledig

Schule 1989-1993 Grundschule Sankt Peter, Trier

1993-2002 Friedrich-Spee-Gymnasium Trier, Abschluss Abitur (2,1)

Studium 2002-2009 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes

9/2004 Abschluss der ärztlichen Vorprüfung (2,0)

2004 –2005 Tutoriumsstelle am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universitätsklinikum des Saarlandes

2005 – 2006 Auslandsstudium am Universitätsklinikum KYS Kuopio
Finnland

2008-2009 Praktisches Jahr

5/2009 Abschluss der ärztlichen Prüfung (2,0)

Berufliche Tätigkeit Seit 9/2009 Assistenzärztin der Klinik für Urologie und Kinderurologie am Krankenhaus der barmherzigen Brüder, Trier