
Aus dem Bereich Strahlentherapie und Radioonkologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Charakterisierung der Reparatur
strahleninduzierter DNA-Schäden
in Abhängigkeit von der neuronalen Chromatinstruktur**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014***

vorgelegt von: Dipl.-Chem. Stefanie Schanz
geb. am: 15.01.1985 in Grünstadt

Berichtersteller:

Prof. Dr. rer. nat. Mathias Montenarh

Prof. Dr. med. Claudia E. Rube

Vorsitzender:

Tag der mündlichen Prüfung:

„Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft.

Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.

Wer nichts prüft, entdeckt nichts.

Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.“

Pierre Teilhard de Chardin
(1881-1955)

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung/Summary	1
2 Einleitung und Zielsetzung	5
2.1 Ionisierende Strahlung und physikalische Grundlagen	5
2.2 DSB-Reparaturmechanismen und Reparaturproteine	6
2.2.1 Homologe Rekombination (HR)	7
2.2.2 Nicht-homologes Endjoining (NHEJ).....	8
2.2.3 Strahleninduzierte Foci	9
2.3 Chromatin und seine Struktur	10
2.3.1 Chromatinaufbau	10
2.3.2 Histoncode.....	12
2.4 Klinische Strahlentherapie	13
2.5 Zellen des zentralen Nervensystems	14
2.6 Genetische DNA-Reparaturdefekte beim Menschen	15
2.6.1 Ataxia Teleangiectasia (A-T).....	15
2.6.2 Radiosensitive-Severe Combined Immunodeficiency (RS-SCID).....	15
2.7 Fragestellung	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Materialien	18
3.1.1 Geräte und Software.....	18
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	19
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	20
3.1.4 Angesetzte Lösungen	21
3.1.5 PCR-Primer	22
3.1.6 Verwendete Antikörper	23
3.2 Methoden	25
3.2.1 Verwendete Mausstämme	25
3.2.1.1 C57BL/6N (C57BL/6)	25
3.2.1.2 CB17/Icr-Prkdc ^{scid} (SCID-Mäuse)	25
3.2.1.3 129S6/SvEVTac-Atm ^{tm1Awb} (ATM ^{x/y} -Mäuse).....	25
3.2.2 Tierhaltung.....	26
3.2.3 Genotypisierung der 129S6/SvEVTac-Atm ^{tm1Awb} -Mäuse	26
3.2.3.1 DNA-Isolierung.....	26
3.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.2.4 Bestrahlungsplanung und Bestrahlung der Versuchstiere	27
3.2.5 Gewebeentnahme und -asservation	29
3.2.5.1 Einbettung für die Immunfluoreszenz	29
3.2.5.2 Einbettung für die Elektronenmikroskopie	30
3.2.6 Beschichtung von Gewebeträgern für die Elektronenmikroskopie.....	30
3.2.7 Sektionierung der Gewebe	31
3.2.7.1 Paraffinschnitte	31
3.2.7.2 Schnitte für die Elektronenmikroskopie	31
3.2.8 Immunologische Färbungen.....	31
3.2.8.1 Reguläre Immunfluoreszenzfärbung	32

3.2.8.2	Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Primärantikörpern aus derselben Spezies.....	32
3.2.8.3	Immunogoldfärbung	33
3.2.9	<i>Fluoreszenzmikroskopische Auswertungen</i>	34
3.2.9.1	Foci-Quantifizierung	34
3.2.9.2	Foci-Größenbestimmung.....	34
3.2.9.3	Nicht quantitative Fluoreszenzuntersuchungen	35
3.2.10	<i>Elektronenmikroskopische Auswertung</i>	35
3.2.11	<i>Statistische Auswertung</i>	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Identifizierung und Charakterisierung der Chromatinstruktur in kortikalen Neuronen	36
4.1.1	Markierung von kortikalen Neuronen zur eindeutigen Identifizierung	36
4.1.2	Untersuchung der Chromatinstruktur in kortikalen Neuronen.....	37
4.2	53BP1 zur Quantifizierung von DNA-Schäden in den kortikalen Neuronen unbestrahlter Kontrollen und nach Bestrahlung mit 2 Gy	41
4.2.1	53BP1 als Marker für DNA-Schäden in kortikalen Neuronen	41
4.2.2	53BP1 in kortikalen Neuronen unbestrahlter und bestrahlter Mäuse verschiedenen Alters und/oder unterschiedlichen Genotyps.....	42
4.3	Reparatur von DNA-Schäden in kortikalen Neuronen nach einmaliger und fraktionierter Bestrahlung mit niedrigen Dosen	46
4.3.1	DNA-Schadensuntersuchung in reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen nach Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen.....	46
4.3.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Reparatur nach Niedrigdosisbestrahlung	48
4.3.3	DNA-Schadensuntersuchung in reparaturdefizienten ATM- und SCID-Mäusen nach Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen	49
4.4	Reparatur von DNA-Schäden in kortikalen Neuronen nach Bestrahlung mit hohen Dosen	55
4.4.1	Quantifizierung von 53BP1-Foci nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 6 Gy.....	56
4.4.2	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zur DNA-Reparatur in kortikalen Neuronen	59
4.4.3	Veränderungen in Histonmodifikationen und chromatinassoziierten Faktoren in Abhängigkeit von strahleninduzierten DNA-Schäden	69
5	Diskussion	82
5.1	Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden mittels 53BP1 als Marker für DNA-Schäden	82
5.2	Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden im Kontext des Chromatins	91
5.3	Besondere Funktion von DNA-Reparaturfaktoren im zentralen Nervensystem	99
6	Ausblick	104
7	Verzeichnisse	106
7.1	Literaturverzeichnis	106
7.2	Abkürzungsverzeichnis	119
7.3	Abbildungsverzeichnis	122
7.4	Tabellenverzeichnis	123

8	Veröffentlichungen	124
9	Danksagung	125
10	Lebenslauf	127

1 Zusammenfassung/Summary

Die schwerwiegendsten Schäden, die in einer Zelle durch ionisierende Strahlung verursacht werden, sind DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs). Zum Schutz des Genoms haben eukaryontische Zellen im Laufe der Zeit verschiedene Wege entwickelt, um die DSBs zu reparieren. Die Erkennung und Prozessierung strahleninduzierter Brüche muss dabei im Kontext der gegebenen Chromatinstruktur erfolgen, die zunächst eine Barriere für die Reparaturproteine darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Schadensantwort in Neuronen des zerebralen Kortex von reparaturprofizienten (C57BL/6) und reparaturdefizienten ($ATM^{-/-}$, SCID) Mäusen nach Exposition mit ionisierender elektromagnetischer Strahlung charakterisiert. Die Auswirkungen auf die Normalgewebszellen wurden sowohl nach hohen Einzeldosen (2 Gy und 6 Gy), als auch nach fraktionierter Bestrahlung mit niedrigen Dosen (10 mGy und 100 mGy) mittels 53BP1-Focianalyse untersucht. Neben der Quantifizierung der DSBs wurde auch die chromatinvermittelte DNA-Schadensantwort in den ausdifferenzierten kortikalen Neuronen betrachtet. Hierzu wurden in der Immunfluoreszenz (IFM) Chromatinmodifikationen und chromatinassoziierte Faktoren markiert, von denen bekannt ist, dass sie in Verbindung mit einer DNA-Schadensantwort stehen (H4K16ac und pKAP1). Außerdem wurde die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) eingesetzt, um die euchromatische und die heterochromatische DSB-Reparatur separat zu charakterisieren. Durch Immunogoldmarkierung ermöglicht diese Methode erstmals die mikroskopische Untersuchung der zentralen Proteine des Nicht-homologen Endjoinings (NHEJ). Für die in Eu- und Heterochromatin separierten Analysen der NHEJ-abhängigen DSB-Reparatur in den kortikalen Neuronen wurde die an den DNA-Bruchenden lokalisierte phosphorylierte Ku70-Untereinheit (pKu70) des KU-Heterodimers markiert und quantifiziert. Nach fraktionierter Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen zeigte sich eine Akkumulation von 53BP1 mit zunehmender kumulativer Dosis in fast allen untersuchten Genotypen (C57BL/6, $ATM^{+/-}$, $ATM^{-/-}$, SCID), mit Ausnahme der ATM -Wildtypneurone ($ATM^{+/+}$). Neben einer unterschiedlich ausgeprägten Akkumulation von verbleibenden 53BP1-Foci zwischen den Genotypen, waren nach fraktionierter Bestrahlung auch deutliche Unterschiede in den 53BP1-Focistrukturen mit steigender kumulativer Dosis zu beobachten. Abhängig vom Genotyp wiesen die Neurone ungewöhnlich große 53BP1-Focistrukturen auf (*53BP1-Nuclearbodies*). Auch zu späten Reparaturzeitpunkten nach Exposition mit einer einzelnen hohen Dosis wurde in den nicht proliferierenden Neuronen die Bildung von *53BP1-Nuclearbodies* beobachtet. Mittels TEM-Analyse konnte gezeigt werden, dass große 53BP1-Cluster (≥ 10 Beads pro Cluster) im dichten Heterochromatin zu späten Zeitpunkten nach der Bestrahlung (> 24 h) nicht mehr mit pKu70 kolokalisieren und vermutlich keine aktiv prozessierten Brüche mehr markieren. Der Einfluss der Chromatinstruktur in den kortikalen

Neuronen auf die Religation der induzierten DSBs spiegelte sich insbesondere in der schnellen euchromatischen pKu70-Kinetik im Vergleich zur zeitlich verzögerten pKu70-Kinetik im Heterochromatin wider. Die beiden untersuchten reparaturdefizienten Genotypen ($ATM^{-/-}$, SCID) zeigten deutliche Unterschiede in ihrer chromatinabhängigen DNA-Schadensantwort. Während die SCID-Neurone, abgesehen von höheren Schadenszahlen, ein ähnliches Verhalten wie die reparaturprofizienten Neurone (C57BL/6) zeigten, wich das Bild in den ATM-defizienten Zellen stark von den beiden anderen ab.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die Bedeutung der Chromatinstruktur für die Reparatur von strahleninduzierten DSBs sowie die unterschiedlichen Konsequenzen für die chromatinabhängige DNA-Schadensantwort in Abwesenheit verschiedener Reparaturfaktoren. Neben dem Einfluss genetischer Unterschiede konnte auch die Relevanz der Dosis und der Häufigkeit der Exposition auf die kurz- und langfristige Markierung induzierter DNA-Schäden in der neuronalen Chromatinstruktur dargestellt werden.

Characterization of radiation-induced DNA damage in the context of the neuronal chromatin structure

DNA double strand breaks (DSBs) are the most serious DNA damages within a cell after irradiation. During evolution cells developed different repair pathways to protect the genome. The detection and processing of radiation-induced DSBs occurs in the context of the higher order chromatin structure, which is a natural barrier for DNA damage response (DDR).

Here, radiation-induced DDR after single dose radiation and after fractionated low-dose radiation were characterized in non-proliferating cortical neurons of repair-proficient (C57BL/6) and repair-deficient ($ATM^{-/-}$, SCID) mice. Induced DSBs were monitored and quantified by 53BP1 foci analysis. Chromatin-dependent DDR was examined by immunofluorescence microscopy (IFM) and transmission electron microscopy (TEM). Therefore repair-associated chromatin modifications (H4K16ac) and chromatin-binding factors (KAP1, pKAP1) were visualized by IFM and the high resolution TEM approach was used for differentiation between euchromatic and heterochromatic DSB repair. For the first time the TEM method enables visualization of the core components of the NHEJ repair machinery in the context of chromatin. For quantification of euchromatic and heterochromatic DSB repair, the phosphorylated form of the Ku70 subunit (pKu70) of the DNA end binding KU heterodimer was marked by immunogold labeled antibodies.

After protracted low-dose radiation there was a constant increase in the number of 53BP1 foci with increasing cumulative doses in almost all observed genotypes (C57BL/6, $ATM^{+/-}$, $ATM^{-/-}$, SCID). Only ATM wild type neurons ($ATM^{+/+}$) did not show any foci accumulation after protracted low-dose radiation. The other genotypes displayed a wide variety in the accumulation of 53BP1 foci. Additionally, foci size showed huge differences with increasing doses. Depending on the genotype some neuronal foci had been unexpectedly large. These huge 53BP1 foci (53BP1 nuclear bodies) were also observed at late repair times after single dose radiation with 6 Gy. TEM analysis revealed that huge 53BP1 clusters (≥ 10 beads per cluster) in highly condensed heterochromatic regions at late repair times (> 24 h) do not colocalize with pKu70. It is assumed that they do not reflect actively processed DSBs. Different pKu70 kinetics in euchromatin (fast) and heterochromatin (delayed) demonstrate the impact of the higher-order chromatin structure on DSB repair. There were distinct differences in the chromatin dependent DNA damage response in the two repair-deficient mouse strains (SCID, $ATM^{-/-}$). Besides an increased 53BP1 foci level, SCID neurons were very similar in there to repair-proficient C57BL/6 neurons, whereas $ATM^{-/-}$ neurons clearly differed from the other two.

These results demonstrate the importance of the chromatin structure for the repair of radiation-induced DSBs. The loss of different repair factors results in a distinct chromatin

associated DNA damage response. Besides genetic background, the influence of radiation dose and amount of fractions for short- and long-term labeling of DNA damages in the neuronal chromatin structure has been demonstrated.

2 Einleitung und Zielsetzung

Ein Organismus ist täglich sowohl endogenen als auch exogenen Noxen ausgesetzt, welche die DNA schädigen können. Neben den endogenen Noxen, welche der Körper in zellulären Prozessen selbst bildet, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*), stellen auch exogene Expositionen, z.B. durch ionisierende Strahlung, ein erhebliches Risiko für die Integrität der genetischen Information dar. Die Konsequenzen der wiederholten Exposition eines gesunden Organismus mit niedrigen bis sehr niedrigen Dosen an ionisierender Strahlung sind dabei bislang kaum untersucht.

2.1 Ionisierende Strahlung und physikalische Grundlagen

Bei ionisierender Strahlung handelt es sich um Teilchen- oder elektromagnetische Strahlung, die genügend Energie besitzt, um Elektronen (e^-) aus Atomen oder Molekülen herauszuschlagen. Elektromagnetische Strahlung (Photonenstrahlung) besitzt diese Energie dabei erst ab einer Wellenlänge von ca. 200 nm (Spaltung von molekularem Sauerstoff in zwei freie Radikale; Kiefer, 1989). Somit verfügt nur die kurzwellige Photonenstrahlung (UV-, Röntgen- und γ -Strahlung) über die nötige Energie, Elektronen aus der Atomhülle zu lösen und Atombindungen zu spalten.

Ein Maß für die Wirkung von Strahlung ist die Energiedosis D , die sich aus der pro Masse absorbierten Energie berechnet und somit die durch Strahlung auf Materie, z.B. Gewebe, übertragbare Energie darstellt. Die Einheit der Energiedosis ist Gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} / 1 \text{ kg}$; Sauer, 1993).

$$\text{Energiedosis } D [\text{Gy}] = \frac{\text{absorbierte Energie}}{\text{Masse}} = \frac{\text{Joule [J]}}{\text{Kilogramm [kg]}}$$

Die biologische Wirksamkeit verschiedener Arten ionisierender Strahlung (α -, β -, γ - oder Neutronenstrahlung) ist durch ihre unterschiedlichen Ionisationsdichten sehr verschieden. Durch Gewichtung der Energiedosis (Äquivalentdosis) anhand der biologischen Wirksamkeit der entsprechenden Strahlung mit einem dimensionslosen Faktor f lassen sich die Strahlungsarten miteinander vergleichen. Der Qualitätsfaktor f von α - und Neutronenstrahlung ist dabei durch deren höhere biologische Wirksamkeit größer als der von β - und γ -Strahlung (β - und γ -Strahlung: $f = 1$, Neutronenstrahlung: $f = 10$, α -Strahlung $f = 20$; Sauer, 1993). Die Einheit der Äquivalentdosis wird in Sievert angegeben ($1 \text{ Sv} = 1 \text{ J} / 1 \text{ kg}$).

$$\text{Äquivalentdosis [Sv]} = \text{Energiedosis } D \cdot \text{Faktor } f = \frac{\text{Joule [J]}}{\text{Kilogramm [kg]}}$$

Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die verschiedenen Strahlungen bei gleicher Energie über unterschiedliche Eindringtiefen in Materie verfügen. Während Teilchenstrahlung trotz eines hohen Wirkungsfaktors in Abhängigkeit der Energie und ihrer Teilchenmasse nur vergleichsweise geringe Eindringtiefen besitzt, kann die ladungs- und massefreie elektromagnetische Strahlung bei gleicher Energie wesentlich tiefer in dasselbe Material eindringen (Schneider und Burkart, 1998). Durch das annähernd ungehinderte Eindringen von Photonenstrahlung in Gewebe stellt sie, trotz eines kleinen Wirkungsfaktors, auch bei geringer Energiedosis eine große potenzielle Gefahr für den Körper dar.

Die Strahlenwirkung auf Gewebe kann dabei durch die direkte Interaktion der Photonen mit Molekülen wie der DNA oder indirekt durch sekundäre Prozesse in Folge der Bildung hochreaktiver Radikale (chemischer Transfer) auftreten. Da Gewebe zu einem großen Teil aus Wasser besteht (zwischen 60% und 70%; Hevesy und Hofer, 1934), ist der Hauptteil der durch Strahlung verursachten DNA-Schäden nicht direkt (20-30%), sondern indirekt in Folge der Ionisation von Wassermolekülen (70-80%; Pauly *et al.*, 1966). Neben der homolytischen Bindungsspaltung von Wasser ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OH}\cdot + \text{H}\cdot$), stellt die Radiolyse dabei den Hauptreaktionsmechanismus dar (Rink, 1971). Hierbei wird durch die Strahlung ein e^- aus der Elektronenhülle gelöst und das positiv geladene Wassermolekül zerfällt in einem zweiten Reaktionsschritt in ein Proton und ein Hydroxylradikal ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \cdot\text{H}_2\text{O}^+ + e^- \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}\cdot + e^-$). Sowohl das e^- als auch das hochreaktive Hydroxylradikal führen zu weiteren Reaktionen z.B. mit der DNA. Durch die Bildung von instabilen Peroxiden (H_2O_2 , $\text{HO}_2\cdot$) kann molekularer Sauerstoff (O_2) die Bildung von ROS weiter begünstigen (Rink, 1971).

2.2 DSB-Reparaturmechanismen und Reparaturproteine

Ionisierende Strahlung generiert eine Vielzahl unterschiedlicher DNA-Schäden (u.a. Basenveränderungen, DNA-Strangverknüpfungen, DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüche). DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) stellen dabei die schwerwiegendsten strahleninduzierten Schäden für eine Zelle dar und sind potenziell letal. Außer durch ionisierende Strahlung können DSBs auch durch radiomimetische Chemotherapeutika oder endogene ROS verursacht werden (Khanna und Jackson, 2001). Werden DSBs falsch oder gar nicht repariert, kann dies zu Mutationen und Chromosomenaberrationen führen und damit zur Kanzerogenese (Hartlerode und Scully, 2009). Deshalb ist eine effiziente Reparatur für das Überleben einer Zelle und den Schutz der genetischen Information essenziell. Hierzu hat die Zelle im Laufe der Evolution zwei Hauptreparaturmechanismen entwickelt: (1) die Homologe Rekombination (HR) und (2) das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ, engl. *non-homologous end joining*).

2.2.1 Homologe Rekombination (HR)

Die HR stellt den prädominanten DSB-Reparaturweg in Hefezellen dar. Da die HR zur Reparatur eine homologe Matrix (z.B. ein Schwesterchromatid) benötigt (Abbildung 2.1 (A)), findet dieser Reparaturweg vor allem während der S- und G₂-Phase des Zellzyklus statt (van Gent *et al.*, 2001). Die HR ermöglicht eine fehlerfreie Reparatur ohne Informations- oder Basenverlust. Durch eine Vielzahl an beteiligten Proteinen und Prozessen ist sie allerdings sehr aufwändig und langwierig, was zu einer langsamen Reparaturkinetik führt (Dueva und Iliakis, 2013).

Das DNA-Reparatursystem der HR beinhaltet zahlreiche Reparaturschritte und Proteine, zu denen u.a. die Proteine der Rad52-Familie (Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59 und Mre11) gehören (Khanna und Jackson, 2001). Rad50 und Mre11 bilden dabei mit Nbs1 den MRN-Komplex, welcher als Sensor für DSBs dient, an die Bruchenden bindet und ATM rekrutiert (Kotnis *et al.*, 2009). Weitere beteiligte Proteine sind die 5'-3'-Exonuklease Exo1, das Replikationsprotein A (RPA) und die *Breast-cancer*-Proteine 1 und 2 (BRCA1 und BRCA2). Während der DSB-Prozessierung wird ein 3'-ssDNA-Überhang an beiden Bruchenden generiert, der direkt durch das ssDNA-Bindungsprotein RPA fixiert wird (Abbildung 2.1 (A)). An dieser Endresektion sind auch der MRN-, sowie der CtIP/BRCA1/BARD1-Komplex unterstützend beteiligt (Hartlerode und Scully, 2009). RPA wird anschließend durch Rad51 ersetzt und von der ssDNA entfernt. Katalysiert durch BRCA2 akkumulieren zahlreiche Rad51-Proteine mit der ssDNA und bilden ein sog. Rad51-Nukleoproteinfilament, das die „DNA-Strang-Invasion“ und die Suche nach einer homologen Sequenz vermittelt. Diese Akkumulation von Rad51 lässt sich in der Immunfluoreszenz als strahleninduzierter Focus sichtbar machen (van Gent *et al.*, 2001). Das Rad51-Nukleoproteinfilament bindet an die doppelsträngige DNA (dsDNA) des homologen Schwesterchromatids und sucht nach einer entsprechenden homologen Sequenz, mit der es zur Ausbildung eines sog. „D-loop-Intermediats“ kommt. Die angelagerten 3'-DNA-Enden werden dann durch eine Polymerase verlängert, bis das entsprechende 5'-DNA-Ende des Bruchs erreicht ist und die beiden DNA-Enden ligiert werden. Die durch das „*crossing-over*“ der DNA-Stränge entstandenen „Holliday-Strukturen“ (*Holliday junction*) werden durch erneutes Schneiden und Verknüpfen aufgelöst und wieder in zwei einzelne Doppelstränge separiert. Beim Trennen der beiden Stränge kann es zur Bildung eines „*non-crossover*“ oder eines „*crossover*“ (Chromosomenaberration zwischen Schwesterchromatiden) Produkts kommen (Hartlerode und Scully, 2009).

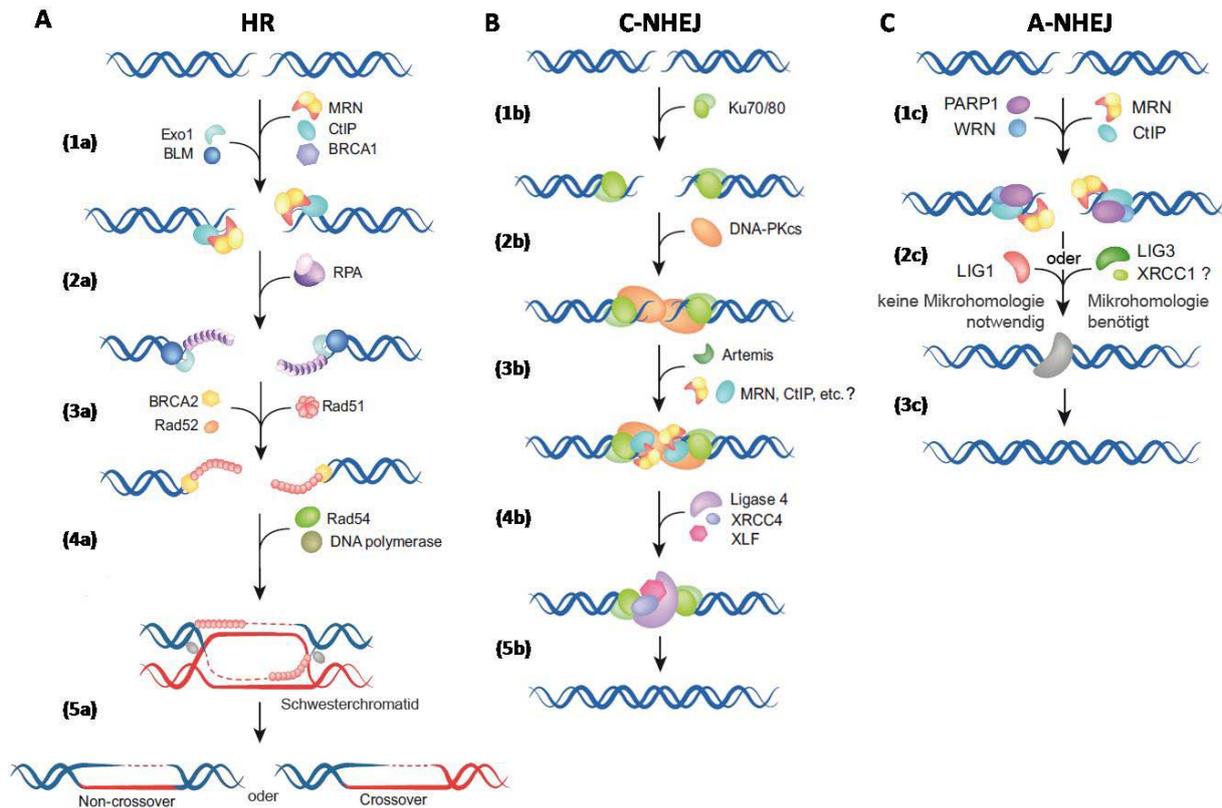


Abbildung 2.1 DSB-Reparaturwege in eukaryontischen Zellen

In höheren Eukaryonten existieren verschiedene Mechanismen zur Reparatur von DSBs. (A) Bei der Homologen Rekombination (HR) werden die Bruchenden durch den MRN-Komplex (bestehend aus Mre11, Nbs1 und Rad50) erkannt und durch weitere Faktoren wie z.B. CtIP, BRCA1, Exo1 und BLM gebunden und prozessiert (1a). Während der Prozessierung entstehen 3'-Einzelstrang-Überhänge, die durch RPA gebunden und stabilisiert werden (2a). Durch zusätzliche Aktivatoren wie BRCA2 und Rad52 wird RPA von der DNA gelöst und durch Rad51 ersetzt (3a). Das entstandene Rad51-Nukleoproteinfilament sucht – unterstützt durch Rad54 – auf dem Schwesterchromatid nach einer homologen Sequenz, von der aus das 3'-Bruchende verlängert wird (4a). Nach Erreichen des 5'-Bruchendes werden die beiden Doppelstränge durch Lösen der entstandenen „Holliday junctions“ voneinander getrennt. Dabei kann ein *non-crossover*-Produkt oder ein *crossover*-Produkt gebildet werden (5a). (B) Beim klassischen Nicht-homologen Endjoining (C-NHEJ) werden die Bruchenden durch den KU-Komplex (Ku70/Ku80-Heterodimer) gebunden (1b), worauf die katalytische Untereinheit DNA-PKcs rekrutiert wird (2b). Nach eventueller Prozessierung der Bruchenden durch die Endonuklease Artemis oder andere Faktoren (3b) werden die Bruchenden durch den Ligase 4/XRCC4/XLF-Komplex ligiert (4b) und die Proteine wieder von der DNA gelöst (5b). (C) Falls das C-NHEJ gestört ist, können DSBs über einen alternativen Reparaturweg ligiert werden, das alternative Nicht-homologe Endjoining (A-NHEJ). Die Bruchenden werden hierbei durch PARP1, den MRN-Komplex und sein assoziiertes Protein CtIP gebunden (1c). Durch Ligase 1 (LIG1) oder Ligase 3 (LIG3; evtl. in Kombination mit XRCC1) werden die Bruchenden, gegebenenfalls unter Verwendung von Mikrohomologien, verknüpft (2c) und die Reparaturfaktoren anschließend von der DNA gelöst (3c). (Modifizierte Abbildung nach Dueva und Iliakis, 2013)

2.2.2 Nicht-homologes Endjoining (NHEJ)

Das NHEJ funktioniert unabhängig von homologen Sequenzen durch einfache Ligation der Bruchenden und bildet daher den prädominanten Reparaturweg während der G₀-, G₁- und frühen S-Phase in Säugerzellen (Hartlerode und Scully, 2009). Daher stellt es auch den Hauptreparaturweg in den nicht proliferierenden, ausdifferenzierten Neuronen dar. Da kein Abgleich mit homologen Gensequenzen erfolgt, kann es zu Veränderungen (Mutationen) der Gensequenz durch Basenverluste und/oder Ähnlichem kommen. Im Gegensatz zur HR umfasst das NHEJ nur wenige Reparaturproteine und -schritte und kann DSBs daher sehr schnell prozessieren. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ beträgt 10-30 min (Dueva und Iliakis, 2013). Die sechs Kernproteine des NHEJ Ku70, Ku80, DNA-PKcs, DNA-Ligase 4 (LIG4), XRCC4 und dem XRCC4-like factor (XLF) werden in Säugerzellen ubiquitär exprimiert und lagern sich zu

zwei Proteinkomplexen zusammen. Ku70 und Ku80 bilden zusammen das KU-Heterodimer, welches die Bruchenden erkennt und stabilisiert (Abbildung 2.1 (B)). Zusammen mit DNA-PKcs bilden die drei Proteine den DNA-PK-Enzymkomplex. Die Ligation der beiden Bruchenden erfolgt durch den LIG4/XRCC4(/XLF)-Komplex (Mahaney *et al.*, 2009), wobei XLF – auch bekannt als Cernunnos – nicht essenziell für den Mechanismus ist, aber die Prozessierung beschleunigt (Riballo *et al.*, 2009). Für die Reparatur eines kleinen Teils (~10%) an Brüchen mit speziellen Bruchenden wird außerdem die Nuklease Artemis benötigt (Riballo *et al.*, 2004).

Neben dem klassischen NHEJ (C-NHEJ, engl. *classical NHEJ*) existiert ein weiterer DSB-Reparaturweg, der zu jeder Zellzyklus-Phase arbeiten kann, das sog. alternative NHEJ (A-NHEJ). Dieser dritte Reparaturweg dient als „*Backup pathway*“, wenn zentrale Komponenten des C-NHEJ fehlen (Hartlerode und Scully, 2009). Trotz Verwendung von Mikrohomologien sind Sequenzveränderungen an den Verknüpfungen beim A-NHEJ häufiger und umfangreicher als beim C-NHEJ. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit von Translokationen beim A-NHEJ sehr viel höher. Dies kann auch im Zusammenhang mit einer langsameren Prozessierung der Brüche stehen ($t_{1/2} = 0.5-20$ h; Dueva und Iliakis, 2013). PARP1 – ursprünglich identifiziert als Komponente der Basenaustauschreparatur (BER, engl. *base excision repair*) und der Einzelstrangbruchreparatur (SSB-Reparatur, engl. *single strand break repair*) – wirkt hierbei als Sensor für DNA-Unregelmäßigkeiten. An der Prozessierung der Brüche sind der MRN-Komplex und CtIP beteiligt, während die DNA-Ligasen 1 oder 3 (LIG1 oder LIG3) die Bruchenden verknüpfen (Abbildung 2.1 (C)). XRCC1 agiert in diesem Reparaturmechanismus vermutlich mit LIG3 (Kotnis *et al.*, 2009). Das A-NHEJ wird durch ein intaktes C-NHEJ unterdrückt und möglicherweise ebenfalls durch die HR (Dueva und Iliakis, 2013). Ob das A-NHEJ beim Fehlen zentraler Proteine des NHEJ in den ausdifferenzierten kortikalen Neuronen zum Tragen kommt, ist dabei derzeit unklar.

2.2.3 Strahleninduzierte Foci

Verschiedene an der DSB-Schadensantwort beteiligte Reparaturfaktoren akkumulieren in sog. strahleninduzierten Foci (RIF, engl. *radiation induced foci*). Als erster Faktor im Zusammenhang mit DNA-Schäden wurde 1998 die Histonmodifikation γ H2AX identifiziert, bei der es sich um die an Serin 139 phosphorylierte Histonvariante H2AX handelt. Infolge eines DSBs wird H2AX im Bereich von mehreren Megabasenpaaren (Mbp) auf beiden Seiten des Bruchs phosphoryliert und lässt sich in der Immunfluoreszenz (IFM) als RIF visualisieren (Rogakou *et al.*, 1998). Nach γ H2AX folgte die Entdeckung vieler weiterer Reparaturfaktoren, die in großer Zahl an einem DSB akkumulieren und sich in der IFM als RIF nachweisen lassen. Zu diesen gehören u.a. auch 53BP1 und MDC1 (Goldberg *et al.*, 2003; Schultz *et al.*, 2000). Im Laufe dieser Zeit entwickelte sich die Hypothese, dass jeder

DSB genau durch einen Focus markiert wird (Rothkamm und Löbrich, 2003). Auf Basis dieser Hypothese hat sich das Quantifizieren von γ H2AX-Foci zu einer Methode entwickelt, welche es ermöglicht, die Zahl und die Reparatur von DSBs auch in physiologisch und klinisch relevanten Dosisbereichen zu untersuchen. Die Untersuchung der DSB-Reparatur erfolgte bis zu diesem Zeitpunkt überwiegend mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) oder anderen Methoden, die DSBs auf physikalischer Basis detektieren, wie dem neutralen *Comet-Assey* oder der neutralen Filterelution (Ahn *et al.*, 1991; Cedervall *et al.*, 1995; Flentje *et al.*, 1993; Nevaldine *et al.*, 1994; Olive und Banáth, 1995; Ruiz de Almodóvar *et al.*, 1994; Sarkaria *et al.*, 1998). Aufgrund der geringen Sensitivität dieser Untersuchungsmethoden muss hier mit sehr hohen Dosen im Bereich von 20-80 Gy gearbeitet werden.

Eine mögliche biologische Bedeutung der RIF im Rahmen der DSB-Reparatur war lange Zeit unklar. Forschungsergebnisse der letzten Jahre deuten immer mehr auf eine Funktion der RIF-assoziierten Proteine im Zusammenhang mit der chromatinvermittelten DSB-Reparatur hin (Goodarzi *et al.*, 2008; Noon *et al.*, 2010). Die in RIF akkumulierenden Faktoren scheinen nur in bestimmten Chromatinstrukturen aufzutreten und vielmehr eine Rolle bei der Modifizierung der Chromatinstruktur und der Freilegung der DNA-Schäden zu spielen, als bei der eigentlichen Reparatur des Bruchs (Rübe *et al.*, 2011). Ein derzeitiger Forschungsschwerpunkt in der DSB-Reparatur liegt daher vor allem in der Entschlüsselung der genauen Funktion der einzelnen RIF-bildenden Faktoren im Zusammenhang mit der chromatinabhängigen DSB-Reparatur. Auch die Bedeutung der NHEJ-abhängigen DSB-Reparatur im Kontext der neuronalen Chromatinstruktur ist hierbei weitgehend unbekannt.

2.3 Chromatin und seine Struktur

Unter Berücksichtigung, dass die DNA in eukaryontischen Zellen nicht frei im Zellkern vorliegt, sondern als hochstrukturierter Komplex aus Proteinen und DNA (Chromatin), wird die eigentliche Komplexität der DSB-Reparatur deutlich. Wie dicht verschiedene DNA-Sequenzen in der dynamischen Chromatinstruktur des Zellkerns gepackt sind, wird durch unterschiedliche Komprimierungsprozesse gesteuert.

2.3.1 Chromatinaufbau

Die Basiseinheit des Chromatins (Nukleosom) setzt sich zusammen aus einem basischen Proteinoktamer (Histonoktamer), das aus jeweils zwei homologen Exemplaren der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 besteht sowie 146 Basenpaaren (bp) DNA, die 1.7x um das Oktamer gewickelt sind (Downs *et al.*, 2007). Von außen werden die Nukleosome durch das Linker-Histon H1 fixiert und die einzelnen Nukleosomen durch eine 10-20 bp lange freie „Linker-DNA“ von einander separiert (Seyffert, 2003). So wird die DNA mit einem Durchmesser von 2 nm zu einer perlenkettenartigen Struktur mit einem Durchmesser von 10 nm aufgewickelt. Diese Kette wird dann weiter zur sog. Solenoid-Struktur (30 nm-Faser)

aufgewunden (Abbildung 2.2 (A)) und an der Kernlamina aufgehängt. Hierbei sind die genarmen Regionen der Interphasechromosomen an der Kernperipherie lokalisiert, während die genreichen Regionen im Inneren des Zellkerns liegen (Boyle *et al.*, 2001). Die einzelnen Chromosomen sind dabei in diskreten Territorien (Chromosomenterritorien) im Zellkern platziert (Lichter *et al.*, 1988).

Wie dicht die DNA genau gepackt ist, wird von zahlreichen Faktoren bestimmt. In den Interphasezellkernen eukaryontischer Zellen unterscheidet man zwei morphologisch unterscheidbare Zustände des Chromatins: (1) das diffuse, locker gepackte, weniger dichte Euchromatin (EC) und (2) das kondensierte, dicht gepackte und inaktive Heterochromatin (HC; Seyffert, 2003). Gesteuert wird die Chromatinstruktur durch zwei Basismechanismen: (1) kovalente Änderungen am Chromatin durch DNA-Methylierung oder Modifikation von Aminosäureresten an den N-terminalen Histonarmen, die aus dem Kern des Nukleosoms herausragen (Abbildung 2.2 (B)) und/oder (2) nicht-kovalente Modifikationen durch Protein-Protein oder Protein-DNA Interaktionen (inklusive ATP-abhängigem *Chromatin-remodeling*; Misri *et al.*, 2008).

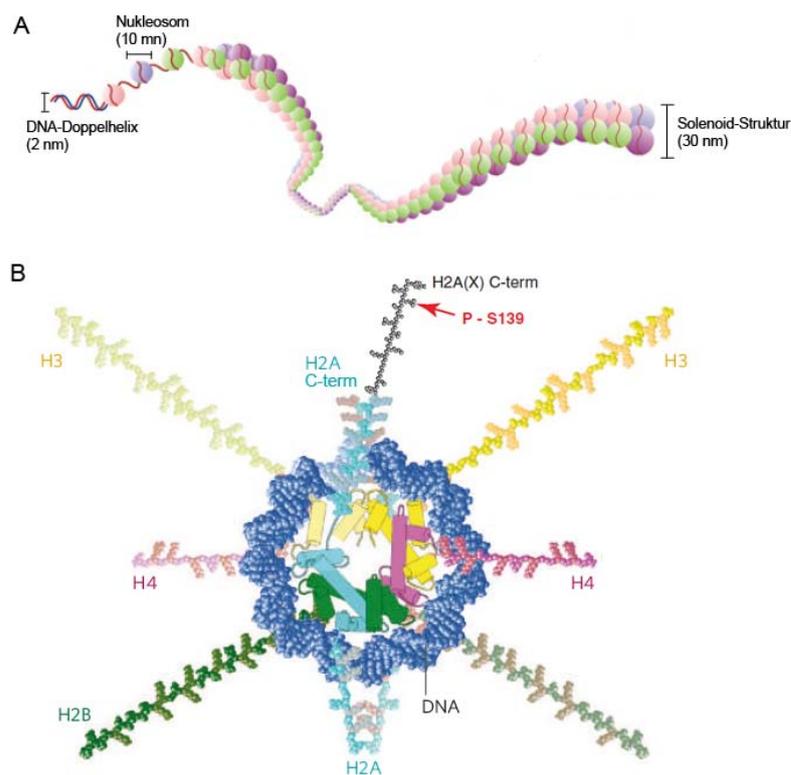


Abbildung 2.2 Aufbau und Struktur des Chromatins

Die DNA liegt im Zellkern einer eukaryontischen Zelle als hochgeordnete Struktur vor. (A) Die DNA-Doppelhelix ist zunächst 1.7x um ein Oktamer aus vier verschiedenen Histonproteinen (H2A, H2B, H3 und H4) gewunden. Diese DNA-Proteinkomplexe (Nukleosome) bilden eine lange Kette, die wie die Perlen einer Perlenkette hintereinander aufgefädelt sind. Durch Aufwinden dieser Nukleosomenkette zur Solenoid-Struktur wird die DNA weiter verkürzt. (Modifizierte Abbildung nach Murray *et al.*, 2012) (B) Die N-terminalen Proteinenden der Histone H2A, H2B, H3 und H4, sowie die C-terminalen Proteinenden der beiden H2A-Histone ragen aus den Nukleosomenkernen heraus und sind an der Ausbildung höherer Chromatinstrukturen beteiligt. Einzelne Aminosäurereste dieser Histonenden können post-translational modifiziert werden und vermitteln so eine stärker oder schwächer gepackte DNA-Struktur. Auch der längere C-Terminus der H2A-Histonvariante H2AX verfügt über eine spezifische Phosphorylierungsstelle. (Modifizierte Abbildung nach Kinner *et al.*, 2008)

2.3.2 Histoncode

Basierend auf der Hypothese, dass spezifische Histonmodifikationen für die höhere Struktur des Chromatins verantwortlich sind, hat sich die Hypothese des „Histoncodes“ entwickelt (Strahl und Allis, 2000). Diese Hypothese geht davon aus, dass durch individuelle Modifikationen an individuellen Histondomänen Chromatinassoziationen spezifisch geschwächt oder gestärkt werden. Durch das Rekrutieren von Nicht-Histonproteinen wird die Dynamik der höher geordneten Chromatinstruktur in euchromatischen und heterochromatischen Bereichen zusätzlich unterstützt. Post-translationale Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitylierung oder Sumoylierung) an den Aminosäuren (AS) der aus den Nukleosomenkernen herausragenden N-terminalen Histonarme (Abbildung 2.2 (B)) spielen hierbei eine essenzielle Rolle. Die durch spezifische Enzyme übertragenen Gruppen sind dabei sehr charakteristisch für bestimmte Chromatin-konfigurationen. Während ein hoher Grad an Acetylierung typisch für euchromatische Histone ist, kann die Methylierung (1-3 Methylgruppen pro AS Lysin) sowohl typisch für euchromatische als auch für heterochromatische Strukturen sein (Xu und Price, 2011). Durch die Acetylierung der basischen Aminosäure Lysin wird die positive Ladung neutralisiert und die Interaktion mit der negativ geladenen DNA geschwächt, was zu einer Dekondensierung der Chromatinstruktur führt (Misri *et al.*, 2008). Daher ist die Menge an Acetylierungen in heterochromatischen Histonen sehr niedrig, während die Methylierung von Lysin 9 an Histon H3 (H3K9) dagegen sehr ausgeprägt ist (Xu und Price, 2011). Da die Methylierung, im Gegensatz zur Acetylierung, keine Ladungsänderung verursacht, geht man derzeit davon aus, dass die Methylgruppen als Bindungsstelle für chromatinassoziierte Faktoren dienen. Die heterochromatische Histonmodifikation H3K9me3 wird beispielsweise vom Heterochromatin Protein 1 (HP1) gebunden und vermittelt so die Bildung heterochromatischer Strukturen (Misri *et al.*, 2008). Auch der Transkriptionsrepressor KAP1 ist durch die Bindung an HP1 an der Ausbildung heterochromatischer Chromatinstrukturen beteiligt (White *et al.*, 2012). Aber auch von den anderen Modifikationen, inklusive der Acetylierung, ist bekannt, dass sie als Bindungsstelle für Nicht-Histonproteine dienen.

Auch im Rahmen der DNA-Schadensantwort kommt es zur Bindung zahlreicher spezifischer Histonmodifikationen durch verschiedene Nicht-Histonproteine. Die Bindung von MDC1 an γ H2AX stellt hierbei nur ein Beispiel dar (Stucki *et al.*, 2005). Auch Acetylierungen und Methylierungen sind wesentliche Komponenten während der chromatinvermittelten DNA-Schadensantwort (Misri *et al.*, 2008). Insbesondere die Acetylierung von H4K16 steht in enger Verbindung mit der chromatinabhängigen DNA-Schadensantwort (Gupta *et al.*, 2005, 2008; Li *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010). Ein exakter Mechanismus im Rahmen der Prozessierung von DSBs in Abhängigkeit der gegebenen *in vivo* Chromatinstruktur einer

bestimmten Funktionszelle, z.B. der von transkriptionell hochaktiven Neuronen, ist dabei bisher kaum untersucht.

2.4 Klinische Strahlentherapie

Die Radio- oder Strahlentherapie stellt die therapeutische Anwendung von ionisierender Strahlung dar, insbesondere zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Sie kommt bei ca. 60-70% der Tumorpatienten alleine oder in Kombination mit Operation und/oder Chemotherapie im Rahmen der Behandlung zum Einsatz (Kauffmann *et al.*, 2006). Routinemäßig findet hierbei hoch energetische elektromagnetische Strahlung (harte Röntgenstrahlung) ihren Einsatz, die an Linearbeschleunigern erzeugt wird. Um das umliegende gesunde Normalgewebe bestmöglich zu schützen und Normalgewebstoxizitäten möglichst gering zu halten, ist eine gute Anpassung des Bestrahlungsfelds an die Konturen des Tumors wichtig. Eine solche Anpassung ist heute durch elektronisch gesteuerte Metalllamellen im Beschleuniger (*Multileaf*-Kollimatoren) schnell und einfach möglich. Bei Applikation einer einzelnen hohen Dosis reagieren Normalgewebszellen ähnlich empfindlich wie die entsprechenden Tumorzellen. Gibt man dem Normalgewebe allerdings durch fraktionierte Bestrahlung die Möglichkeit sich zu regenerieren, zeigt sich ein geringeres Zellüberleben der Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen, da diese ein besseres Regenerationspotenzial besitzen als Tumorzellen (Sauer, 1993). Während einer konventionellen Fraktionierung wird der Tumor i.d.R. einmal täglich, an fünf Tagen in der Woche, über mehrere Wochen mit einer Dosis von 1.8-2 Gy bestrahlt (Sauer, 1993). Während einer konventionellen Therapie wird die Dosis meist auf drei Bestrahlungsfelder aus drei Richtungen aufgeteilt. Neue Bestrahlungsmethoden wie die Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT, engl. *Intensity-Modulated Radiation Therapy*) ermöglichen eine noch exaktere Anpassung des Bestrahlungsvolumens an irreguläre Planungszielvolumina (PTV, engl. *planning target volume*) und eine bessere Schonung von Risikoorganen. Durch Überlagerung von mehreren irregulären Teilfeldern können Dosen in Risikoorganen verringert und damit bei optimaler Erfassung des Tumors besser geschützt werden. Die Verwendung von mehreren Bestrahlungsfeldern (7-9) bei einer IMRT verursacht allerdings die Belastung großer Normalgewebsvolumina mit niedrigen bis sehr niedrigen Strahlendosen. Auch bei der stereotaktischen Bestrahlung kommt es zur Belastung großer Volumina an umliegendem Normalgewebe. Hierbei handelt es sich um eine stark fokussierte, hoch dosierte Bestrahlung eines kleinen Zielvolumens (1-40 cm³), die durch einen steilen Dosisabfall am Rand des PTV charakterisiert ist (Bamberg *et al.*, 2003). Die Weiterentwicklung von Fixationssystemen ermöglicht auch bei dieser Methode eine Dosisfraktionierung (stereotaktische fraktionierte Strahlentherapie; Gademann *et al.*, 1993; Schlegel *et al.*, 1992). Heute wird die stereotaktische Bestrahlung vor allem bei der Behandlung von gut- und bösartigen Tumoren im Schädel eingesetzt (Bamberg *et al.*, 2003). Die Bestrahlung erfolgt nach einer

3-dimensionalen Zielvolumen- und Dosisberechnung mittels Rotationstechnik in Bögen (5-10) oder über mehrere (6-12) *non-koplanare* Stehfelder (Bamberg *et al.*, 2003). Hierbei kommt es zur Belastung großer Bereiche gesunden Gewebes mit niedrigen Strahlendosen, deren Effekte bisher nicht untersucht sind. Die Charakterisierung der Auswirkungen einer solchen wiederholten Belastung von gesundem Gehirngewebe mit niedrigen Dosen ist daher von besonderer Relevanz für evtl. Spätfolgen nach einer Therapie.

2.5 Zellen des zentralen Nervensystems

Das Gehirn ist das wohl ausgefeilteste und komplexeste Organ von Vertebraten und bildet die hochstrukturierte Schaltzentrale eines Organismus. Seine Unversehrtheit ist daher essenziell für dessen Integrität. Es entspricht etwa 2% der Körpermasse eines erwachsenen Menschen, verwertet aber ca. 20% des Sauerstoffs und der Energie und bildet so eines der aktivsten Organe (MacDonald, 2009). In ihm werden die Informationen aus der Umwelt und dem Körper gefiltert und verarbeitet. Verschiedene Regionen des Gehirns übernehmen dabei unterschiedliche Funktionen. Der zerebrale Kortex (die Großhirnrinde, lat. *cortex cerebri*) ist dabei für das Denken und unsere Wahrnehmung verantwortlich (Nagel, 2012).

Im Gehirn gibt es zwei wichtige Zellpopulationen: die Nervenzellen (Neurone) und die Gliazellen. Obwohl die Neurone nur etwa 10% der Zellen im Gehirn ausmachen (etwa 100 Milliarden beim Menschen), bilden sie die vermutlich wichtigste Zellpopulation. Sie erfassen die Reize, leiten diese weiter und lösen eine Reaktion aus (Bear *et al.*, 2008). Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper (Soma) mit dem Zellkern und mehreren Fortsätzen (Neuriten). Die Neuriten können in zwei Kategorien unterteilt werden: (1) ein Axon, welches für die Reizweiterleitung in Form von elektrochemischen Signalen verantwortlich ist und (2) meist mehrere Dendriten, welche die Reize empfangen und mehrere Neurone miteinander vernetzen. An den Synapsen, welche die Nervenzellen untereinander verschalten, erfolgt die chemische Impulsweiterleitung zwischen den Neuronen durch Neurotransmitter. Spezifische neuronale Proteine, wie z.B. NeuN, ermöglichen es, Neurone in der Immunhistologie eindeutig zu identifizieren. Die Gruppe der Gliazellen umfasst die nicht neuronalen Zellen des Gehirns, die kein Aktionspotenzial generieren können. Sie unterstützen die neuronalen Funktionen durch verschiedene Aufgaben. Man unterscheidet drei große Gruppen von Gliazellen: Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten (Gratzl *et al.*, 2005). Die Mikroglia sind die Immunzellen des Gehirns. Diese speziellen Makrophagen sind ausschließlich im Gehirn zu finden und beseitigen durch Phagozytose unerwünschte Eindringlinge wie Viren, Bakterien oder geschädigte Neurone und Gliazellen. Die Oligodendrozyten produzieren die Myelinschicht, welche die Axone umwickelt und isoliert. Die Astrozyten sind an der Bildung der Blut-Hirn- sowie der Blut-Liquor-Schranke beteiligt und versorgen die Neurone mit Nährstoffen und Sauerstoff. Außerdem regulieren sie das chemische Milieu des

Extrazellulärums, halten die Neurone an ihrem Platz und können durch Rezeptoren für Neurotransmitter mit den Neuronen kommunizieren und anscheinend sogar deren Signale beeinflussen (Bear *et al.*, 2008).

2.6 Genetische DNA-Reparaturdefekte beim Menschen

Die beiden Defekte, die in dieser Arbeit am Mausmodell untersucht werden, beruhen auf dem Verlust der Proteinkinasen ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*) oder DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*). Sie gehören zur Familie der PIKKs (*phosphoinositol 3-kinase-related kinases*), die an der Reparatur von DSBs beteiligt sind. Ist eine dieser Kinasen beim Patienten durch eine Mutation inaktiviert, führt dies zu schwerwiegenden genetischen Defekten. Beide Defekte sind sowohl mit Radiosensitivität, Immundefizienz und einem erhöhten Krebsrisiko verbunden sowie zum Teil mit neuronalen Degenerationen. Das Auftreten neuronaler Degenerationen macht die Charakterisierung der DSB-Reparatur in neuronalen Geweben besonders bedeutsam.

2.6.1 Ataxia Teleangiectasia (A-T)

Ataxia Teleangiectasia (A-T) ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, bei der durch Mutation beider ATM-Allele kein funktionsfähiges ATM-Protein gebildet wird. Die Inaktivierung des ATM-Gens resultiert meistens aus einer *frameshift* oder *nonsense* Mutation, seltener aus einer *missense* Mutation (~10%) mit unbekanntenen Konsequenzen auf die ATM-Funktion (Jacquemin *et al.*, 2012). Die Serin/Threonin-Kinase ATM phosphoryliert während einer DNA-Schadensantwort zahlreiche Substrate, darunter auch eine Vielzahl an Proteinen, die für die Aktivierung eines Zellzyklusarrests oder von Apoptose wichtig sind (Shiloh, 2006). Durch eine beeinträchtigte DSB-Reparatur sind die Patienten hypersensitiv gegenüber ionisierender Strahlung und Radiomimetika, besitzen durch chromosomale Instabilität eine Prädisposition für maligne Tumore (Malignome) und sind immundefizient (Frappart und McKinnon, 2006). Außerdem zeigen sie neurodegenerative Symptome, wie eine progressive zerebellare Ataxie durch Degeneration von Purkinje- und Granularzellen. Heterozygote Träger zeigen keine Symptomatik. Die Prävalenz für eine heterozygote ATM-Mutation liegt bei etwa 1% (Swift *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 2005).

2.6.2 Radiosensitive-Severe Combined Immunodeficiency (RS-SCID)

Severe Combined Immunodeficiency (SCID) ist zunächst ein Sammelbegriff für das Syndrom eines angeborenen primären Immundefekts, bei dem typischerweise die (T- und B-) Lymphozyten reduziert sind oder ganz fehlen. Bei ca. 30% der Patienten ist dies auf einen Defekt in der V(D)J-Rekombination zurückzuführen (van der Burg *et al.*, 2006). Ca. 70% dieser SCID-Patienten haben eine Mutation im RAG1- oder RAG2-Gen (*recombination activation gen 1 bzw. 2*), welche essenziell für die initiale Phase (die Induktion von DSBs) der V(D)J-Rekombination sind (Schatz, 2004; Schwarz *et al.*, 1996). Der Hauptanteil der

anderen Patienten zeigt eine Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, weshalb es auch als *radiosensitive* SCID (RS-SCID) bezeichnet wird. Der Defekt resultiert beim Menschen i.d.R. aus einer Mutation in einer der zentralen Komponenten des NHEJ; Artemis (überwiegender Teil der RS-SCID Patienten), DNA-Ligase 4 (LIG4-Syndrom) oder XLF (Buck *et al.*, 2006a; van der Burg *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002; Moshous *et al.*, 2001; O'Driscoll *et al.*, 2001). Eine Mutation im *Prkdc*-Gen, das die Proteinkinase DNA-PKcs codiert, wie es bei SCID-Mäusen, -Pferden und -Hunden bekannt ist, war bis vor Kurzem beim Menschen nicht bekannt. Inzwischen sind zwei Fälle mit Mutationen im *Prkdc*-Gen beschrieben, die sich in den Mutationen, der Proteinexpression, der Enzymaktivität und dadurch auch in ihrer Symptomatik stark unterscheiden (van der Burg *et al.*, 2009; Woodbine *et al.*, 2013).

2.7 Fragestellung

Das zentrale Nervensystem (ZNS) besteht im Wesentlichen aus zwei Zelltypen, den Nervenzellen (Neurone), die für den Transport und die Verarbeitung von Informationen verantwortlich sind und den Gliazellen, die u.a. für die Versorgung der Neurone mit Nährstoffen sorgen und sich je nach Funktion in weitere Subklassen unterteilen. Wie die langlebigen, ausdifferenzierten Neurone auf eine wiederholte Exposition mit niedrigen Dosen ionisierender Photonenstrahlung reagieren, ist bisher kaum erforscht. Durch die zunehmende Anwendung neuer hochkonformaler Bestrahlungstechniken in der Radiotherapie gewinnen die Auswirkungen solcher niedrigen Strahlendosen auf gesundes Gewebe jedoch zunehmend an Bedeutung. Da im Gehirn keine Zellerneuerung stattfindet, werden geschädigte Neuronen nicht ausgetauscht. So können nicht oder nur unzureichend reparierte DNA-Schäden lebenslang erhalten bleiben und zu Spätfolgen im Alter führen. Daher liegt der Focus dieser Arbeit auf der Charakterisierung der Reparatur strahleninduzierter DSBs in den ausdifferenzierten Neuronen des Mauskortex. Um die komplexen biologischen Einflüsse eines lebenden Organismus einzubeziehen, erfolgt die Charakterisierung der DNA-Schadensantwort im *in vivo* Mausmodell.

Die DSB-Reparatur scheint insbesondere im Gehirn eine wichtige Rolle zu spielen, da Mutationen in den Kernkomponenten des NHEJ oder anderer DSB-Reparaturproteine, wie z.B. ATM (*Ataxia Teleangiectasia*, A-T), Mre11 (*A-T like disorder*, ATLD) oder Nbs1 (*Nijmegen breakage syndrome*, NBS), bei Patienten mit neuronalen Degenerationen assoziiert sind. Neben reparaturprofizienten C57BL/6-Wildtypmäusen werden deshalb auch reparaturdefiziente ATM^{-/-}-Mäuse, denen das Reparaturprotein ATM fehlt, sowie SCID-Mäuse, denen das Reparaturprotein DNA-PKcs fehlt, untersucht.

Da in den letzten Jahren die Bedeutung der Chromatinstruktur für die Detektion und die Reparatur von DSBs immer deutlicher wurde, wird in den kortikalen Neuronen der unterschiedlichen Genotypen insbesondere die chromatinabhängige DNA-Schadensantwort charakterisiert. Durch eine von unserer Arbeitsgruppe etablierte Methode lassen sich mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) DNA-Schäden direkt im Kontext des Chromatins untersuchen (Rübe *et al.*, 2011). Durch die Untersuchung und Charakterisierung verbleibender 53BP1-Foci soll mit Hilfe dieser Methode auf eine mögliche biologische Relevanz strahleninduzierter DSBs im Gehirn zurück geschlossen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

In den folgenden Abschnitten sind die verwendeten Geräte, Reagenzien und sonstige Materialien zusammengestellt, die für die Untersuchungen eingesetzt wurden.

3.1.1 Geräte und Software

Gerätebezeichnung	Bezugsquelle
Analysis Software Version 3.1	(FEI, Hillsboro, OR, USA)
Computer-Tomograph (CT) Philips Big Bore (120 kV)	(Philips, Amsterdam, Niederlande)
Cryokammer mit UV-Lampe	(klinikinterner Eigenbau)
Diamantmesser, 3,5 mm Länge, 45° Winkel	(Diatome AG, Biel, Schweiz)
Einbettungsautomat Shandon Exelsior ES	(Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA)
Einblockstation Tissue-Tek TEC	(Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Epifluoreszenzmikroskop Eclipse E600W inkl. Software NIS-Elements BR 3.0 und <i>digital slight</i> Kameras DS-2MBWc und DS-Fi1	(Nikon, Tokio, Japan)
Feinwaage BL2105	(Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Fluoreszenz-Filterblöcke <i>UV-2EC, B-2EC, Y-2EC</i>	(Nikon, Tokio, Japan)
Kimtech-Tücher	(Kimberly-Clark, Dallas, TX, USA)
Light-Cycler inkl. Software Version 3.5	(Roche, Basel, Schweiz)
Linearbeschleuniger Artist, MLC 160	(Siemens Medical Solutions, Malvern, PA, USA)
Magnetrührer Stuart CB162	(BioCote, Coventry, UK)
Mikroliterpipetten <i>0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl</i>	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
<i>0,5-10 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl</i>	(Brand, Wertheim, Deutschland)
Objektive <i>Plan 4x/0.10; Plan Apo 10x/0.45; Plan Apo 20/0.75; Plan Fluor 40x/0.75; Plan Apo 60x/1.40 oil; Plan Apo 100x/1.40 oil</i>	(Nikon, Tokio, Japan)
OriginPro Version 8.5 und 8.6	(OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA)
Pinnacle Planungssoftware Version 8.0	(Philips, Amsterdam, Niederlande)
Pipettierhilfe	(Hirschmann, Eberstadt, Deutschland)
Plexiglaszylinder	(interner Eigenbau)
Schlittenmikrotom RM2235	(Leica, Wetzlar, Deutschland)
Thermomixer MHR 23	(HLC BioTech, Bovenden, Deutschland)
Tischzentrifuge Biofuge fresco, temperierbar	(Heraeus, Hanau, Deutschland)

3. Material und Methoden

mit integriertem Rotor 7500 3328	
Transmissionselektronen Mikroskop, Tecnai G ² Biotwin inkl. TEM Imaging Analysis (TIA) Software und Kamera Mega View III	(FEI, Hillsboro, OR, USA)
Ultramikrotom Ultracut S	(Leica, Wetzlar, Deutschland)
Vortex-Mixer Vortexgenie2	(Scientific Industries, Bohemia, NY, US)
Waage BL3100	(Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Wasserbad	(GFL, Burgwedel, Deutschland)

Tabelle 3.1 Übersicht über die Absorptionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfilter

	DAPI (UV-2EC)	FITC (B-2EC)	T-Red (Y-2EC)
Extinktion	340-380 nm	465-495 nm	540-580 nm
DM	400 nm	505 nm	595 nm
Emission	435-485 nm	515-555 nm	600-660 nm

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikelbezeichnung	Bezugsquelle
Deckgläser (24 x 60 mm)	(R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)
Einbettkassetten für Gewebe	(NeoLab, Heidelberg, Deutschland)
Einwegspritzen 1 ml, 10 ml, 20 ml	(B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Grids, Nickel, 2 x 1 mm Schlitz	(Plano, Wetzlar, Deutschland)
Handschuhe, nitril	(Meditrade, Kiefersfeld, Deutschland)
Kanülen BD Microlance™ 3 26G ½“ 0,45 x 13 mm; 25G 1“, 0,5 x 25 mm; 20G 1 ½“, 0,9 x 40 mm	(BD, Drogheda, Irland)
Objektträger HistoBond®	(Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland)
Parafilm®	(Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA)
Pipettenspitzen weiß/gelb/blau	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Rasierklingen	(Plano, Wetzlar, Deutschland)
RT-PCR-Kapillare, Polycarbonat	(Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland)
Serologische Pipetten 2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen 0.5 ml; 1.5 ml; 2.0 ml 15 ml; 50 ml	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland) (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
Benzil	(London Resin Company, Berkshire, UK)
Blockierlösung für Ziege-Gold-Konjugate	(Aurion, Wageningen, Niederlande)
Blockierlösung Roti [®] ImmunoBlock, 10x	(Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
BSA-c [™] , 10%ig	(Aurion, Wageningen, Niederlande)
<i>acetyliertes Rinderserumalbumin</i>	
Chloroform	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Dako REAL [™] Retrieval Lösung	(Dako, Glostrup, Dänemark)
<i>Citratpuffer, 10x, pH 6.0</i>	
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	(Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
DNeasy [®] Blood & Tissue Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
Ethanol abs.	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Formalin, 37%ig	(VWR, Darmstadt, Deutschland)
Glutaraldehydlösung, 50%ig	(EMS, Hatfield, UK)
Glycin	(Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
H ₂ O _{dest.}	(B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Immersionsöl	(Merk, Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
NaCl-Lösung, 0.9%ig	(B. Braun, Melsungen, Deutschland)
para-Formaldehyd (PFA)-Lösung, 32%ig	(EMS, Hatfield, UK)
Paraplast [®] Paraffin	(Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
PBS nach Dulbecco, pH 7.2-7.4	(Universitätsapothekete, Homburg, Deutschland)
Pioloform BM18	(Plano, Wetzlar, Deutschland)
QuantiTect [®] SYBR [®] Green PCR Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
<i>rabbit</i> -Normalserum	(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)
Resinharz, LR-Gold	(London Resin Company, Berkshire, UK)
Rompun [®] 2%ig	(Bayer, Leverkusen, Deutschland)
Uranylacetat	(Merk, Darmstadt, Deutschland)
Ursotamin	(Serumwerk, Bernburg, Deutschland)
<i>Ketaminhydrochlorid 100mg/ml</i>	
VECTASHIELD [®] Hard-Set Eindeckmedium mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
Xylol	(Hedinger, Stuttgart, Deutschland)

3.1.4 Angesetzte Lösungen

Im folgenden Abschnitt sind die Lösungen zusammengestellt, die für die Experimente angesetzt wurden.

➤ **Narkoselösung**

➔ 120 µg/g KG Ketaminhydrochlorid (Ursotamin), 16 µg/g KG Rompun®

120 mg/ml Ursotamin (100 mg/ml Stammlösung)

1.6 mg/ml Rompun® (2%ige Stammlösung)

in 0.9%iger NaCl-Salzlösung

➔ 100 µl pro 10 g KG Maus

➤ **Fixierlösungen**

- *Fixierlösung für die Einbettung in Paraffin*

5% Formaldehyd (37%ige Stammlösung) 140 ml/l

66.8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O (M = 177,99 g/mol) 11.9 g/l

66.8 mM KH₂PO₄ (M = 136,09 g/mol) 9.1 g/l

pH 7.2-7.4 (einstellen)

- *Fixierlösung für die Einbettung in Resinharz (LR-Gold)*

2% PFA (32%ige Stammlösung)

0.05% Glutaraldehyd (50%ige Stammlösung)

in PBS (pH 7.2-7.4)

➤ **Anzusetzende Lösungen für die Immunfluoreszenz**

- *Ethanol-Verdünnungen*

Ethanol (abs.) mit H₂O_{dest.} Verhältnis 96:4; 9:1; 4:1 und 7:3

- *Citrat-Antigenretrieval*

Dako REAL™ Retrieval-Stammlösung 1:10 in H₂O_{dest.} verdünnt

- *Blockierlösung*

Roti® ImmunoBlock-Stammlösung 1:10 in H₂O_{dest.} verdünnt

➤ **Anzusetzende Lösungen für die Transmissionselektronenmikroskopie**

- *Befilmungslösung*

1.2% Pioloform (w/v) in Chloroform

➔ unter kontinuierlichem Rühren langsam in Chloroform lösen

- *Ethanol-Verdünnungen*
Ethanol (abs.) mit H₂O_{dest.} Verhältnis 3:7 und 1:1 (auf 4°C kühlen) 1:1, 7:3, 1:4 und 1:9 auf (-20°C kühlen, zusätzlich abs. Ethanol auf -20°C kühlen)
- *Infiltrationslösungen*
LR-Gold Resinharz mit Ethanol (abs.) im Verhältnis 3:7, 1:1 und 7:3 mischen und auf -20°C lagern (zusätzlich reines LR-Gold auf -20°C kühlen)
- *Benzillösung*
0.1% Benzil (w/v) in LR-Gold Resinharz lösen und auf -20°C kühlen
→ am Tag vorher frisch ansetzen
- *Aldehyd-Inaktivierungslösung*
50 mM Glycin in PBS lösen
→ nach 3 Monaten neu ansetzen
- *Inkubationspuffer*
0.1% BSA-c (10%ige Stammlösung) in PBS verdünnen
- *Glutaraldehyd-Fixierlösung*
2% Glutaraldehyd (50%ig Stammlösung) in H₂O_{dest.} verdünnen
- *Kontrastierungslösung*
2% Uranylacetat

3.1.5 PCR-Primer

Primer Sequenzen (5'→3'):

Wildtyp Allel (147 bp Produkt):

WT-Primer 1	5' -GCT GCC ATA CTT GAT CCA TG- 3'
WT-Primer 2	5' -TCC GAA TTT GCA GGA GTT G- 3'

Mutation Neo generic (280 bp Produkt):

Neo-Primer 1	5' -CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC- 3'
Neo-Primer 2	5' -AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC- 3'

3.1.6 Verwendete Antikörper

Polyklonale Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle (Bestellnr.)
Kanninchen-anti-53BP1	1:200	Bethyl, Montgomery, TX, USA (IHC-00001)
Kanninchen-anti-phospho 53BP1 (S25)	1:200	Bethyl, Montgomery, TX, USA (IHC-00053)
Kanninchen-anti-MDC1	1:200	Bethyl, Montgomery, TX, USA (IHC-00075)
Kanninchen-anti- γ H2AX	1:200	Bethyl, Montgomery, TX, USA (IHC-00059)
Kanninchen-anti-phospho DNA-PKcs (T2609)	1:200	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA (NBP1-02446)
Kanninchen-anti-phospho Ku70 (S5)	1:100	Abcam, Cambridge, UK (ab61783)
Kanninchen-anti-Histone H3 (trimethyl K9)	1:400	Abcam, Cambridge, UK (ab8898)
Kanninchen-anti-Histone H3 (acetyl K9)	1:100	Abcam, Cambridge, UK (ab10812)
Kanninchen-anti-Histone H3 (acetyl K9)	1:100	Epitomics, Burlingame, CA, USA (#1328-1)
Kanninchen-anti-Histone H4 (monome K20)	1:400	Abcam, Cambridge, UK (ab9051)
Kanninchen-anti-KAP1	1:100	Abcam, Cambridge, UK (ab104884)
Kanninchen-anti-phospho KAP1 (S824)	1:100	Bethyl, Montgomery, TX, USA (A300-767A)
Kanninchen-anti-cleaved Caspase3 (Asp175)	1:100	Cell Signaling, Danvers, MA, USA (#9661)
Kanninchen-anti-TGF β 1	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX; USA (sc-146)
Kanninchen-anti-Ki67	1:200	Abcam, Cambridge, UK (ab15580)

Monoklonale Antikörper	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle (Bestellnr.)
Maus-anti- γ H2AX	JBW301	1:500	Millipore, Darmstadt, Deutschland (05-636)
Maus-anti-NeuN	A60	1:500	Millipore, Darmstadt, Deutschland (MAB377)
Kanninchen-anti-Histone H4 (acetyl K16)	EPR1004	1:250	Abcam, Cambridge, UK (ab109463)
Kanninchen-anti-PARP1 (cleaved p25)	E51	1:100	Epitomics, Burlingame, CA, USA (#1051-1)
Ratte-anti-Maus Ki67	TEC-3	1:50	Dako, Glostrup, Dänemark (M7249)

3. Material und Methoden

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle (Bestellnr.)
Ziege-anti-Kanninchen IgG Alexa Fluor® 488	1:400	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (A11034)
Ziege-anti-Kanninchen IgG Alexa Fluor® 568	1:400	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (A11036)
Ziege-anti-Maus IgG Alexa Fluor® 488	1:400	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (A11001)
Ziege-anti-Maus IgG Alexa Fluor® 568	1:400	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (A11031)
Ziege-anti-Ratte IgG Alexa Fluor® 488	1:400	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (A11006)
Ziege-anti-Ratte IgG Alexa Fluor® 568	1:400	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (A11077)
Ziege-anti-Kanninchen IgG 6nm gold	1:30	Aurion, Wageningen, Niederlande (806.011)
Ziege-anti-Kanninchen IgG 10nm gold	1:30	Aurion, Wageningen, Niederlande (810.011)
Ziege-anti-Kanninchen F _{ab} -Fragment	1:20	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA (111-007-003)

3.2 Methoden

3.2.1 Verwendete Mausstämme

Im Rahmen der Versuche wurden neben reparaturprofizienten Wildtypmäusen auch reparaturdefiziente Mausstämme untersucht. Diesen strahlensensitiven Mausstämmen fehlt eine der für die Reparatur von strahleninduzierten DSBs wichtigen Proteinkinasen ATM oder DNA-PKcs.

3.2.1.1 C57BL/6N (C57BL/6)

Als Wildtypstamm wurden in den Experimenten männliche C57BL/6N-Mäuse verwendet. Die 2 Wochen, 8 Wochen, 12 Wochen und 24 Monate alten Tiere wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

3.2.1.2 CB17/Icr-Prkdc^{scid} (SCID-Mäuse)

Männliche strahlensensitive CB17/Icr-Prkdc^{scid}-Mäuse im Alter von 8 Wochen wurden von Janvier (Le Genest Saint Isle, Frankreich) bezogen. SCID-Mäuse wurden erstmals Anfang der 1980er Jahre von Bosma entdeckt (Bosma *et al.*, 1983). Die Tiere tragen eine natürliche autosomal-rezessive Punktmutation im Prkdc-Gen, welches die für die DSB-Reparatur wichtige Proteinkinase DNA-PKcs codiert. Die Tiere sind homozygot für das mutierte Prkdc^{scid}-Allel, welches auf Chromosom 16 lokalisiert ist. Durch die Punktmutation wird ein verfrühtes Stop-Codon generiert, welches zum Verlust von 83 C-terminalen Aminosäuren und der Kinaseaktivität führt. SCID-Tiere sind immundefizient, da sie über keine spezifische Immunabwehr verfügen. Die Tiere bilden aufgrund fehlender V(D)J-Rekombination keine spezifischen Immunglobulin- und T-Zellantigenrezeptorgene, weshalb sie weder ausgereifte B- noch T-Lymphozyten verfügen. Allerdings verfügen sie über einen normalen Gehalt an natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und Granulozyten und damit über eine intakte unspezifische Abwehr (Bosma und Carroll, 1991).

3.2.1.3 129S6/SvEVTac-Atm^{tm1Awb} (ATM^{x/y}-Mäuse)

Die 129S6/SvEVTac-Atm^{tm1Awb}-Mäuse stammen aus eigener Zucht. Hierzu wurden jeweils zwei heterozygote Weibchen mit einem heterozygoten Männchen verpaart, da die homozygoten Tiere infertil sind. Die beiden ursprünglichen Zuchtpaare wurden von Herrn PD Dr. rer. nat. R. Schubert und seiner Arbeitsgruppe (Allergologisches Labor, Klinikum der Johann Wolfgang von Goethe Universität, Frankfurt am Main, Deutschland) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Generiert wurde der Mausstamm im Labor von Dr. Anthony Wynshow-Boris. Durch Insertion einer Phosphoglycerinkinase (PGK)-Neomycin-Kassette (*neo*-Kassette) auf Chromosom 9 an Position 5979 des ATM-Gens kommt es bei Tieren, die dieses Gen tragen, zur Bildung

eines verkürzten ATM-Proteins, welches nicht mehr funktionsfähig ist (Barlow *et al.*, 1996). Der Genotyp der Mäuse wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) bestimmt (Kapitel 3.2.3 Genotypisierung). Die Proteinkinase ATM ist ein für die Reparatur von DSBs wichtiges Enzym, welches bei Patienten mit Ataxia Teleangiectasia (A-T Patienten) mutiert ist.

3.2.2 Tierhaltung

Alle Mausstämme wurden in Gruppen von bis zu sechs Tieren in IVC-Käfigen unter Standard-Laborbedingungen (Temperatur $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 10$ sowie ausgeglichenem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h : 12 h) in der Versuchstierhaltung der Experimentellen Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar gehalten. Die Fütterung erfolgte *ad libitum*, außerdem stand sterilisiertes Wasser jederzeit über Trinkflaschen zur Verfügung. Tierhaltung und Tierversuche erfolgten konform mit dem Tierschutzgesetz und den Vorgaben des Landesamtes für Gesundheit und Verbraucherschutz Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen des Saarlandes.

3.2.3 Genotypisierung der 129S6/SvEVTac-Atm^{tm1Awb}-Mäuse

Die 1983 von K.B. Mullis entwickelte PCR, für die er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt (Altmann und Mutter, 1993; Mullis *et al.*, 1986), ermöglichte es, schnell und einfach mit nur wenig genomischer DNA sicher den Genotyp der 129S6/SvEVTac-Atm^{tm1Awb}-Mäuse zu bestimmen.

3.2.3.1 DNA-Isolierung

Zur Bestimmung des Genotyps der 129S6/SvEVTac-Atm^{tm1Awb}-Tiere wurde mit dem DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen) entsprechend der Anleitung die DNA aus den Ohrstanzen der jungen Mäuse (4-5 Wochen) isoliert.

Hierzu wurde eine Gewebeprobe mit 180 μl ATL-Lysepuffer und 20 μl Proteinkinase K versetzt, kurz gemischt und über Nacht bei 56°C im Thermoblock lysiert, bis sich das Gewebe aufgelöst hatte. Nach 15-sekündigem Vortexen wurden 200 μl AL-Denaturierungspuffer und nach erneutem Vortexen 200 μl Ethanol (abs.) zugegeben und nochmals gründlich gevortext. Diese Mischung wurde auf eine 2 ml DNeasy Mini *spin* Säule pipettiert und bei 6 000 x g für 1 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die Säule in ein neues 2 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, die Säule mit 500 μl AW1-Waschpuffer befüllt und bei 6 000 x g 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule erneut in ein frisches 2 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, mit 500 μl AW2-Waschpuffer bestückt und die Lösung 3 min bei 13 000 x g vollständig über die Säule zentrifugiert. Abschließend wurde die Säule in einem 1.5 ml Zentrifugationsgefäß platziert und die auf der Säule gebundene genomische DNA mit 200 μl AE-Elutionspuffer – nach einminütiger Inkubation – durch Zentrifugation

(1 min bei 6 000 x g) eluiert. Die Lagerung der DNA-Lösung erfolgte bis nach Abschluss der PCR bei 4°C und anschließend dauerhaft bei -20°C.

3.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3 µl der DNA-Lösung wurden zu je 27 µl Master-Mix (QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix, *forward* und *reverse* Primer und RNase-freies Wasser (DEPC-Wasser)) zugegeben und einer PCR unterzogen. Die genaue Zusammensetzung der PCR-Ansätze und die PCR-Programme sind in Tabelle 3.2 und in Tabelle 3.3 aufgeführt. Das verwendete PCR-Protokoll wurde in Anlehnung an das von Jackson Laboratory empfohlene PCR-Programm zusammengestellt und optimiert.

Tabelle 3.2 PCR-Ansätze für die Amplifikation des ATM-Allelteilstücks

	WT-PCR	Mutations-PCR
QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix	15 µl	15 µl
Primer 1	0.45 µl	0.9 µl
Primer 2	0.45 µl	0.9 µl
DEPC-Wasser	11.1 µl	10.2 µl
DNA	3 µl	3 µl

Tabelle 3.3 PCR-Programm für die Amplifikation des ATM-Allelteilstücks

	WT-PCR			Mutations-PCR		
	Temp.	Zeit	Zyklen	Temp.	Zeit	Zyklen
Denaturierung und Polymeraseaktivierung	94°C	15 min	1x	94°C	15 min	1x
Amplifikation	Denaturierung	94°C	40 s	94°C	40 s	
	Anneling	58°C	45 s	55°C	45 s	35x
	Extension	72°C	45 s	72°C	45 s	
Abkühlen	40°C	10 min	1x	40°C	10 min	1x
	4°C	lagern		4°C	lagern	

3.2.4 Bestrahlungsplanung und Bestrahlung der Versuchstiere

Die Bestrahlungen erfolgten als Ganzkörperbestrahlung an einem Linearbeschleuniger (Artiste™, Siemens) mit einer Beschleunigungsspannung von 6 Megavolt (MV). Die Dosisapplikation erfolgte über ein senkrecht ausgerichtetes Strahlenfeld (Gantrywinkel 0°, Kollimatorwinkel 0°, Bestrahlungsfeld 30 cm x 30 cm) mit einer Dosisleistung von 2 Gy/min. Für die Bestrahlung wurden die nicht narkotisierten Tiere in Gruppen von 3-6 Mäusen in einen Plexiglaszylinder (19 cm Durchmesser) platziert. Zur Einschränkung der Bewegungsfreiheit der Tiere wurde eine Plexiglasscheibe (1.5 cm dick) mit Abstandshaltern in den Zylinder eingebracht, die einen 5 cm hohen Hohlraum für die Mäuse ließ. Durch die gewebeähnlichen Eigenschaften des Plexiglasses wurde gleichzeitig eine homogene

Dosisverteilung in der Maus bewirkt. Mit Hilfe des Pinnacle™ Planungssystems (Philips, Amsterdam, Niederlande) erfolgte vor der Bestrahlung eine 3-dimensionale Kalkulation der Dosisverteilung in der Maus anhand einer CT-Bildserie (1 mm Bildabstand; Abbildung 3.1).

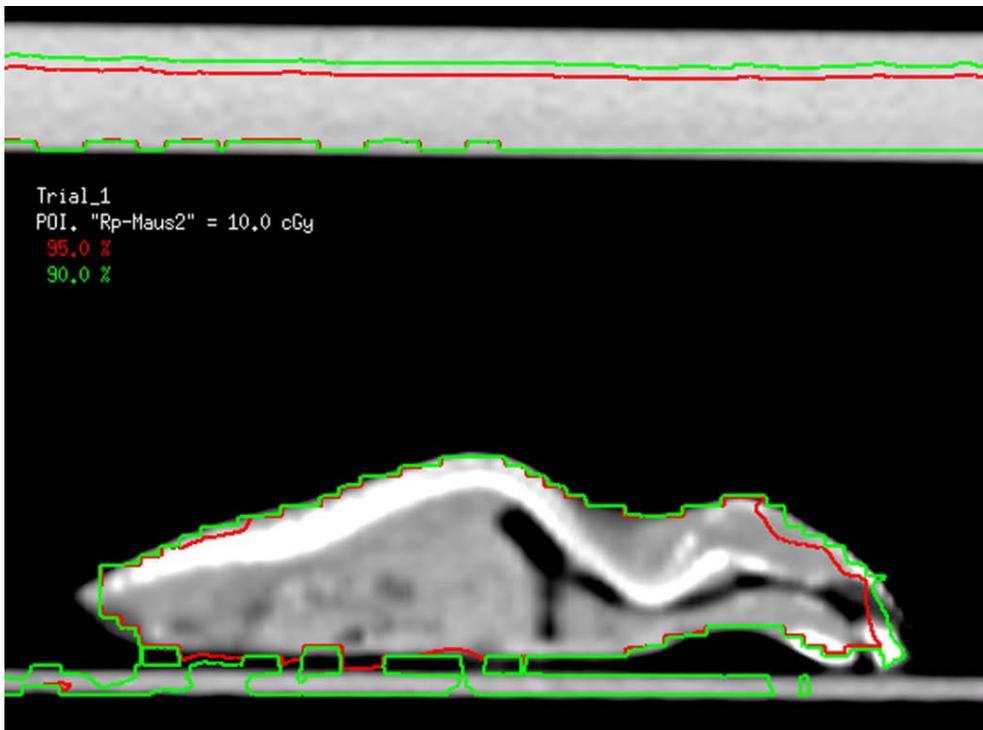


Abbildung 3.1 CT-geplante Dosisverteilung im Mausgewebe

Pinnacle™ geplante Dosisverteilung im Mausgewebe für eine Bestrahlung mit 100 mGy (= 10 cGy). Gezeigt sind die 90% (grün) und 95% (rot) Isodosenverteilungen exemplarisch in einer Ebene. Die Berechnung der Dosisverteilung erfolgte 3-dimensional auf Basis einer CT-Aufnahme (Bildabstand 1 mm) einer im Plexiglaszylinder mit Plexiglasdeckel platzierten Maus.

Die Bestrahlung mit hohen Dosen (2 Gy und 6 Gy) erfolgte im Abstand von 1 m zur Strahlungsquelle. Um bei der gegebenen Dosisleistung (2 Gy/min) auch niedrigere Dosen im mGy-Bereich zu realisieren, war ein größerer Abstand notwendig. Für die Bestrahlungen mit 10 mGy und 100 mGy wurde der Abstand zur Strahlungsquelle deshalb auf 2 m erhöht [Abstandsquadratgesetz: bei doppeltem Abstand beträgt die Dosisleistung nur noch ein Viertel]. Die Entnahme des Gehirngewebes erfolgte direkt nach der Bestrahlung (5 min), 30 min, 5 h, 24 h, 48 h, 72 h oder 6 Tage nach der Bestrahlung. Zur Gewebeentnahme direkt nach der Bestrahlung (5 min-Zeitpunkt) wurden die Tiere bereits vor der Bestrahlung narkotisiert, um einen möglichst frühen Zeitpunkt nach der Exposition zu realisieren.

Für die Fraktionierungsexperimente wurden die Tiere einmal täglich (Montag-Freitag) zum jeweils selben Zeitpunkt (Intervallabstände von 24 h) über einen Zeitraum von 2, 4, 6, 8 und 10 Wochen (entsprechend 10, 20, 30, 40 und 50 Fraktionen) mit 10 mGy bzw. 100 mGy bestrahlt. Die Entnahme des Gehirngewebes erfolgte 24 h bzw. 72 h nach der letzten Fraktion. Die fraktionierten Niedrigdosisexperimente sind in Abbildung 3.2 nochmals schematisch zusammengefasst. Als Vergleichskohorte dienten altersentsprechende

unbestrahlte Mäuse des entsprechenden Genotyps. Für die Versuche mit C57BL/6-Wildtypmäusen wurden pro Versuchsgruppe jeweils drei biologische Replikate generiert. Bei den Versuchen mit SCID-Mäusen und den Tieren aus eigener Zucht wurden im Schnitt zwei biologische Replikate angefertigt und diese durch technische Replikate ergänzt. In diesen Fällen wurden von jedem biologischen Replikat mindestens zwei Gewebeschnitte unabhängig voneinander gefärbt und ausgewertet.

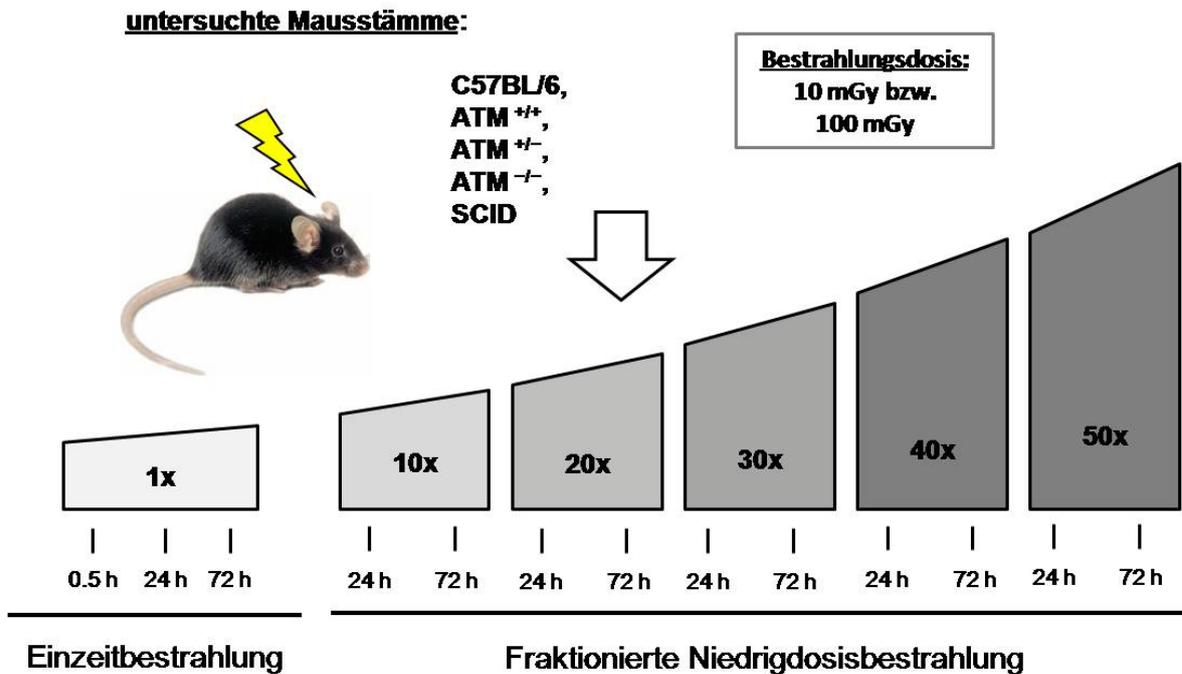


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Niedrigdosisexperimente

Die Abbildung fasst die verschiedenen Variablen (Genotyp, Dosis, Fraktionenzahl und Untersuchungszeitpunkt) des Niedrigdosisprojekts schematisch zusammen. Die maximale Fraktionenzahl variiert dabei je nach Genotyp. Die maximale Anzahl von 50 Fraktionen erhielten nur die reparaturprofizienten C57BL/6-Wildtypmäuse.

3.2.5 Gewebeentnahme und -asservation

Für die Gewebeentnahme zu den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten wurden die Mäuse nach Anästhesie durch intraperitoneale Gabe von Ketamin (120 µg/g KG; c = 12 µg/µl) und Rompun (16 µg/g KG; c = 1.6 µg/µl) in 0.9%iger NaCl-Lösung durch zervikale Dislokation getötet und das Gehirngewebe entnommen. Um eine möglichst schnelle und vollständige Fixierung des Gewebes zu gewährleisten, wurde das Gehirn bereits vor der Fixierung entlang der Frontalebene dreimal geschnitten, so dass vier ungefähr 4 mm dicke Gewebescheiben pro Gehirn entstanden.

3.2.5.1 Einbettung für die Immunfluoreszenz

Für die Asservation in Paraffin wurde das entnommene Gewebe in 4%iger normalgepufferter Formalinlösung (pH 7.4) über Nacht (ü. N.) bei Raumtemperatur (RT) fixiert (mindestens 16 h). Die fixierten Gewebe wurden durch Überführen in PBS von überschüssigem Fixativ befreit und kurzzeitig gelagert, bevor sie über Nacht in einem Einbettungsautomaten (Shandon Exelsior ES, Thermo Electron Corporation) automatisiert

entwässert und in Paraffin konserviert wurden. Die Dehydrierung erfolgte entsprechend eines Standardprotokolls des Labors der Neuropathologie des Universitätsklinikums in Homburg/Saar. Das Protokoll beinhaltet die schrittweise Entwässerung durch Inkubation mit aufsteigenden Ethanol-Konzentrationen (50%, 70%, 80%, 100%) sowie die anschließende wiederholte Inkubation in Xylol, um ein geeignetes Milieu für die Inkubation mit dem flüssigen Paraffin zu schaffen. Das Paraffin kann das Gewebe so vollständig durchdringen. Am darauf folgenden Tag wurden die Gewebe an einer Einblockstation (Tissue-Tek TEC, Sakura) mit Hilfe von Ausgießformen in Paraffinblöcke gegossen.

3.2.5.2 Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurde jeweils ein kleines Stück des zerebralen Kortex in phosphatgepufferter 2%iger PFA-Lösung mit 0.05% Glutaraldehyd (pH 7.2-7.4) ü. N. bei RT fixiert (mindestens 16 h). Die fixierten Gewebe wurden nach Entfernen von überschüssiger Fixierlösung durch 5-minütiges Waschen in 4°C kaltem PBS über eine stetig steigende Konzentration an Ethanol (30%, 50%, jeweils 15 min bei 4°C; 50%, 70%, 80% jeweils 30 min bei -20°C; 90% 1 h bei -20°C; 3x 100% jeweils 30 min bei -20°C) in einem 0.5 ml Reaktionsgefäß schrittweise dehydriert. Zum Austausch der Lösungen wurde diese vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und durch die neue Lösung ersetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gewebe währenddessen nicht austrocknete. Anschließend wurden die Präparate schrittweise mit ansteigenden Konzentrationen des in Ethanol verdünnten Resinharzes LR-Gold (30% 30 min bei -20°C; 50%, 70%, 100% jeweils 1 h bei -20°C) infiltriert. Die letzte Inkubation erfolgte ü. N. (mindestens 16 h) bei -20°C mit benzilhaltigem (0.1%ig) LR-Gold. Nach Erneuern der Lösung am nächsten Tag wurde das Harz unter UV-Licht für mindestens 16 h bei -20°C auspolymerisiert. Der Radikalstarter Benzil bildet unter UV-Exposition Radikale, welche das Harz durch eine Radikalkettenreaktion polymerisieren lässt.

3.2.6 Beschichtung von Gewebeträgern für die Elektronenmikroskopie

Um die für die Elektronenmikroskopie eingebetteten Präparate im TEM untersuchen zu können, mussten ultradünne Schnitte auf spezielle Gewebeträger (Grids) aufgebracht werden. Die hier verwendeten runden Grids (Durchmesser 3 mm) bestanden aus Nickel und waren mit einer Schlitzöffnung (1 mm x 2 mm) versehen, die eine maximale Durchstrahlfläche bieten. Damit das Gewebe aufgebracht werden konnte, musste die Öffnung der Grids zuvor mit einem dünnen Kunststofffilm aus Pioloform überzogen werden. Hierzu wurde Pioloform in Chloroform gelöst und die Lösung in einen Scheidetrichter gefüllt, in dem aufrecht ein zuvor mit Kernseife gereinigter Glasobjektträger platziert wurde. Die Lösung wurde mit konstanter Flussgeschwindigkeit langsam abgelassen, dabei blieb nach Verdampfen des Chloroforms ein dünner Pioloformfilm von 20-30 nm auf dem Objektträger

zurück. Die getrockneten Pioloformfilme wurden unter einer Schutzhaube aus Plexiglas auf die Wasseroberfläche einer mit destilliertem Wasser befüllten Wanne aufgebracht. Für eine partikelfreie Wasseroberfläche wurde diese vor dem Aufbringen des Films mit einem Glasstab abgezogen. Um den Film von der Oberfläche lösen zu können, wurden alle vier Kanten mit einer Rasierklinge oder einer Ritzspitze der Länge nach von oben bis unten angeritzt. Beim langsamen Eintauchen des Objektträgers löste sich der Film und schwamm auf der Wasseroberfläche. Die Grids wurden daraufhin mit einer Pinzette nebeneinander auf den Film aufgebracht und anschließend mit einem Stück Parafilmpapier von der Wasseroberfläche abgenommen. Nach dem Trocknen wurden die befilmten Grids in einer Plexiglasschale im Exsikkator bis zur Verwendung gelagert.

3.2.7 Sektionierung der Gewebe

Unterschiedlich asservierte Gewebepreparate wurden für die Auswertung methodenspezifisch sektioniert. Während für die IFM Standardschnitte mit einer Dicke von 4 µm verwendet wurden, wurden für die TEM-Untersuchungen ultradünne Schnitte (85 nm) benötigt.

3.2.7.1 Paraffinschnitte

Am Mikrotom (RM2235, Leica) wurden zunächst 4 µm dicke Gewebeschnitte von den Paraffingewebeblöcken abgetragen und auf Objektträger (HistoBond®, Marienfeld) aufgezogen. Um die Gewebeschnitte zu glätten, wurden sie kurz auf die Wasseroberfläche eines 50-52°C warmen Wasserbads gezogen bis sich der Schnitt in der Wärme gestreckt und geglättet hatte. Anschließend wurden die Präparate getrocknet (ü. N. bei 37°C oder übers Wochenende bei RT).

3.2.7.2 Schnitte für die Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchungen mittels TEM wurden die Präparate an einem Ultramikrotom (Ultracut S, Leica) zunächst trapezförmig auf eine Fläche von ca. 1 nm² getrimmt, um anschließend mit einem Diamantmesser (45° Klingenwinkel; Diatome) 85 nm dünne Gewebeschnitte abzutragen. Diese wurden von der Wasseroberfläche auf einen mit einem Pioloformfilm bespannten Nickel-Grid aufgenommen. Die Gewebeschnitte für diese Arbeit wurden netterweise von Yvonne Lorat angefertigt.

3.2.8 Immunologische Färbungen

Zur Untersuchung einzelner Antigene in der IFM bzw. TEM wurden die angefertigten Gewebeschnitte immunologisch mit entsprechenden Antikörpern markiert.

3.2.8.1 Reguläre Immunfluoreszenzfärbung

Vor der eigentlichen Antikörperfärbung war es notwendig, die paraffinisierten Gewebeschnitte zu rehydrieren und evtl. maskierte Epitope wieder freizulegen. Dafür wurden die Gewebeschnitte zunächst in Xylol entparaffinisiert (3x jeweils 7 min) und anschließend schrittweise in einer absteigenden Ethanol-Reihe (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, H₂O_{dest.}) für jeweils 3 min rehydriert. Durch Kochen in Citratpuffer (1 h im Wasserbad bei 95°C) wurden durch Quervernetzung mit Formaldehyd maskierte Epitope wieder freigelegt. Zur Schonung der Proben wurden sie vor der weiteren Prozessierung zunächst ca. 20 min akklimatisiert, bevor sie in destilliertes Wasser überführt wurden. Anschließend wurden die Gewebe für 1 h bei RT mit ImmunoBlock-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt 3.1.4) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Hierzu wurde jeder Objektträger mit 200 µl ImmunoBlock-Gebrauchslösung benetzt, mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt und in eine Feuchtkammer gelegt. [Alle weiteren Inkubationen mit Antikörpern erfolgten unter analogen Bedingungen mit denselben Volumina.] Vor dem Auftragen des in ImmunoBlock-Gebrauchslösung verdünnten Primärantikörpers wurde überschüssiger Lösung kurz die Möglichkeit zum Abfließen gegeben, ohne dass das Gewebe austrocknen konnte. Die Inkubation erfolgte für eine möglichst spezifische Bindung des Antikörpers ü. N. bei 4°C (mindestens 16 h). Falls in einer Probe zwei Antigene detektiert werden sollten (Doppelfärbung), wurden beide primären Antikörper (aus zwei unterschiedlichen Spezies) in einem Ansatz gemischt und parallel inkubiert. Doppelfärbungen mit Primärantikörpern aus derselben Spezies erfolgten entsprechend Abschnitt 3.2.8.2 (die Antikörperverdünnung erfolgte entsprechend Abschnitt 3.1.6). Nach 3-maligem Waschen in PBS (jeweils 10 min auf einem Magnetrührer), um überschüssigem Antikörper zu entfernen, wurden die Proben für 1 h bei RT mit in ImmunoBlock-Gebrauchslösung verdünnten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern unter Lichtausschluss inkubiert. Bei Doppelfärbungen wurden auch die beiden sekundären Antikörper, die mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt waren, gleichzeitig inkubiert (Antikörperverdünnung entsprechend Abschnitt 3.1.6). Zum Schutz des Fluorochroms vor lichtinduziertem Ausbleichen wurden die nachfolgenden Waschungen mit PBS (3x jeweils 10 min auf einem Magnetrührer) unter Lichtausschluss durchgeführt. Abschließend wurden die Präparate mit DAPI-haltigem wässrigem Eindeckmedium (Vectashield) asserviert, welches die Zellkerne durch Anfärben der DNA markiert. Vor der Auswertung härteten die Proben im Kühlschrank bei 4°C unter Lichtausschluss aus. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei 4°C im Dunkeln.

3.2.8.2 Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Primärantikörpern aus derselben Spezies

Analog zur regulären Immunfluoreszenzfärbung wurden die Präparate entsprechend Abschnitt 3.2.8.1 entparaffinisiert, rehydriert, maskierte Epitope durch Kochen in Citratpuffer

regeneriert, unspezifische Bindungsstellen mit ImmunoBlock-Gebrauchslösung abgesättigt und mit dem ersten primären und dem ersten sekundären Antikörper inkubiert. Die folgenden Schritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt, um die gebundenen Fluorochrome zu schützen. Nach 3-maligem Waschen in PBS (auf einem Magnetrührer) wurden die Proben für 1 h bei RT mit 200 µl 5% Kanninchen-Normalserum (Jackson) inkubiert und anschließend erneut 2x jeweils 10 min gewaschen. Um noch freie Kanninchen-Epitope abzusättigen, die später durch den zweiten fluoreszenzgelabelten anti-Kanninchen-Antikörper markiert werden würden, wurde für eine weitere Stunde bei RT mit 200 µl F_{ab}-Fragment Ziege-anti-Kanninchen (50 µg/ml in ImmunoBlock-Gebrauchslösung) inkubiert. Da dem F_{ab}-Fragment die antigenbindende F_c-Region fehlt, können nach dem Binden des F_{ab}-Fragments keine weiteren Antikörper mehr anlagern. Überschüssiges Protein wurde durch wiederholtes Waschen in PBS entfernt (3x jeweils 10 min auf einem Magnetrührer) und anschließend das zweite Epitop durch einstündige Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper markiert (200 µl, Verdünnung entsprechend Abschnitt 3.1.6 in ImmunoBlock-Gebrauchslösung). Vor und nach der Inkubation mit dem zweiten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (200 µl, 1 h bei RT, Verdünnung entsprechend Abschnitt 3.1.6 in ImmunoBlock-Gebrauchslösung) wurden die Proben erneut 3x in PBS (jeweils 10 min auf einem Magnetrührer) gewaschen und abschließend mit DAPI-haltigem Mountingmedium (Vectashield) asserviert, das die im Zellkern befindliche DNA anfärbt. Vor der Auswertung härteten die Proben im Kühlschrank bei 4°C unter Lichtausschluss aus. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei 4°C im Dunkeln.

3.2.8.3 Immunogoldfärbung

Die auf Grids aufgetragenen Gewebe wurden mit der Gewebeseite nach unten auf 30 µl-Tropfen der einzelnen verwendeten Reagenzien aufgebracht. Hierzu wurden die Tropfen in einer Feuchtkammer auf einen Streifen Parafilm[®] aufgebracht. Sofern nicht anders angegeben erfolgten alle Reagenzinkubationen bei RT. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die Gewebeschnitte zu Beginn für 20 min auf normalgepufferte Glycinlösung (50 mM; zur Inaktivierung von [elektrostatischen] Aldehydladungen) und anschließend für 30 min auf Blockierlösung (Aurion) aufgebracht. Nach 3-maliger Inkubation (jeweils 5 min) auf Inkubationspuffer (siehe Abschnitt 3.1.4) wurden die Grids auf den in Inkubationspuffer verdünnten Primärantikörper überführt und ü. N. bei 4°C eine langsame und dadurch sehr spezifische Bindung des Antikörpers an seine Antigene ermöglicht (Antikörperverdünnung entsprechend Abschnitt 3.1.6). Am nächsten Tag wurden die Proben auf Inkubationspuffer gewaschen (6x jeweils 5 min) und für 1.5 h in Inkubationspufferverdünntem, goldmarkiertem Sekundärantikörper (Partikelgröße 6 nm) inkubiert. Nach erneutem 6-maligem Waschen (jeweils 5 min) auf jeweils 30 µl Inkubationspuffer folgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper für 1 h bei 37°C (Antikörperverdünnung

entsprechend Abschnitt 3.1.6 in Inkubationspuffer) und 6-maliges Waschen auf Inkubationspuffer (jeweils 5 min). Die Inkubation mit dem zweiten goldmarkierten Sekundärantikörper (Partikelgröße 10 nm) erfolgte anschließend für 1.5 h. Die Präparate wurden daraufhin einer letzten Waschprozedur unterzogen (6x jeweils 5 min auf 30 µl Inkubationspuffer und 3x jeweils 5 min auf PBS) und die Markierungen abschließend mit 2%iger Glutaraldehydlösung für 30 min fixiert. Um überschüssiges Fixativ zu entfernen, wurden die Grids kurz auf einem Tropfen $H_2O_{dest.}$ abgetupft und am Grid verbliebene Flüssigkeit zum Schluss mit einem fusselfreien KimTech-Tuch am Rand abgesaugt. Die Proben trockneten in einer Gridbox weiter und wurden bis zur Untersuchung bei RT gelagert. Vor der Untersuchung am TEM wurden die Proben auf einem Tropfen 2%iger Uranylacetatlösung für 2 min mit der Gewebeseite nach unten kontrastiert. Anhaftende Uranylacetatlösung wurde durch Waschen auf einem Tropfen $H_2O_{dest.}$ entfernt und am Grid anhaftende Flüssigkeit mit einem fusselfreien KimTech-Tuch am Rand abgesaugt und weiter in einer Gridbox aufbewahrt. Das positiv geladene Uranylacetat lagert sich bevorzugt an negativ geladene Nukleinsäuren (DNA und RNA) an und bewirkt so einen stärkeren Kontrast des DNA-haltigen Chromatins.

3.2.9 Fluoreszenzmikroskopische Auswertungen

Untersucht wurden die für das Markerprotein NeuN positiven Neurone des zerebralen Kortex der Mäuse in frontalen Gehirnschnitten. Die Auswertung erfolgte an mittleren Schichten des Gehirns entlang des äußeren Kortex. Die Begutachtung der gefärbten Proben erfolgte am Nikon Eclipse E100 Fluoreszenzmikroskop (Nikon). Bilder wurden mit der Software NIS-Elements BR 3.0 (Nikon) aufgenommen. Auswertungen und graphische Darstellungen erfolgten mit den Programmen Excel 2007 (Microsoft), OriginPro 8.5 und 8.6 (OriginLab Corporation) und Photoshop CS3 bzw. CS4 (Adobe).

3.2.9.1 Foci-Quantifizierung

Die Quantifizierung der 53BP1-Foci wurde direkt am Mikroskop per Auge bei 600-facher Vergrößerung (60x Objektiv) durchgeführt. Pro Messpunkt und Probe wurden so viele Zellen und deren Focizahl gezählt, bis mindestens 40 Zellen und 40 Foci erfasst wurden. Der berechnete Wert an Foci pro Zelle pro Probe wurde über die Replikate gemittelt und der Standardfehler berechnet. Die Proben waren durch Nummern verschlüsselt, wodurch die Auswertung blind erfolgte.

3.2.9.2 Foci-Größenbestimmung

Der Focusdurchmesser wurde mit Hilfe der Mikroskopsoftware NIS-Elements BR 3.0 im 100x Objektiv bei maximaler Auflösung der Kamera (0.04 µm/px) gemessen. Für die Berechnung des mittleren Focusdurchmessers einer Probe wurden mindestens 100 Foci ausgemessen.

Die berechneten Werte wurden über die Replikate gemittelt und der Standardfehler berechnet.

3.2.9.3 Nicht quantitative Fluoreszenzuntersuchungen

Für die Untersuchung von Apoptose, Inflammation und Chromatinfaktoren wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Färbungen pro Untersuchungspunkt angefertigt und am Mikroskop bei 600-facher Vergrößerung (60x Objektiv) betrachtet. Für die Auswertung wurden bei gleicher Belichtungszeit (600 ms) und gleichem Signalverstärkungsfaktor (2.4x) repräsentative Aufnahmen von den entsprechenden Färbungen angefertigt.

3.2.10 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die TEM-Analysen wurden mit einem Tecnai G² Biotwin Mikroskop (FEI) durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte über die TEM-Software TEM *imaging* Analysis (TIA), deren Daten mit der Software Analysis (Version 3.1) in ein PC-kompatibles Format konvertiert wurden. Die Quantifizierung am TEM erfolgte manuell per Auge bei einer 60 000-fachen Vergrößerung von Yvonne Lorat. Hierzu wurden 50 Zellkernanschnitte ausgewertet, die anhand morphologischer Merkmale ausgewählt wurden. Ausgewertet wurden die großen runden neuronalen Zellkerne mit einem möglichst maximalen Durchmesser von 7-9 μm . Durch Bestimmung des mittleren Durchmessers der Zellkernscheibe wurde durch Verwendung der Zylinderformel bzw. der Kugelformel das Volumen der ausgewerteten Zellkernscheibe bzw. das Zellkernvolumen berechnet. Dabei wurde die Annahme zugrundegelegt, dass der ermittelte Durchmesser dem Durchmesser des Zellkerns entspricht. In der Doppelfärbung wurden anhand der unterschiedlichen Goldpartikelgrößen gleichzeitig 53BP1 (6 nm) und pKu70 (10 nm) Cluster pro Zellkernanschnitt ausgewertet und deren Kolokalisation erfasst. Für jeden Zellkernanschnitt wurden die im ausgewerteten Volumen gezählten Cluster auf die Schäden pro μm^3 -Zellkern bzw. pro Zellkern approximiert (Volumen der Zellkernscheiben: 3.3-5.4 μm^3 , approximiertes Zellkernvolumen zwischen 180-380 μm^3). Zur Bestimmung der durchschnittlichen Anzahl an Cluster/ μm^3 bzw. Cluster/Neuron wurde der Mittelwert aus den berechneten Ergebnissen bestimmt. Die Auswertungen der quantitativen Daten und die graphischen Darstellungen erfolgten mit den Programmen Excel 2007 (Microsoft), OriginPro 8.5 und 8.6 (OriginLab Corporation) und Photoshop CS3 bzw. CS4 (Adobe).

3.2.11 Statistische Auswertung

Zur Beurteilung potenzieller Unterschiede in den Focizahlen zwischen unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, um die statistische Signifikanz zu beurteilen. Verwendet wurde hierfür die Software OriginPro (Version 8.5 und 8.6, OriginLab Corporation). Das Signifikanzniveau wurde dabei mit $p \leq 0.05$ gewählt.

4 Ergebnisse

Die biologischen Auswirkungen einer Strahlenexposition von gesundem Gehirngewebe mit niedrigen Dosen im mGy-Bereich *in vivo* sind bislang kaum bekannt. Um die Bedeutung der DSB-Reparatur und seiner Faktoren im komplexen, neuronalen Gewebe zu beurteilen, wurden insgesamt fünf Mausmodelle (C57BL/6, ATM^{+/+}, ATM^{+/-}, ATM^{-/-}, SCID) untersucht. Da viele genetisch veranlagte Reparaturdefekte mit neuronalen Degenerationen assoziiert sind, wurde die DSB-Reparatur strahleninduzierter Schäden im Rahmen dieser Arbeit in den ausdifferenzierten Neuronen des Mausekortex analysiert. Neben reparaturprofizienten Wildtypmäusen wurden reparaturdefiziente Mäuse mit einem genetisch veranlagten DSB-Reparaturdefekt betrachtet, welcher durch eine Mutation in einer der Proteinkinasen ATM bzw. DNA-Pkcs verursacht wird.

4.1 Identifizierung und Charakterisierung der Chromatinstruktur in kortikalen Neuronen

Zur Untersuchung der Neurone des Mausekortex war es zunächst notwendig, diese klar zu identifizieren, um sie von anderen Zelltypen eindeutig zu unterscheiden. Auch die grundlegende Chromatinstruktur in den transkriptionell hochaktiven Neuronen unbestrahlter reparaturprofizienter C57BL/6-Wildtypmäuse wurde als Basis für die späteren Untersuchungen der chromatinabhängigen DSB-Reparatur charakterisiert.

4.1.1 Markierung von kortikalen Neuronen zur eindeutigen Identifizierung

Um die Neurone zu identifizieren und von anderen Zellen im zerebralen Kortex abzugrenzen, wurden Paraffinschnitte vom Kortex unbestrahlter, reparaturprofizienter C57BL/6-Mäuse angefertigt und die Neurone mit dem neuronalen Marker NeuN immunologisch markiert. Bereits morphologisch ließen sich die Neurone von den meisten Gliazellen abgrenzen, da sie sich in Größe und Form unterscheiden. Die kortikalen Neurone zeichneten sich durch einen großen runden Zellkern mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 8-9 µm aus. Damit waren die neuronalen Zellkerne wesentlich größer als die der Gliazellen und ließen sich bereits nach Anfärben der nukleären DNA gut identifizieren. Durch das Anfärben des spezifischen neuronalen Markerproteins NeuN, das ausschließlich in ausdifferenzierten Neuronen exprimiert wird, konnten die Neurone zusätzlich und eindeutig identifiziert werden (Abbildung 4.1).

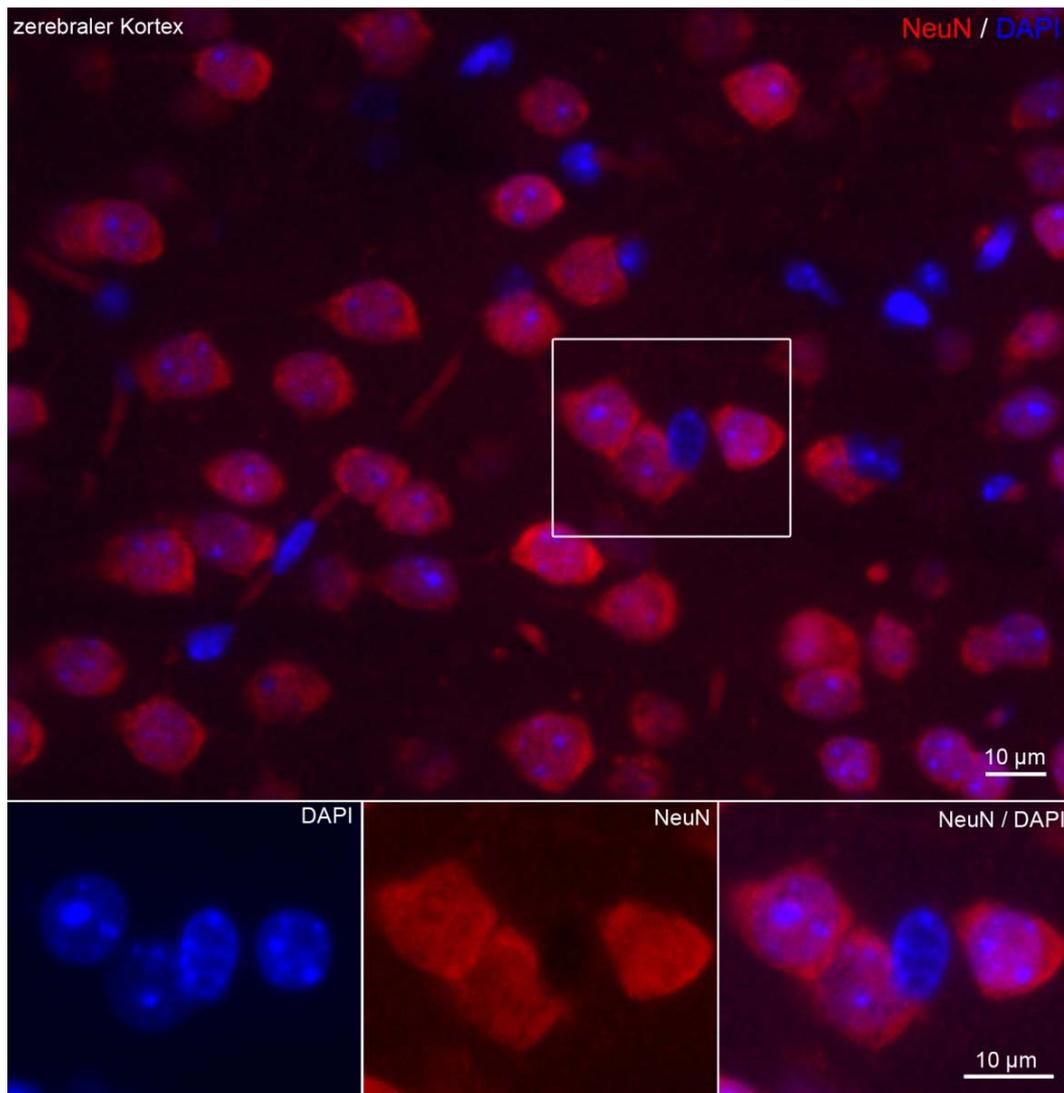


Abbildung 4.1 Markierung von Neuronen im zerebralen Kortex

Übersichtsaufnahme des zerebralen Mausekortex, in dem die Neurone durch das Markerprotein NeuN (rot) markiert wurden. Die nukleäre DNA ist mit dem DNA-Farbstoff DAPI (blau) angefärbt. Die nicht neuronalen Zellen (Gliazellen) sind NeuN negativ und lediglich anhand ihrer DAPI-gefärbten Zellkerne (blau) zu identifizieren.

4.1.2 Untersuchung der Chromatinstruktur in kortikalen Neuronen

Da die DSB-Reparatur insbesondere im Kontext der neuronalen Chromatinstruktur untersucht werden sollte, wurde die Organisation des Chromatins zunächst in unbestrahlten Neuronen charakterisiert, um potentielle bestrahlungsabhängige Veränderungen in den folgenden Untersuchungen beurteilen zu können. Hierzu wurden zunächst die Neurone in Paraffinschnitten des zerebralen Kortex unbestrahlter Mäuse in der Doppelfärbung mit NeuN für verschiedene Histonmodifikationen analysiert. Bereits durch Anfärben der DNA mit dem DNA-Farbstoff DAPI ließen sich verschiedene DNA-Strukturen im Zellkern erkennen. Je nach Dichte der DNA erscheinen die unterschiedlichen Chromatinstrukturen (EC bzw. HC) unterschiedlich hell. Durch die geringe DNA-Dichte des locker gepackten, transkriptionell aktiven EC, erscheint dieses nur schwach blau, während das hoch kompakte, transkriptionell inaktive HC (durch seine hohe DNA-Dichte) viel DNA-Farbstoff einlagert und sich intensiv blau darstellt. Da Neurone transkriptionell hoch aktive Zellen sind und eine ausgeprägte

4. Ergebnisse

Proteinbiosynthese stattfindet, verfügen sie im Vergleich zu anderen Zellen über einen höheren Anteil an EC (Gratzl *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu humanen Zellen haben Mauszellen außerdem die Besonderheit von sog. Chromozentren. Hierbei handelt es sich um hoch kondensierte heterochromatische Strukturen (sog. konstitutives HC) in denen sich die zentromeren Satellitensequenzen von mehreren Chromosomen zusammen lagern (Guenatri *et al.*, 2004). Diese Chromozentren lassen sich durch ihre starke Anfärbung mit DAPI in der Immunfluoreszenz gut identifizieren (Abbildung 4.2).

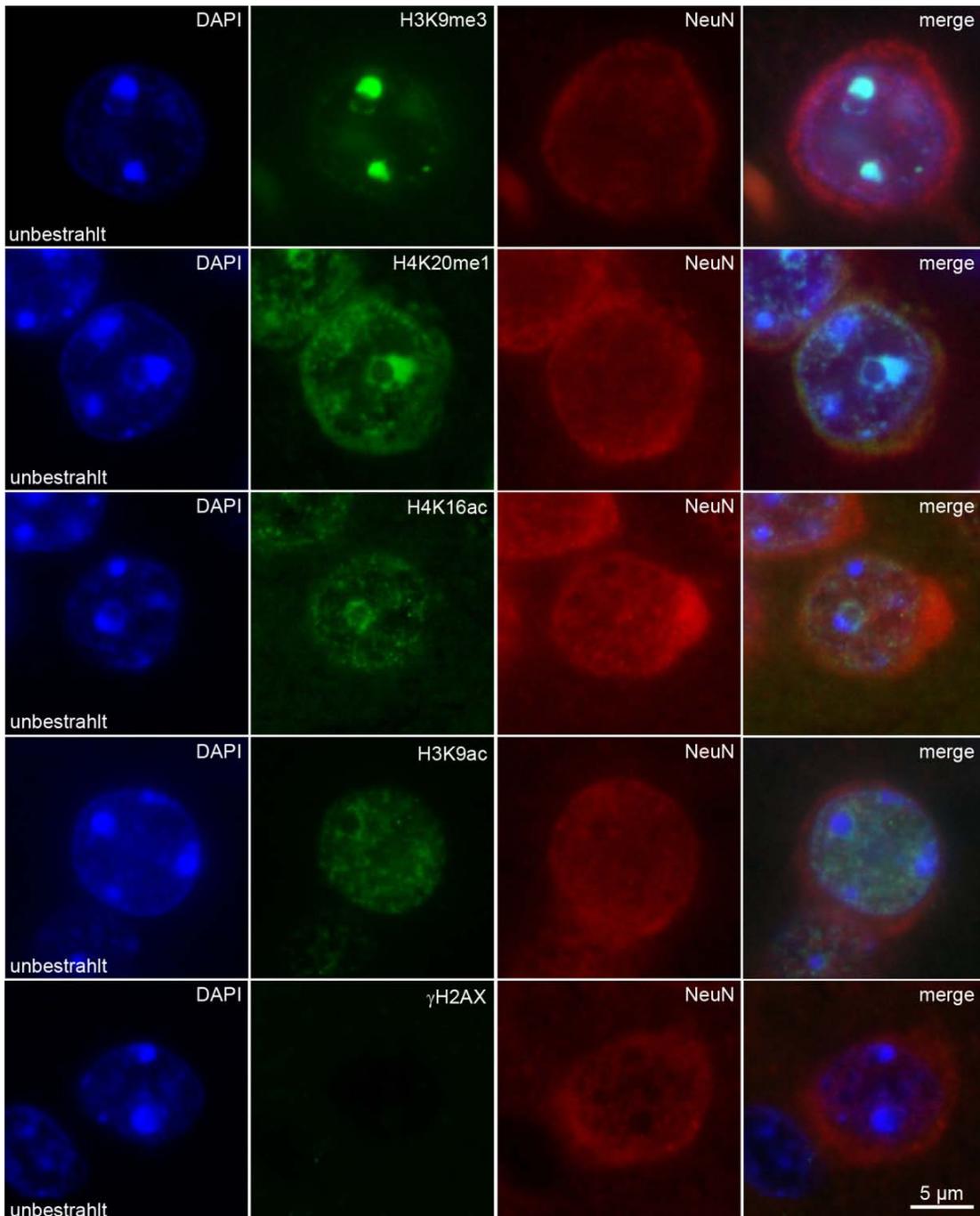


Abbildung 4.2 Chromatinstruktur in kortikalen Neuronen unbestrahlter C57BL/6-Mäuse

Immunfluoreszenzmarkierung verschiedener Histonmodifikationen in kortikalen Neuronen. Die angefärbten Modifikationen sind spezifisch für dichtes Chromatin (H3K9me3, H4K20me1) bzw. offenes Chromatin (H4K16ac, H3K9ac). DNA-reiche, stark heterochromatische Chromozentren sind anhand des intensiven DAPI-Signals zu erkennen.

Da die Dichte der Chromatinpackung vor allem durch spezifische Histonmodifikationen bedingt wird, lässt sich die Kompaktierung der DNA durch das spezifische Anfärben bestimmter Histonmodifikationen auch immunologisch gut charakterisieren. Durch Markieren von Histonmodifikationen, die spezifischer für EC oder für HC sind, wurde die Verteilung der beiden Chromatintypen im neuronalen Zellkern dargestellt. Für die Charakterisierung wurden vier Histonmodifikationen ausgewählt, die in unterschiedlichen Chromatinstrukturen zu finden sind. Als Marker für stark kondensiertes, inaktives HC (konstitutives HC) wurde das dreifach am Histon H3 methylierte Lysin 9 (H3K9me3) angefärbt. Als Marker für offenes, transkriptionell aktives EC wurde gegen die Acetylierung an dieser Position (H3K9ac) gefärbt. Außerdem wurde die Monomethylierung von Histon H4 an Lysin 20 (H4K20me1) markiert, die in weniger dichtem, fakultativem HC auftritt und das an Lysin 16 acetylierte Histon H4 (H4K16ac), welches wie andere Acetylierungen eine offene Chromatinstruktur vermittelt. Von H4K16ac ist auch bekannt, dass es in enger Verbindung mit der Reparatur von DSBs steht und dass sich die Menge während einer DNA-Schadensantwort ändert (Rea *et al.*, 2007). Wie vermutet, zeigten die Neurone einen hohen Gehalt der euchromatischen Histonmodifikation H3K9ac, welche sich unter Aussparung des konstitutiven HC über den gesamten Zellkern verteilte (Abbildung 4.2). Der euchromatische Marker H4K16ac ist dagegen weniger verteilt. Er konzentriert sich vermehrt im Bereich der Kernlamina und besonders im Bereich um die Nukleoli (Abbildung 4.2). Auch H4K20me1 war vor allem an der Kernlamina und um die Nukleoli lokalisiert sowie in und um die intensiv DAPI-positiven DNA-Bereiche und die Chromozentren (Abbildung 4.2). H3K9me3 war dagegen ausschließlich in dichten, stark DAPI-positiven DNA-Bereichen und Chromozentren zu finden (Abbildung 4.2). Für die DSB-abhängige Histonmodifikation γ H2AX waren die C57BL/6-Neurone ohne Bestrahlung wie erwartet negativ (Abbildung 4.2). Die Neurone von unbestrahlten ATM-defizienten und DNA-PKcs-defizienten (SCID) Mäusen stellten sich für die Marker H3K9me3, H4K20me2, H4K16ac und H3K9ac analog dar. Für γ H2AX wurden einzelne Zellen mit γ H2AX-Foci beobachtet (nicht dargestellt).

Durch die höhere Auflösung der Elektronenmikroskopie bietet sie die Möglichkeit, die Chromatinstrukturen wesentlich detaillierter darzustellen, wodurch sich die Chromatinstruktur der kortikalen Neurone noch besser untersuchen lässt. Nach der Kontrastierung der negativ geladenen DNA mit Uranylacetat stellten sich Bereiche mit unterschiedlicher DNA-Dichte im TEM unterschiedlich hell dar. Durch eine hohe Elektronendichte in heterochromatischen Bereichen zeigten sich diese dunkelgrau bis schwarz, während das EC durch seine geringe Elektronendichte schwach hellgrau bis weiß war. Das hoch kondensierte konstitutive HC, wie es die Chromozentren enthalten, war im TEM nahezu schwarz (Abbildung 4.3). Auch die an die Chromozentren angrenzenden Nukleoli stellten sich im TEM – durch ihre hohe Elektronendichte – tief schwarz dar (Abbildung 4.3 (B)), während sie wegen ihres geringen

4. Ergebnisse

DNA-Gehalts durch das DNA-Interkalanz DAPI in der Immunfluoreszenz nicht markiert werden (Abbildung 4.2). Trotz großer Elektronendichte enthalten sie nur wenig DNA und stellen kein konstitutives HC dar (positiv geladenes Uranylacetat lagert sich an alle Ribonukleinsäuren an und daher außer an DNA auch die einzelsträngige RNA). Unterscheiden ließen sich Chromozentren und Nukleoli nach Immunogoldmarkierung der heterochromatischen Histonmodifikation H3K9me3 (Abbildung 4.3 (A)). Während die heterochromatischen Chromozentren stark positiv für H3K9me3 waren, zeigten die Nukleoli so gut wie keine Markierung (Abbildung 4.3 (B)).

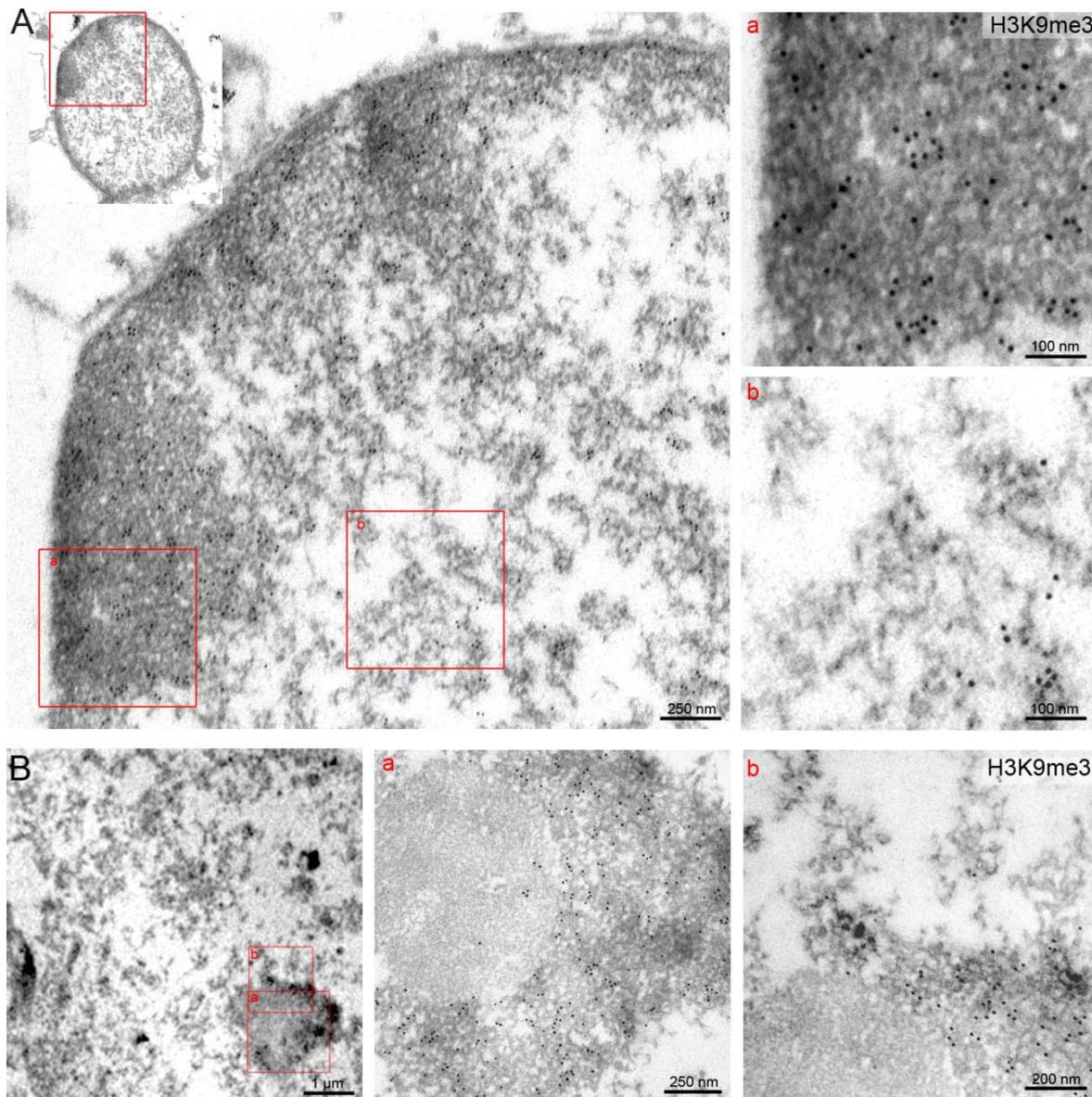


Abbildung 4.3 Neuronale Chromatinstruktur im TEM

Die Chromatinstruktur eines neuronalen Zellkerns im TEM mit Immunogoldmarkierung der heterochromatischen Histonmodifikation H3K9me3. (A) Die unterschiedlich dichte Packung des Chromatins in verschiedenen Bereichen eines neuronalen Zellkerns ist in den Ausschnitten (a) und (b) vergrößert dargestellt. Durch die immunologische Detektion der heterochromatischen Histonmodifikation H3K9me3 wird die dichte Chromatinpackung in den großen dunklen heterochromatischen Regionen (dunkelgrau) deutlich (a), während in den weniger dichten Regionen (hellgrau bis weiß) mit vielen offenen euchromatischen Bereichen nur wenig heterochromatisches H3K9me3 lokalisiert ist. (B) Die Markierung von H3K9me3 zeigt auch, dass die dunkelgrauen Nukleoli, genau wie die euchromatischen Regionen, negativ für H3K9me3 sind, während das umgebende Heterochromatin stark positiv für H3K9me3 ist ((a) und (b)).

Ansonsten wiesen die Neurone im TEM – im Einklang mit der Immunfluoreszenz – eine relativ offene Chromatinstruktur auf. Außer den hoch kondensierten Chromozentren und dem an der Kernlamina assoziierten HC zeigten sie wenig hoch kompaktes HC. Das über den neuronalen Zellkern verteilte Chromatin stellte sich deutlich weniger kompakt dar. Neben vielen euchromatischen Bereichen (hellgrau) enthielten die Neurone auch weniger dicht gepackte, fakultative Heterochromatinfilamente (grau), die sich über den gesamten Zellkern verteilten und die euchromatischen Bereiche gegeneinander abgrenzten. Die euchromatischen Bereiche (hellgrau bis weiß) waren negativ für H3K9me3 (Abbildung 4.3).

4.2 53BP1 zur Quantifizierung von DNA-Schäden in den kortikalen Neuronen unbestrahlter Kontrollen und nach Bestrahlung mit 2 Gy

Die Funktionsfähigkeit der DSB-Reparatur einer Zelle ist von zahlreichen Faktoren abhängig, zu denen auch das Alter und die Aktivität der Reparaturproteine eines Individuums zählen. Um die Reparaturkapazität in den kortikalen Neuronen charakterisieren zu können, ist es notwendig vorhandene Schäden zu identifizieren. Die Quantifizierung von γ H2AX- oder 53BP1-Foci ist hierfür eine vielfach angewendete Methode zur Untersuchung von strahleninduzierten DSBs nach Exposition mit biologisch relevanten Dosen (Grudzenski *et al.*, 2010; Rothkamm und Löbrich, 2003; Rube *et al.*, 2008). Die am DSB akkumulierenden focibildenden Proteine stellen sich nach der immunologischen Markierung in der Fluoreszenz als diskrete Punkte im Zellkern dar.

4.2.1 53BP1 als Marker für DNA-Schäden in kortikalen Neuronen

Zur Darstellung neuronaler DSBs wurde 53BP1 als Marker für die Quantifizierung von DSBs in kortikalen Neuronen etabliert. Wie γ H2AX akkumuliert auch 53BP1 in großer Zahl an DSBs und lässt sich in der IFM als Focus darstellen. Neben γ H2AX ist auch 53BP1 ein häufig verwendeter Marker für die Quantifizierung von DSBs in der IFM.

Zur Charakterisierung der DSB-Reparatur in den kortikalen Neuronen der Maus wurde die Markierung von DSBs mit 53BP1 in Paraffinschnitten von bestrahlten und unbestrahlten Mausgehirnen adulter C57BL/6-Wildtypmäuse (3 Monate) etabliert. Hierbei zeigte sich, dass die NeuN positiven, ausdifferenzierten kortikalen Neurone unabhängig von strahleninduzierten DSBs große Mengen des Markerproteins 53BP1 exprimieren, während die NeuN negativen Gliazellen kein sichtbares Signal für 53BP1 zeigen (Abbildung 4.4 (A)). Obwohl die unbestrahlten Kontrollen der reparaturprofizienten C57BL/6-Wildtypmäuse einen hohen Gehalt an pan-nukleärem 53BP1 aufweisen, waren 53BP1-Foci nur sehr sporadisch in 2.85% \pm 0.22% der NeuN positiven Zellen zu sehen. Die 53BP1-Foci traten als dichte Punkte mit einem intensiven Fluoreszenzsignal aus dem endogenen Proteingehalt hervor (Abbildung 4.4 (B)).

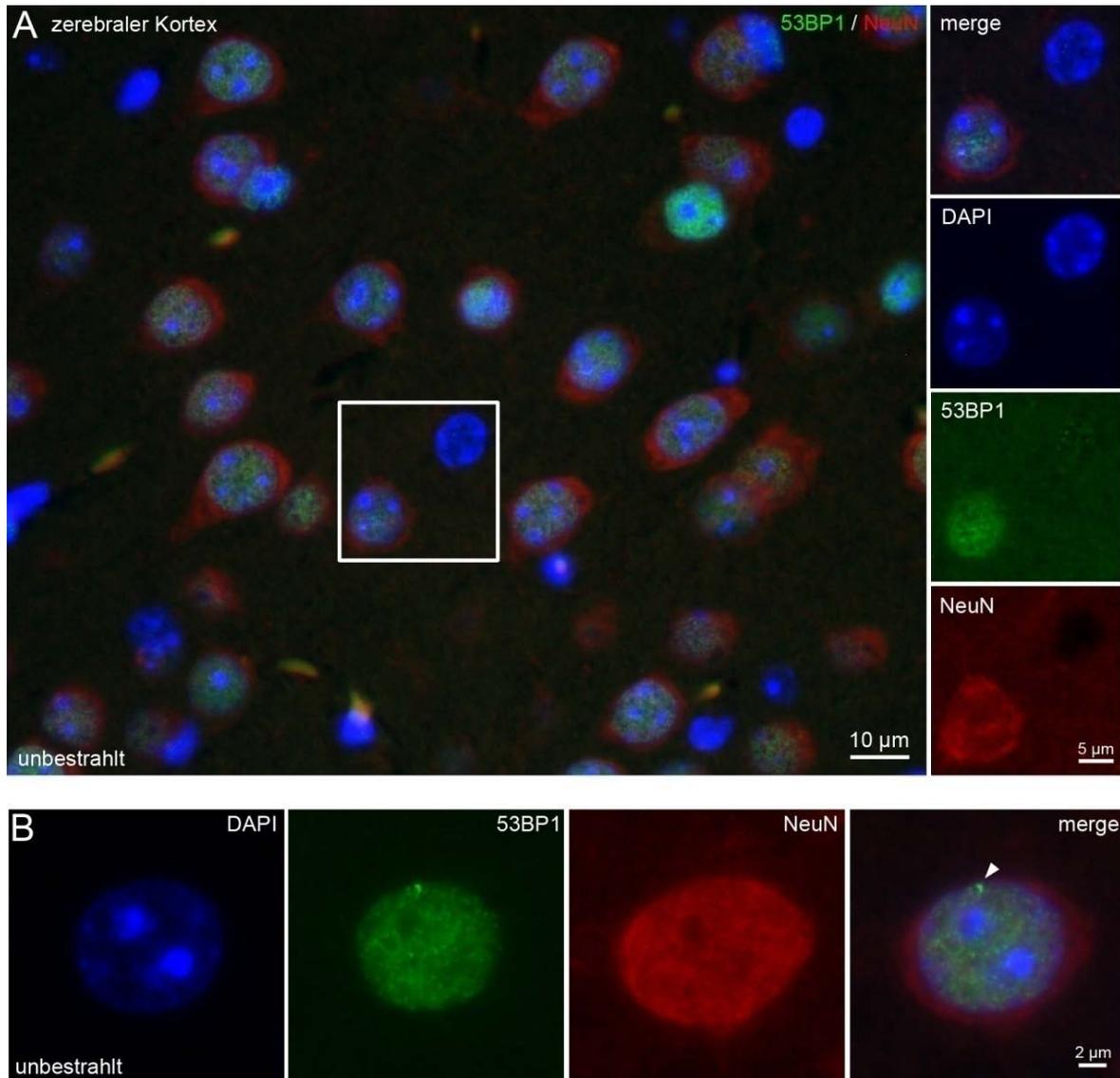


Abbildung 4.4 53BP1 in kortikalen Neuronen unbestrahlter C57BL/6-Mäuse

(A) Übersichtsaufnahme des für 53BP1 (grün) und NeuN (rot) gefärbten zerebralen Kortex einer unbestrahlten, reparaturprofizienten C57BL/6-Maus sowie Aufspaltung der einzelnen Fluoreszenzkanäle für den markierten Bildausschnitt. Deutlich zu erkennen ist, dass die NeuN-positiven Neurone – im Gegensatz zu Gliazellen – über einen hohen Grundgehalt des Reparaturproteins 53BP1 verfügen. (B) Ein repräsentativer 53BP1-Focus (weißer Pfeil) in einem kortikalen Neuron einer unbestrahlten C57BL/6-Maus.

Es lässt sich also feststellen, dass 53BP1 als Marker für die Darstellung von DSBs in kortikalen Neuronen geeignet ist und der Hintergrund an bestrahlungsunabhängigen 53BP1-Foci in unbestrahlten kortikalen Neuronen sehr gering ist.

4.2.2 53BP1 in kortikalen Neuronen unbestrahlter und bestrahlter Mäuse verschiedenen Alters und/oder unterschiedlichen Genotyps

Die DSB-Reparaturkapazität ist in vielen Zellen vom Alter und der Funktionsfähigkeit der Reparaturproteine eines Individuums abhängig. Um altersabhängige und genotypabhängige Unterschiede der DSB-Reparaturkapazität in Neuronen zu identifizieren, wurden nach der Etablierung des DSB-Markers 53BP1 in der Doppelfärbung mit NeuN in 3 Monate alten C57BL/6-Wildtypneuronen auch die unbehandelten Kontrollen anderer Altersgruppen

(0.5 Monate und 24 Monate) und verschiedener Genotypen ($ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$, $ATM^{-/-}$ und SCID) untersucht. Während alle untersuchten Neurone ein ähnliches Maß an 53BP1 exprimierten, zeigten sich bei der Quantifizierung der Foci signifikante Unterschiede (sowohl alters- als auch genotypabhängig). Ohne genetische Prädispositionen (C57BL/6- und $ATM^{+/+}$ -Wildtypmäuse) wiesen junge Mäuse (0.5 Monate bzw. 3 Monate) ohne Bestrahlung nur eine sehr geringe Zahl an 53BP1-Foci auf (0.030 bis 0.032 ± 0.002 bis 0.006 Foci/Zelle). Auch die genetisch leicht beeinträchtigten heterozygoten $ATM^{+/-}$ -Mäuse zeigten bestrahlungsunabhängig kein höheres Hintergrundniveau (0.036 ± 0.006 Foci/Zelle). In den unbestrahlten, 24 Monate alten C57BL/6-Mäusen war die Zahl der 53BP1-Foci dagegen mit mehr als doppelt so vielen Foci (0.069 ± 0.006 Foci/Zelle) signifikant höher als in den 3 Monate alten Tieren (Abbildung 4.5 (B)). Die jung-adulten $ATM^{-/-}$ - und SCID-Mäuse (3 Monate) stachen bereits vor der Quantifizierung durch eine höhere Zahl und größere 53BP1-Foci deutlich unter den untersuchten Proben heraus (Abbildung 4.5 (A)). Sie trugen ohne Bestrahlung signifikant mehr 53BP1-Foci als alle anderen untersuchten Genotypen ($ATM^{-/-}$: 0.139 ± 0.015 Foci/Zelle; SCID: 0.328 ± 0.013 Foci/Zelle; Abbildung 4.5 (B)). Rund 1/4 ($26.4 \pm 0.9\%$) der kortikalen SCID-Neurone und 1/10 ($10.2\% \pm 1.0\%$) der $ATM^{-/-}$ -Neurone wiesen somit bereits unabhängig von Bestrahlung einen DNA-Schaden auf. Mit zunehmendem Alter akkumulierten die Schäden in den reparaturdefizienten SCID-Neuronen weiter signifikant. Bereits mit 12 Monaten trugen $40.0\% \pm 2.7\%$ (0.517 ± 0.025 Foci/Zelle) der kortikalen SCID-Neurone einen durch endogene Noxen verursachten 53BP1-markierten DNA-Schaden (Abbildung 4.5 (B)). In $ATM^{-/-}$ -Mäusen wurde die altersabhängige Akkumulation von DNA-Schäden nicht untersucht, da sie nicht länger als 6 Monate überleben. Endogene Substanzen, wie z.B. ROS, verursachten also in den reparaturdefizienten $ATM^{-/-}$ und SCID-Neuronen bereits strahlungsunabhängig ein signifikant höheres Schadensniveau im Vergleich zu den reparaturprofizienten Neuronen.

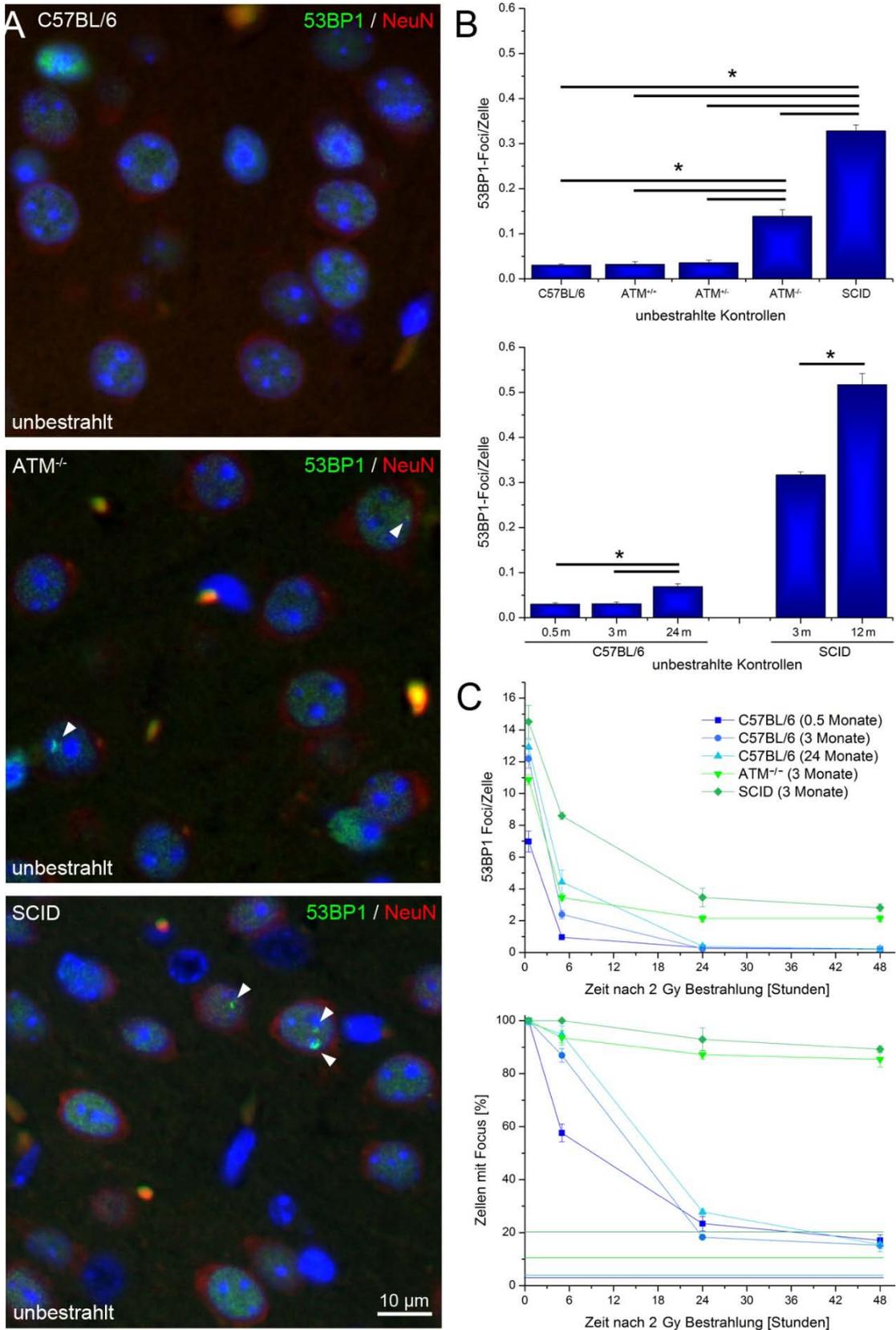


Abbildung 4.5 53BP1-Foci vor und nach Bestrahlung in Mäusen mit unterschiedlichem Alter und/oder Genotyp
 (A) Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen des zerebralen Kortex unbestrahlter reparaturprofizienter C57BL/6-Mäuse sowie reparaturdefizienter ATM^{-/-}- und SCID-Mäuse nach Markieren von 53BP1 (grün) und NeuN (rot). Die 53BP1-Foci sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. (B) Quantitative Auswertung der 53BP1-Foci in unbestrahlten Kontrollen verschiedener Genotypen (3 Monate, oben) oder unterschiedlichen Alters (C57BL/6 bzw. SCID, unten). (C) Quantitative Auswertung der 53BP1-Foci pro Zelle (oben) bzw. Zellen mit Focus (unten) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 2 Gy. Die waagerechten Linien markieren das Niveau der jeweils unbestrahlten Kontrolle. *: Signifikanz im Bezug zur jüngeren Gruppe ($p \leq 0.05$). Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler von drei bis neun unabhängigen Analysen dar.

Im Alter kommt es in den kortikalen Neuronen also offenbar zu einer leichten Verschlechterung der DSB-Reparatur oder zu einer schwachen Akkumulation von Schäden, die im Laufe des Lebens induziert wurden. Das vollständige Fehlen bestimmter Reparaturproteine wirkt sich allerdings deutlich stärker auf die Akkumulation von DNA-Schäden als das Mausalter aus, wobei das Ausmaß vom jeweils fehlenden Reparaturprotein abhängt.

Um zu klären, ob die Akkumulation von 53BP1-Foci auf eine verschlechterte DNA-Reparaturkapazität zurückzuführen ist, wurden altersabhängige und genotypabhängige Unterschiede in der Reparatur strahleninduzierter DSB untersucht. Neben 3 Monate alten C57BL/6-Wildtypmäusen wurden 0.5 und 24 Monate alte C57BL/6-Mäuse sowie 3 Monate alte $ATM^{-/-}$ - und SCID-Mäuse mit einer strahlentherapeutisch relevanten Dosis von 2 Gy bestrahlt. Die 53BP1-Foci wurden dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung (0.5 h, 5 h, 24 h und 48 h) quantifiziert. Innerhalb der ersten 24 h nach der Bestrahlung war in allen untersuchten Gruppen die Reparatur weitgehend abgeschlossen (Abbildung 4.5 (C)). Innerhalb der folgenden 24 h nahmen die 53BP1-Foci nur in den 24 Monate alten C57BL/6-Neuronen weiter signifikant ab. Auch die $ATM^{-/-}$ - und SCID-Neurone konnten trotz ihres Reparaturdefekts während der ersten 24 h einen großen Teil (ca. 80% der nach 30 min durch 53BP1-Foci markierten Schäden) der induzierten Brüche reparieren. Dennoch trugen etwa 90% ($ATM^{-/-}$: $87.2\% \pm 1.7\%$; SCID: $93.0\% \pm 0.4\%$) der Neurone mindestens einen 53BP1-Focus (Abbildung 4.5 (C)). Mit jeweils 15-18% an verbleibenden 53BP1-Foci bis zwei Tage (48 h) nach der Bestrahlung zeigte sich in den C57BL/6-Neuronen keine altersabhängige Verschlechterung in der Effizienz der DSB-Reparatur (0.5 Monate: 0.211 ± 0.033 Foci/Zelle; 3 Monate: 0.265 ± 0.011 Foci/Zelle; 24 Monate: 0.222 ± 0.052 Foci/Zelle). Allerdings variierten die 53BP1-Kinetiken zu früheren Reparaturzeitpunkten (< 24 h) zwischen den drei Altersgruppen signifikant. In den 24 Monate alten Tieren nahmen die 53BP1-Foci sehr viel langsamer ab als in den jüngeren Gruppen. Besonders schnell wurden die 53BP1-Foci in den jungen Mäusen (0.5 Monate) abgebaut. Bereits 30 min nach der DSB-Induktion war die Zahl der detektierten 53BP1-Foci nur etwa halb so groß wie in den beiden anderen Altersgruppen (0.5 Monate: 7.00 ± 0.66 Foci/Zelle, 3 Monate: 12.20 ± 0.61 Foci/Zelle; 24 Monate: 12.92 ± 0.47 Foci/Zelle), obwohl durch die applizierte Dosis von 2 Gy physikalisch überall ähnlich viele DSBs induziert wurden. 5 h nach der Induktion der DSBs waren schon über 40% der Neurone frei von 53BP1-Foci, während noch über 85% der Neurone älterer Mäuse Foci trugen (Abbildung 4.5 (C)).

In Summe zeigen diese Ergebnisse, dass keine altersabhängigen Unterschiede in der Reparatureffizienz strahleninduzierter DSBs zu beobachten sind, obwohl kortikale Neurone altersabhängige Unterschiede in der Reparaturkinetik aufweisen. Das Fehlen bestimmter

Reparaturproteine dagegen verursacht deutliche Störungen bei der Beseitigung der induzierten DSBs.

4.3 Reparatur von DNA-Schäden in kortikalen Neuronen nach einmaliger und fraktionierter Bestrahlung mit niedrigen Dosen

Aufgrund neuer Bestrahlungstechniken, wie der IMRT oder der fraktionierten stereotaktischen Bestrahlung, sind neben Schäden durch die in der Strahlentherapie üblichen Tagesdosen von ca. 2 Gy auch die Auswirkungen nach Expositionen mit niedrigen bis sehr niedrigen Strahlendosen von zunehmender Relevanz. Die Auswirkungen solcher niedriger Strahlendosen – besonders nach wiederholter Exposition – wie sie während einer IMRT im umliegenden Normalgewebe vorkommen, sind bisher kaum bekannt. Da im Rahmen einer IMRT große Normalgewebsvolumina mit niedrigen Dosen belastet werden, wurden die Auswirkungen auf Normalgewebe nach einer fraktionierten Bestrahlung mit niedrigen (100 mGy) bis sehr niedrigen (10 mGy) Strahlendosen untersucht.

4.3.1 DNA-Schadensuntersuchung in reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen nach Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen

Jung-adulte reparaturprofiziente C57BL/6-Mäuse wurden mit einer Einzeldosis von 10 mGy bzw. 100 mGy bestrahlt und das Gehirngewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung entnommen. Außerdem erfolgte eine fraktionierte Bestrahlung mit bis zu 50 Fraktionen. Die Untersuchung der verbleibenden 53BP1-Foci erfolgte zu späten Reparaturzeitpunkten (24 h bzw. 72 h) nach der letzten Fraktion. Da die ausdifferenzierten Neurone des zerebralen Kortex keinem Zellaustausch unterliegen, wurde jeder Zelle bis zur letzten Fraktion die gesamte Dosis appliziert.

Sowohl bei der Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 10 mGy, als auch mit 100 mGy war 5 min nach der Bestrahlung bereits ein signifikanter Anstieg der 53BP1-Foci im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (Ktrl) zu verzeichnen (Ktrl: 0.031 ± 0.003 Foci/Zelle; 10 mGy (5 min): 0.134 ± 0.006 Foci/Zelle; 100 mGy (5 min): $0.641 \pm 0,045$ Foci/Zelle), welcher bis 30 min nach der Bestrahlung noch weiter anstieg (10 mGy (30 min): $0.240 \pm 0,001$ Foci/Zelle; 100 mGy (30 min): 0.985 ± 0.029 Foci/Zelle). 24 h nach der Bestrahlung war die Zahl der 53BP1-Foci nach einer Einzeldosis von 10 mGy annähernd wieder auf Kontrollniveau zurückgegangen, während 24 h nach einer Einzeldosis von 100 mGy noch 3.5-fach mehr 53BP1-Foci als in der unbestrahlten Kontrolle zu finden waren (10 mGy (24 h): $0.054 \pm 0,009$ Foci/Zelle; 100 mGy (24 h): 0.110 ± 0.021 Foci/Zelle). Die Zahl der Foci pro Zelle sank nach der Bestrahlung mit 100 mGy bis 72 h nach der Exposition weiter ab (100 mGy (72 h): $0.073 \pm 0,010$ Foci/Zelle), blieb aber signifikant höher als in der unbestrahlten

4. Ergebnisse

Kontrolle (Abbildung 4.6 (A)). Nach der Bestrahlung mit 10 mGy erfolgte keine weitere Abnahme der 53BP1-Focizahl (10 mGy (72 h): 0.061 ± 0.006 Foci/Zelle).

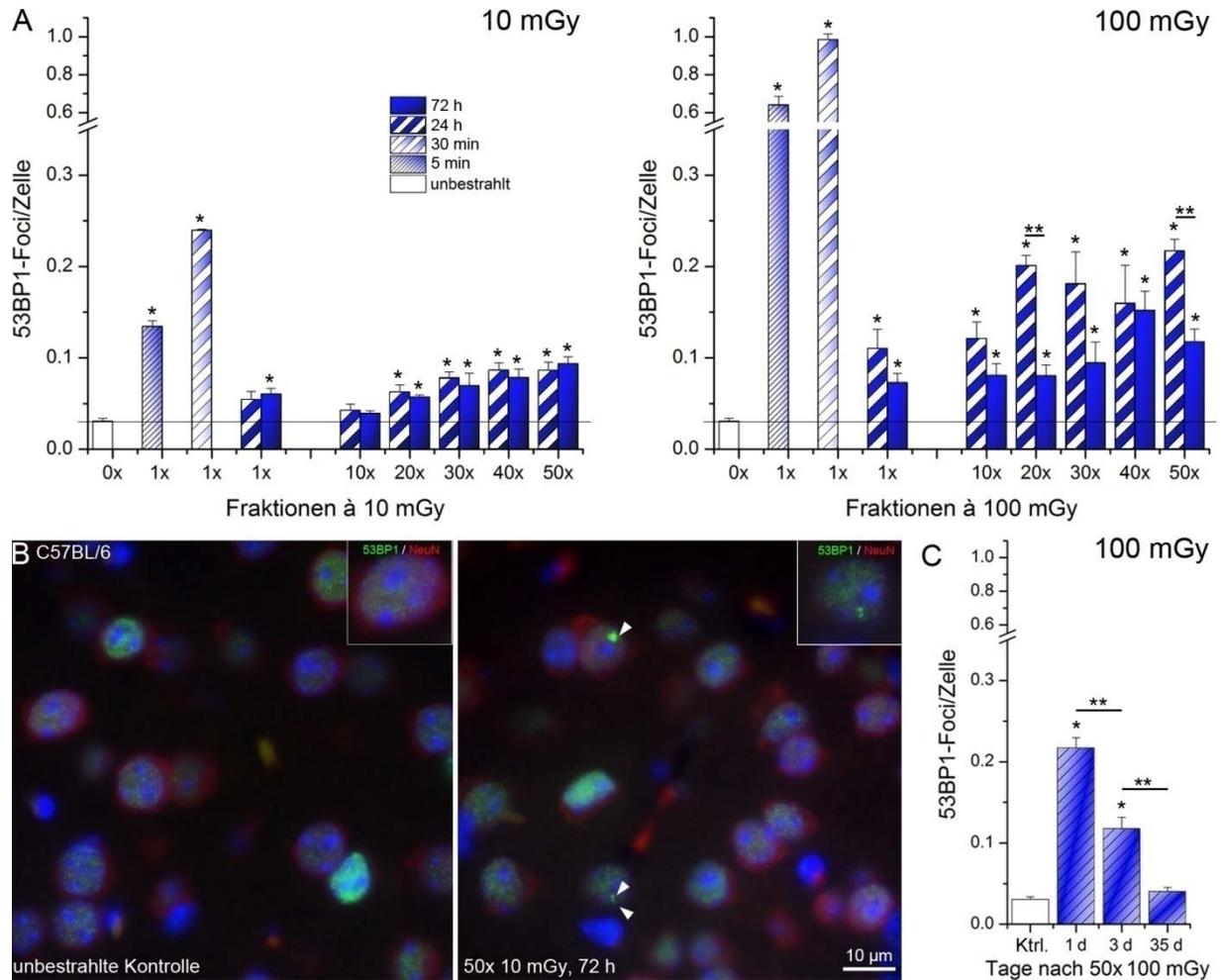


Abbildung 4.6 53BP1-Foci in reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen

Dargestellt sind die im Mittel gefundenen 53BP1-Foci pro Neuron ohne Bestrahlung und nach Bestrahlung mit 10 mGy bzw. 100 mGy. (A) Zahl der 53BP1-Foci pro Zelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einmaliger und wiederholter Bestrahlung mit 10 mGy (links) bzw. 100 mGy (rechts) im Vergleich zu unbestrahlten Neuronen. (B) Repräsentative Aufnahme des zerebralen Kortex einer unbestrahlten C57BL/6-Maus (links) und 72 h nach der letzten von 50 Fraktionen à 10 mGy (rechts). Die 53BP1-Foci sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. (C) Entwicklung der 53BP1-Focizahlen nach 50x 100 mGy einen, drei und 35 Tage nach der letzten Bestrahlung. *: Signifikant im Bezug zur unbestrahlten Gruppe, **: Signifikant im Bezug zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt ($p \leq 0.05$). Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler von drei Experimenten dar.

Nach fraktionierter Bestrahlung kam es sowohl nach Exposition mit 10 mGy- als auch mit 100 mGy-Fraktionen mit ansteigender kumulativer Dosis zu einer kontinuierlichen Zunahme der 53BP1-Focizahlen (Abbildung 4.6 (A)). Analog zur einmaligen Exposition änderte sich das 53BP1-Fociniveau von 24 h auf 72 h auch nach wiederholter Applikation von Fraktionen à 10 mGy nicht mehr, während es nach Fraktionen à 100 mGy 24 h nach der letzten Fraktion durchgehend höher war als nach 72 h (Abbildung 4.6 (A)). Nach 20 und 50 Fraktionen änderte sich die Zahl der 53BP1-Foci noch signifikant (20x 100 mGy (24 h): 0.201 ± 0.011 Foci/Zelle; 20x 100 mGy (72 h): 0.081 ± 0.012 Foci/Zelle, 50x 100 mGy (24 h): 0.217 ± 0.013 Foci/Zelle; 50x 100 mGy (72 h): 0.118 ± 0.014 Foci/Zelle).

Da nach der Bestrahlung mit 100 mGy (> 24 h) eine weitere Abnahme der 53BP1-Foci zu beobachten war, stellte sich die Frage, ob die Zahl der 53BP1-Foci pro Zelle bei längeren Reparaturzeiten wieder bis auf das Niveau der unbestrahlten Kontrolle zurückgeht, oder auch langfristig signifikant erhöht bleibt. Deshalb wurde eine Gruppe von C57BL/6-Mäusen mit 50x 100 mGy bestrahlt und erst fünf Wochen (35 d) nach der letzten Fraktion das Gehirn entnommen und untersucht. Nach fünf Wochen Regenerationszeit befand sich das Niveau der verbleibenden 53BP1-Foci wieder im Bereich der unbestrahlten C57BL/6-Neurone (Ktrl: 0.031 ± 0.002 Foci/Zelle, 50x 100 mGy (35 d): 0.040 ± 0.005 Foci/Zelle). Damit erfolgte auch mehr als drei Tagen nach der letzten Exposition ein weiterer Abbau der induzierten 53BP1-Foci (Abbildung 4.6 (C)).

Da induzierte DSBs auch zu Apoptose oder inflammatorischen Reaktionen in verschiedenen Geweben führen können, wurden die mit 50 Fraktionen bestrahlten Proben (10 mGy und 100 mGy) auch auf Apoptosemarker (*cleaved-Caspase3*, *cleaved-PARP1*) und Zytokin-expression (TGF- β 1) geprüft. In keiner Probe wurden positive Zellen für einen der drei Marker gefunden.

4.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Reparatur nach Niedrigdosisbestrahlung

Um die Bedeutung der verbleibenden 53BP1 Foci näher zu charakterisieren und zu prüfen, ob es sich tatsächlich um unreparierte DSBs handelt, wurde für ausgewählte Zeitpunkte nach der Bestrahlung mit 100 mGy (1x 100 mGy, 30 min; 50x 100 mGy, 72 h) die Reparatur mittels Elektronenmikroskopie weiter untersucht. Hierzu wurde 53BP1 immunologisch mit demselben Antikörper markiert, der auch in der IFM verwendet wurde. Die Markierung erfolgte in Kombination mit einem Antikörper, der an Serin 5 (Mensch) bzw. Serin 6 (Maus) phosphoryliertes Ku70 (pKu70; ein Kernprotein des NHEJ) detektiert. Durch den Einsatz unterschiedlich großer Goldpartikel (Beads) bei der Färbung konnten die Proteine voneinander differenziert werden.

Zu frühen Zeitpunkten (30 min) nach einmaliger Bestrahlung fanden sich in heterochromatischen Bereichen Cluster aus 3-5 Goldpartikeln (6 nm), die 53BP1 markierten, welche mit zwei pKu70 markierenden Goldpartikeln (10 nm) kolokalisierten (Abbildung 4.7). Zu späteren Zeitpunkten (72 h) nach fraktionierter Bestrahlung mit 50x 100 mGy wurden nur 53BP1-Cluster ohne pKu70 gefunden (Abbildung 4.7). Die 53BP1-Cluster waren wesentlich größer als zu früheren Zeitpunkten (≥ 10 Beads) und befanden sich ausschließlich in dichten heterochromatischen Bereichen (dunkelgrau). Außerdem wurden in beiden Proben einzelne 6 nm-Goldbeads beobachtet, die sich über den gesamten Zellkern verteilten, sowohl in euchromatischen als auch in heterochromatischen Bereichen. In früheren TEM-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde 53BP1 im TEM bereits eingehend untersucht

4. Ergebnisse

und analoge Beobachtungen beschrieben (Rübe *et al.*, 2011). Es wird davon ausgegangen, dass die 53BP1-Cluster, die aus der Fluoreszenz bekannten Reparaturfoci repräsentieren, während die 53BP1-Einzelbeads vermutlich ungebundenes zelluläres Protein darstellen, welches nicht an DSBs lokalisiert ist. Eine hohe Expression von 53BP1 wurde bereits in der Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 4.4).

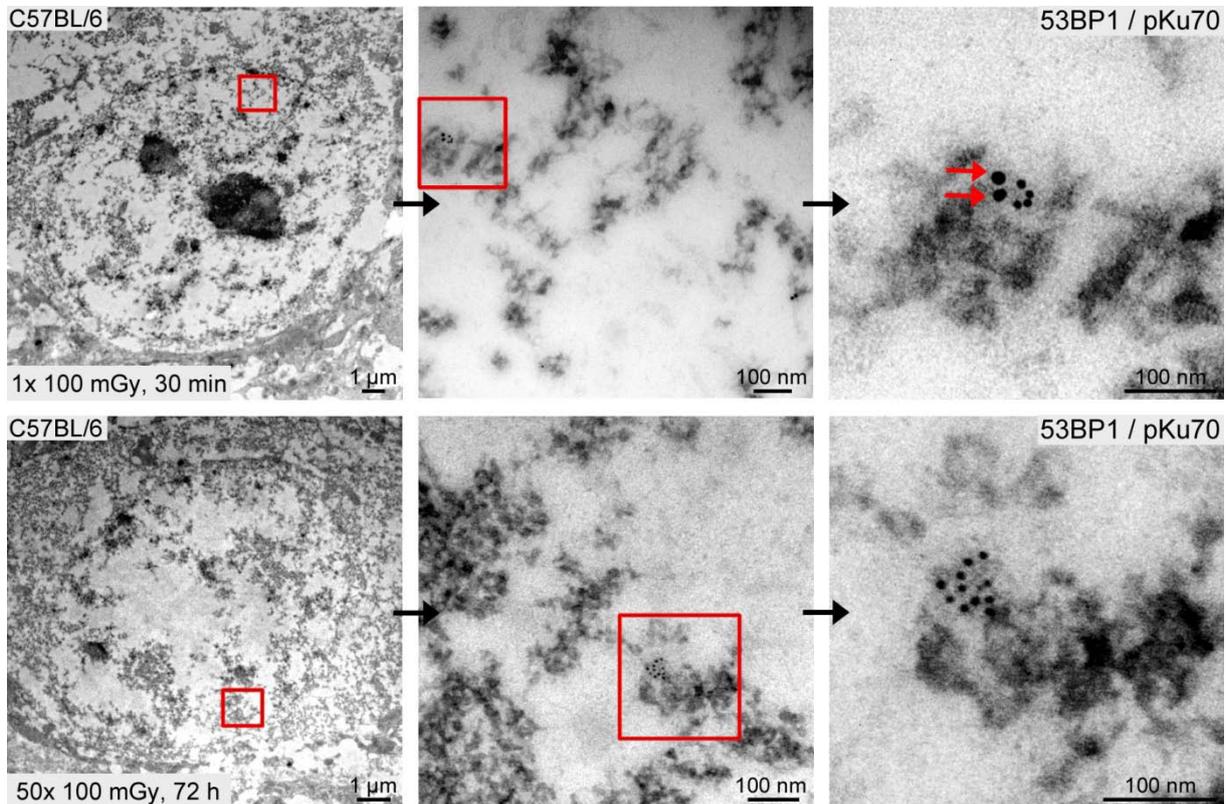


Abbildung 4.7 TEM-Untersuchung nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen

Repräsentative Aufnahmen eines kortikalen Neurons 30 min nach einmaliger Exposition mit 100 mGy (oben) bzw. 72 h nach wiederholter Exposition (50x 100 mGy, unten). Die eingerahmte Region ist im darauf folgenden Bild jeweils vergrößert dargestellt. In den Präparaten wurden der focibildende Reparaturfaktor 53BP1 (6 nm) und die phosphorylierte Kernkomponente des NHEJ Ku70 (pKU70, 10 nm) immunologisch markiert. Das in der Maus an Serin 6 phosphorylierte pKU70 (rote Pfeile) kolokalisiert zu frühen Zeitpunkten mit Clustern aus 53BP1 (3-5 Beads) in heterochromatischen Randgebieten (oben). 72 h nach der letzten Bestrahlung finden sich im HC größere 53BP1-Cluster (> 10 Beads) ohne pKU70 (unten).

4.3.3 DNA-Schadensuntersuchung in reparaturdefizienten ATM- und SCID-Mäusen nach Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen

Um die Auswirkungen nach wiederholter Exposition mit niedrigen bis sehr niedrigen Strahlendosen bei genetisch veranlagter Strahlenempfindlichkeit zu beurteilen, wurden in Folgeexperimenten Mäuse mit einem Reparaturdefekt bestrahlt. Neben den homozygoten SCID-Mäusen, die eine Mutation im *Prkdc*-Gen tragen und den homozygoten *ATM*^{-/-}-Mäusen, wurden in diesen Experimenten auch diejenigen *ATM*-Mäuse untersucht, welche heterozygot für das mutierte *ATM*-Allel (*ATM*^{+/-}) waren. Da die Prädisposition einer heterozygoten *ATM*-Mutation beim Menschen ungefähr 1% beträgt (Swift *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 2005), ist dieser Genotyp für die Klinik besonders relevant. Um auch kleinere, aber dennoch statistisch signifikante Effekte im Vergleich zu Mäusen mit zwei

4. Ergebnisse

intakten ATM-Allelen detektieren zu können, wurden als Vergleichsgruppe reparaturprofiziente ATM-Wildtypmäuse ($ATM^{+/+}$) mit analysiert. Da die $ATM^{+/-}$ -Mäuse bis auf die beiden intakten ATM-Allele über denselben genetischen Hintergrund wie die $ATM^{+/-}$ - und $ATM^{-/-}$ -Mäuse verfügen, können so andere ATM-unabhängige genetische Einflüsse ausgeschlossen werden. Die Tiere wurden analog zu den C57BL/6-Mäusen an fünf aufeinander folgenden Tagen mit einem 24-stündigen Fraktionenabstand mit 10 mGy bzw. 100 mGy bestrahlt. Die reparaturdefizienten $ATM^{-/-}$ - und SCID-Mäuse wurden auf Grund ihrer Prädisposition nur mit bis zu maximal 20 Fraktionen bestrahlt. $ATM^{+/-}$ - und $ATM^{-/-}$ -Mäuse wurden mit bis zu 40 Fraktionen bestrahlt. Die Entnahme des Gehirngewebes erfolgte 24 h bzw. 72 h nach der letzten Fraktion. Neben Mäusen, die wiederholt mit 10 mGy bzw. 100 mGy exponiert wurden, wurden für alle vier Genotypen auch Proben nach einmaliger Bestrahlung (30 min, 24 h und 72 h) akquiriert.

30 min nach einmaliger Bestrahlung mit 10 mGy war die Zahl der 53BP1-Foci in den $ATM^{+/+}$ - und den $ATM^{+/-}$ -Neuronen signifikant höher als die unbestrahlte Kontrolle des entsprechenden Genotyps ($ATM^{+/+}$: Ktrl: 0.032 ± 0.006 Foci/Zelle; 10 mGy (30 min): $0.148 \pm 0,023$ Foci/Zelle; $ATM^{+/-}$: Ktrl: 0.036 ± 0.006 Foci/Zelle; 10 mGy (30 min): 0.119 ± 0.007 Foci/Zelle). In den $ATM^{-/-}$ - und den SCID-Neuronen wurde keine signifikante Erhöhung der 53BP1-Foci im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle beobachtet ($ATM^{-/-}$: Ktrl: 0.126 ± 0.013 Foci/Zelle; 10 mGy (30 min): 0.129 ± 0.015 Foci/Zelle; SCID: Ktrl: 0.334 ± 0.020 Foci/Zelle; 10 mGy (30 min): 0.300 ± 0.018 Foci/Zelle). Innerhalb von 24 h nach der Bestrahlung waren die induzierten 53BP1-Foci in den $ATM^{+/+}$ - und den $ATM^{+/-}$ -Neuronen wieder annähernd auf das Niveau der unbestrahlten Tiere abgesunken ($ATM^{+/+}$: 10 mGy (24 h): 0.049 ± 0.012 Foci/Zelle; $ATM^{+/-}$: 10 mGy (24 h): 0.032 ± 0.002 Foci/Zelle; Abbildung 4.8).

Nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 mGy konnten die ATM-Wildtypneurone alle induzierten 53BP1-Foci innerhalb von 24 h reparieren (Abbildung 4.8 (A)). Auch nach 40 Fraktionen kam es zu keiner signifikanten Erhöhung der 53BP1-Foci im Vergleich zu unbestrahlten Tieren ($ATM^{+/+}$: Ktrl: 0.032 ± 0.006 Foci/Zelle; 40x 10 mGy (24 h): 0.046 ± 0.005 Foci/Zelle). Im Gegensatz zu den Wildtyptieren verlief die Reparatur in den $ATM^{+/-}$ -Neuronen anscheinend weniger effektiv. In diesem Fall zeigte sich eine Tendenz zur Akkumulation der 53BP1-Foci. 24 h nach 20 und 40 Fraktionen waren die 53BP1-Foci zur unbestrahlten Kontrolle statistisch signifikant erhöht ($ATM^{+/-}$: Ktrl: 0.036 ± 0.006 Foci/Zelle; 20x 10 mGy (24 h): 0.065 ± 0.005 Foci/Zelle; 40x 10 mGy (24 h): 0.094 ± 0.013 Foci/Zelle). Die Prozessierung der Schäden war nach 24 h allerdings noch nicht beendet, da bis 72 h nach der letzten Fraktion die Zahl der induzierten Schäden weiter abnahmen (Abbildung 4.8 (A)). 72 h nach 40x 10 mGy waren die 53BP1-Foci in den $ATM^{+/-}$ -Neuronen im Vergleich zur

unbestrahlten Kontrolle zwar noch leicht erhöht, unterschieden sich aber statistisch nicht mehr signifikant. In den reparaturdefizienten $ATM^{-/-}$ - und SCID-Neuronen war ebenfalls eine leichte Akkumulation der 53BP1-Foci zu verzeichnen. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle waren die 53BP1-Focizahlen nach 20×10 mGy in den $ATM^{-/-}$ -Neuronen (24 h) und in den SCID-Neuronen (24 h und 72 h) nach der letzten Fraktion signifikant erhöht (ATM^{-/-}: Ktrl: 0.126 ± 0.013 Foci/Zelle; 20×10 mGy (24 h): $0.211 \pm 0,020$ Foci/Zelle; SCID: Ktrl: $0.334 \pm 0,020$ Foci/Zelle; 20×10 mGy (24 h): 0.521 ± 0.066 Foci/Zelle; 20×10 mGy (72 h): 0.402 ± 0.022 Foci/Zelle). Die lediglich 20 applizierten Fraktionen lassen trotz des schweren Reparaturdefekts bei der niedrigen Dosis von 10 mGy allerdings keine klare Aussage über eine kontinuierliche Akkumulation von Schäden zu (Abbildung 4.8 (A)). Um eine eindeutige Tendenz auszumachen, wäre die Applikation weiterer Fraktionen notwendig.

30 min nach der einmaligen Bestrahlung mit 100 mGy zeigten alle vier Genotypen signifikant höhere Fociwerte als die unbestrahlten Neurone (ATM^{+/+}: Ktrl: 0.032 ± 0.006 Foci/Zelle; 100 mGy (30 min): 0.753 ± 0.075 Foci/Zelle; ATM^{+/-}: Ktrl: 0.036 ± 0.006 Foci/Zelle; 100 mGy (30 min): 0.642 ± 0.006 Foci/Zelle; ATM^{-/-}: Ktrl: 0.126 ± 0.013 Foci/Zelle; 100 mGy (30 min): 0.254 ± 0.020 Foci/Zelle; SCID: Ktrl: 0.334 ± 0.020 Foci/Zelle; 100 mGy (30 min): 1.613 ± 0.228 Foci/Zelle). Allerdings variierte die Zahl der durch 53BP1 markierten Brüche in den vier Genotypen signifikant. In den SCID-Neuronen war die Zahl der markierten Schäden mit Abstand am höchsten. Hier fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied zu allen anderen untersuchten Gruppen (auch zu den C57BL/6-Mäusen). Außerdem nahm die Menge an detektierten Schäden von den ATM-Wildtypneuronen über die heterozygoten bis hin zu den ATM-defizienten kontinuierlich und statistisch signifikant ab (Abbildung 4.8 (A)). 24 h nach einmaliger Bestrahlung mit 100 mGy waren in allen vier Fällen die Fociwerte noch signifikant höher als in ihren jeweiligen unbestrahlten Referenzproben (ATM^{+/+}: 100 mGy (24 h): 0.089 ± 0.009 Foci/Zelle; ATM^{+/-}: 100 mGy (24 h): 0.070 ± 0.006 Foci/Zelle; ATM^{-/-}: 100 mGy (24 h): 0.247 ± 0.019 Foci/Zelle; SCID: 100 mGy (24 h): 0.633 ± 0.129 Foci/Zelle). Bis 72 h nach der Bestrahlung reduzierte sich die Zahl der 53BP1-Foci weiter. In den $ATM^{-/-}$ -Neuronen erfolgte als einzigem Genotyp keine Abnahme der Foci pro Zelle von 30 min bis 24 h nach der Bestrahlung. Allerdings waren die Fociwerte bis 72 h nach einmaliger Bestrahlung wieder im Bereich des unbestrahlten Kontrollniveaus (ATM^{-/-}: 100 mGy (72 h): 0.161 ± 0.007 Foci/Zelle). Auch in den $ATM^{+/+}$ - und den $ATM^{+/-}$ -Neuronen waren die Fociwerte innerhalb von 72 h nach einmaliger Bestrahlung mit 100 mGy wieder annähernd bis auf das Niveau der unbestrahlten Kontrolle abgesunken (ATM^{+/+}: 100 mGy (72 h): 0.046 ± 0.004 Foci/Zelle; ATM^{+/-}: 100 mGy (72 h): 0.041 ± 0.004 Foci/Zelle). In den SCID-Neuronen blieb die Menge an Foci dagegen auch nach 72 h im Vergleich zu unbestrahlten Neuronen signifikant erhöht (SCID: 100 mGy (72 h): 0.510 ± 0.022 Foci/Zelle; Abbildung 4.8(A)).

4. Ergebnisse

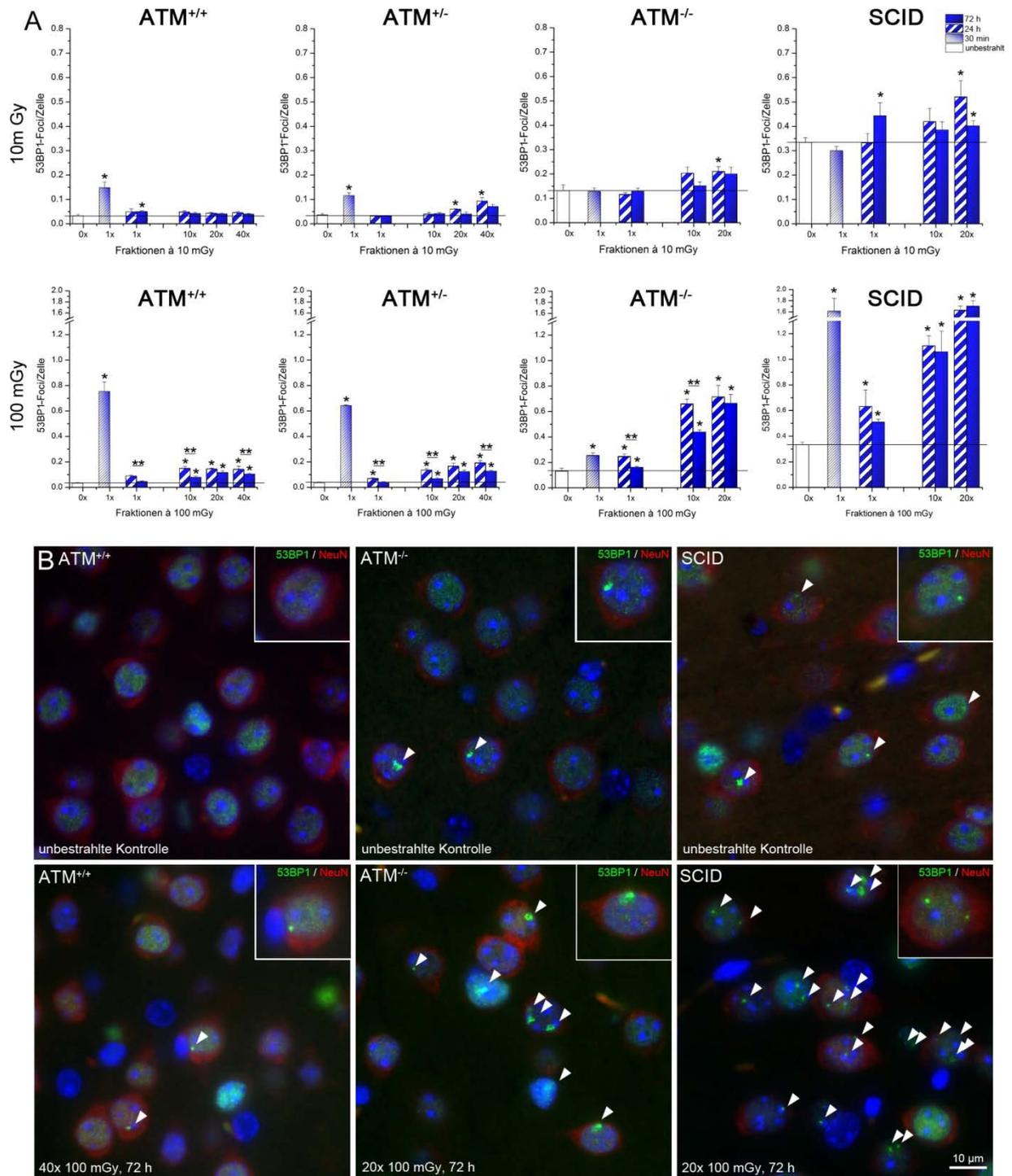


Abbildung 4.8 53BP1-Foci in reparaturdefizienten Mäusen nach fraktionierter Bestrahlung mit niedrigen Dosen
 Dargestellt sind die in den verschiedenen Genotypen im Mittel gefundenen 53BP1-Foci pro Neuron ohne Bestrahlung und nach Bestrahlung mit 10 mGy bzw. 100 mGy. (A) 53BP1-Foci pro Zelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einmaliger und wiederholter Bestrahlung mit 10 mGy (oben) bzw. 100 mGy (unten) in ATM^{+/+}-, ATM^{+/-}-, ATM^{-/-}- und SCID-Neuronen (von links nach rechts) im Vergleich zu unbestrahlten Neuronen. (B) Repräsentative Aufnahme des zerebralen Cortex von unbestrahlten ATM^{+/+}-, ATM^{+/-}- und SCID-Mäusen (oben, von links nach rechts) und 72 h nach der letzten Fraktion à 100 mGy (40 bzw. 20 Fraktionen, unten). Die 53BP1-Foci sind durch weiße Pfeile markiert. Die Zelle in der oberen Ecke jedes Bilds repräsentiert einen für die Probe typischen 53BP1-Focus. *: Signifikant im Bezug zur unbestrahlten Gruppe, **: Signifikant im Bezug zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt ($p \leq 0.05$). Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler von vier unabhängigen Analysen dar.

72 h nach der fraktionierten Bestrahlung mit 100 mGy war die Zahl der 53BP1-Foci pro Zelle stets niedriger als nach 24 h, allerdings nahmen die Foci in den Neuronen mit einer eingeschränkten Reparatur ($ATM^{+/-}$, $ATM^{-/-}$, SCID) mit steigender kumulativer Dosis kontinuierlich zu (Abbildung 4.8 (A)). Besonders stark war der Anstieg in den reparaturdefizienten $ATM^{-/-}$ - und den SCID-Zellen, aber auch in den $ATM^{+/-}$ -Zellen war eine deutliche Akkumulation der 53BP1-Foci zu beobachten. Die $ATM^{+/+}$ -Zellen wiesen dagegen keinen Anstieg der Fociwerte mit zunehmender Fraktionenzahl auf, dennoch waren die Fociwerte signifikant höher als in den unbestrahlten Zellen und in den mit nur einer Fraktion bestrahlten Zellen (Abbildung 4.8 (A)).

Wie diese Ergebnisse verdeutlichen, wird sowohl die Markierung als auch die Reparatur der durch niedrige Strahlendosen verursachten DSBs – außer durch die Dosis – auch stark durch den individuellen Genotyp beeinflusst.

Für die Auswertung am Mikroskop waren die Proben durch Zahlen verblendet, um eine objektive Auszählung zu gewährleisten. Neben einer bereits qualitativ sichtbaren höheren Anzahl an 53BP1-Foci in manchen Proben, wurde außerdem in einem Teil dieser Proben auch eine erhebliche Menge an ungewöhnlich großen Foci gefunden. Während ein typischer 53BP1-Focus einen Durchmesser von rund 1 μm hatte, zeigten diese Foci oft einen doppelt so großen Durchmesser. Eine Verdopplung des Focusdurchmessers von 1 μm auf 2 μm bedeutet dabei eine Vervierfachung der Focusfläche, d.h. während ein normal großer Focus ($d = 1 \mu\text{m}$) bei einem durchschnittlichen Durchmesser eines Neuronenanschnitts von 9 μm etwa 1.2% der Fläche einnimmt, macht ein 2 μm -Focus bereits ca. 5% der Fläche aus. Bei der Auswertung der gezählten Foci pro Zelle stellte sich später heraus, dass es sich bei diesen Proben vor allem um $ATM^{-/-}$ -Proben handelte bzw. um Proben, die mit mehreren Fraktionen à 100 mGy bestrahlt wurden (Abbildung 4.8 (B)). Um diese Beobachtung genauer zu charakterisieren, wurde nach der Quantifizierung der 53BP1-Foci pro Zelle auch der Anteil an überdurchschnittlich großen Foci ($\geq 2 \mu\text{m}$) pro Probe bzw. der mittlere Durchmesser eines Focus einer Probe bestimmt. Hierbei bestätigte sich die subjektive Beobachtung, dass der Anteil an überdurchschnittlich großen Foci sowohl genotyp- als auch bestrahlungsabhängig variierte (Abbildung 4.9).

4. Ergebnisse

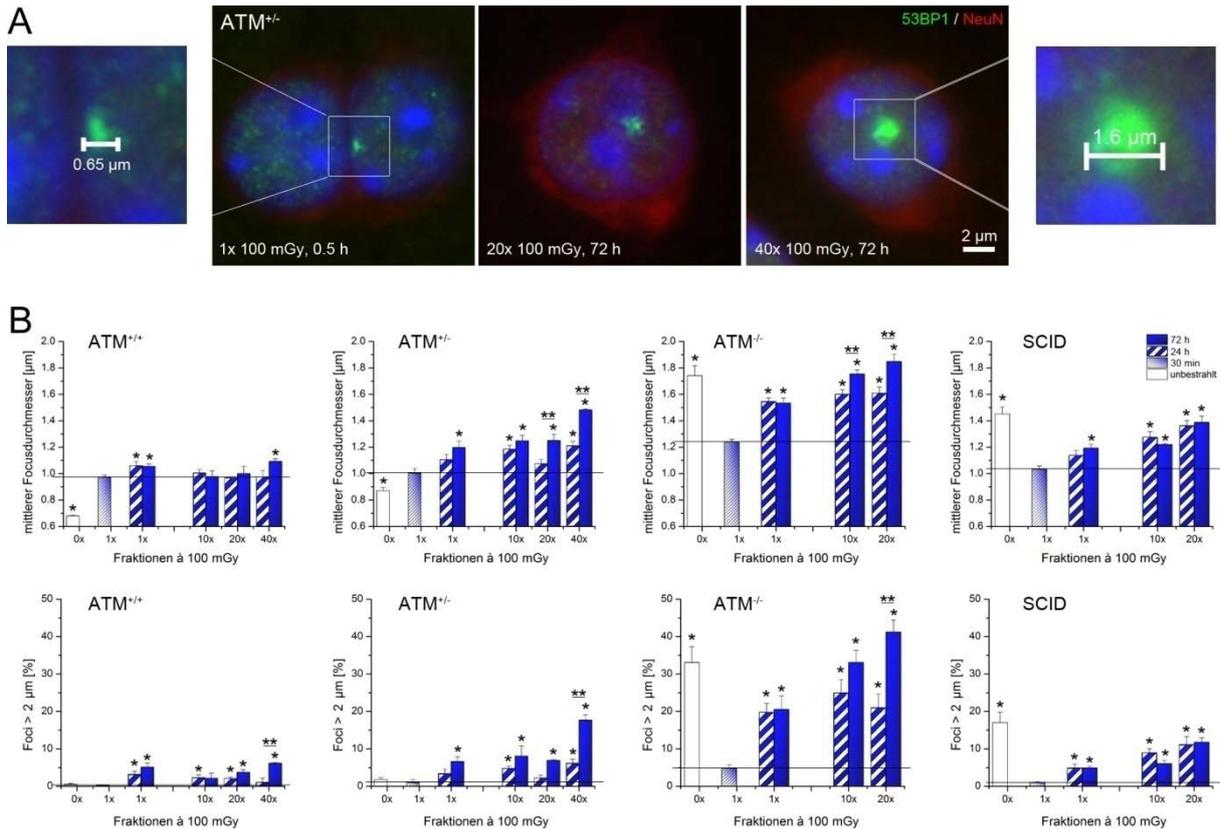


Abbildung 4.9 53BP1-Focigröße nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung mit 100 mGy

Dargestellt sind die in den Neuronen der verschiedenen Genotypen im Mittel gefundenen 53BP1-Focigrößen ohne Bestrahlung und nach Bestrahlung mit 10 mGy bzw. 100 mGy. (A) Entwicklung der 53BP1-Focigröße in $ATM^{+/-}$ -Neuronen nach der Induktion mit 1x 100 mGy (30 min) und mit steigender kumulativer Dosis zu späteren Zeitpunkten nach der jeweils letzten Fraktion (72 h). (B) Mittlerer Durchmesser eines 53BP1-Focus (oben) und der Anteil an Foci $\geq 2 \mu\text{m}$ (unten) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einmaliger und wiederholter Bestrahlung mit 100 mGy in $ATM^{+/+}$, $ATM^{+/-}$, $ATM^{-/-}$ und SCID-Neuronen (von links nach rechts) im Vergleich zu unbestrahlten Neuronen. *: Signifikant im Bezug zu 30 min nach Bestrahlung, **: Signifikant im Bezug zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt ($p \leq 0.05$). Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler von vier unabhängigen Auswertungen dar.

In den unbestrahlten Neuronen reparaturdefizienter $ATM^{-/-}$ und SCID-Mäuse zeigte sich bereits unabhängig von einer Bestrahlung, dass die 53BP1-Foci im Durchschnitt wesentlich größer waren, als die wenigen, sehr kleinen 53BP1-Foci ($< 1 \mu\text{m}$) in Neuronen mit funktionsfähiger DSB-Reparatur ($ATM^{+/+}$ und $ATM^{+/-}$) oder die frühen (30 min), durch Strahlung induzierten Foci (Abbildung 4.9 (B)). Die durch Strahlung induzierten 53BP1-Foci lagen zu frühen Zeitpunkten nach der Bestrahlung (30 min) durchschnittlich bei einem Durchmesser von etwa $1 \mu\text{m}$ und stellten im Mittel die kleinsten Foci nach Bestrahlung dar. Die in den $ATM^{-/-}$ -Neuronen induzierten frühen Foci waren durchschnittlich etwas größer. Allerdings war der Anteil an strahlungsinduzierten Foci hier auch wesentlich kleiner als in den anderen drei Genotypen (Erhöhung des Fociniveaus 30 min nach 1x 100 mGy Bestrahlung zur unbestrahlten Kontrolle: x1.9 ($ATM^{-/-}$); x4.7 (SCID); x13.7 ($ATM^{+/-}$); x23.5 ($ATM^{+/+}$)), wodurch die nicht durch Bestrahlung induzierten Foci stärker ins Gewicht fielen. Die nach 24 h bzw. 72 h verbliebenen 53BP1-Foci waren im Mittel größer als die nach 30 min induzierten 53BP1-Foci. Nur in den reparaturprofizienten $ATM^{+/+}$ -Neuronen bewegte sich der mittlere Focusdurchmesser in allen Proben im Größenbereich der induzierten Foci. Die nach 24 h noch vorhandenen 53BP1-Foci waren dabei tendenziell kleiner als die nach

72 h noch vorhandenen Foci. In den anderen Genotypen nahm der Anteil an großen 53BP1-Foci ($d \geq 2 \mu\text{m}$) mit zunehmender Fraktionenzahl kontinuierlich zu und somit auch der mittlere Durchmesser eines 53BP1-Focus in einer Probe (Abbildung 4.9). Dabei war der Anteil an großen Foci in den $\text{ATM}^{-/-}$ -Neuronen zu jedem Zeitpunkt am größten. Während sie in den $\text{ATM}^{+/-}$ - und den SCID-Neuronen in einem ähnlichen Bereich lagen, war der Anteil in den $\text{ATM}^{+/+}$ -Wildtypzellen am kleinsten und mit $\leq 5\%$ nur sehr gering. Nur 72 h nach 40x 100 mGy waren mit durchschnittlich $6.1 \pm 0.2\%$ etwas mehr als 5% der Foci $\geq 2 \mu\text{m}$.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die applizierte Dosis und der Genotyp nicht nur Auswirkungen auf die Zahl der 53BP1-Foci haben, sondern auch auf die Größe der verbleibenden 53BP1-Foci. Eine verminderte Reparaturkapazität spiegelt sich bei einem Teil der Schäden offenbar in der Größe der 53BP1-Foci wider.

Um auszuschließen, dass das Fehlen bestimmter Reparaturproteine im neuronalen Gewebe in der Induktion von Apoptose oder einer inflammatorischen Reaktion resultiert, wurden die mit der maximalen Fraktionenzahl bestrahlten Proben (20x bzw. 40x 10 mGy und 100 mGy) der drei ATM-Genotypen sowie der SCID-Mäuse für die Apoptosemarker *cleaved-Caspase3* und *cleaved-PARP1* sowie für den Zytokinmarker TGF- β 1 gefärbt. In keiner Probe wurden positive Zellen für einen der drei Marker gefunden, woraus sich schließen lässt, dass die gestörte Reparatureffizienz sich weder in einer TGF- β 1-vermittelten Entzündungsreaktion manifestiert, noch im Verlust von Neuronen durch Apoptose resultiert.

4.4 Reparatur von DNA-Schäden in kortikalen Neuronen nach Bestrahlung mit hohen Dosen

Die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der 53BP1-Focigrößen warfen die Frage auf, ob die großen verbleibenden 53BP1-Foci immer noch unreparierte DSBs markieren oder eine andere Bedeutung haben. Da neuere Studien einen Zusammenhang der focibildenden Reparaturproteine mit der Chromatinstruktur implizieren (Goodarzi *et al.*, 2008; Noon *et al.*, 2010), wurde die Bedeutung der verbleibenden 53BP1-Foci weiter im Zusammenhang mit der neuronalen Chromatinstruktur untersucht. Um die DSB-Reparatur in Neuronen des zerebralen Kortex von reparaturprofizienten (C57BL/6) und reparaturdefizienten ($\text{ATM}^{-/-}$, SCID) Mäusen im Kontext des Chromatins genauer zu charakterisieren, wurden mittels IFM und/oder TEM Reparaturfaktoren (53BP1, pKu70) sowie bestimmte Histonmodifikationen (H3K9ac, H4K16ac, H3K9me3) und chromatinassoziierte Faktoren (KAP1, pKAP1) strahlenabhängig analysiert. Um systemische Aspekte der DSB-Reparatur in kortikalen Neuronen einfacher und effizienter charakterisieren zu können, wurden die nachfolgenden Experimente nach der Exposition mit hohen Einzeldosen (6 Gy) durchgeführt.

4.4.1 Quantifizierung von 53BP1-Foci nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 6 Gy

Um zu verifizieren, dass die nach der fraktionierten Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen gemachten Beobachtungen auch nach einmaliger Exposition mit einer hohen Dosis entsprechend auftreten, wurde dies durch die Untersuchung der Reparaturkinetik in der IFM überprüft. Hierzu wurden reparaturprofiziente C57BL/6 sowie reparaturdefiziente ATM^{-/-}- und SCID-Mäuse einmalig mit 6 Gy bestrahlt und das Gehirngewebe 5 min, 30 min, 5 h, 24 h und 72 h nach der Bestrahlung entnommen. Um den längerfristigen Verlauf zu beobachten, wurde im Fall der reparaturprofizienten C57BL/6-Mäuse außerdem ein Untersuchungszeitpunkt nach 6 Tagen (144 h) analysiert. Ein solch später Reparaturzeitpunkt konnte für die reparaturdefizienten ATM^{-/-}- und SCID-Mäuse nicht untersucht werden, da die Tiere bei dieser hohen Dosis schwere strahleninduzierte Nebenwirkungen entwickelten und vorzeitig aus dem Versuch genommen werden mussten. Das zeitliche Maximum, welches die Tiere ohne größere Nebenwirkungen tolerierten, waren 72 h und bildet daher den spätesten untersuchten Reparaturzeitpunkt bei den reparaturdefizienten Tieren.

Analog zur Bestrahlung mit 2 Gy und der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung zeigte die 53BP1-Focianalyse auch nach einmaliger Exposition mit 6 Gy signifikante Unterschiede in den 53BP1-Focizahlen zwischen den drei Mausstämmen. Wie bei allen vorherigen Untersuchungen zeigten die SCID-Neurone zu jedem Zeitpunkt das mit Abstand höchste 53BP1-Fociniveau. Vom frühestmöglichen Untersuchungszeitpunkt (5 min) bis 30 min nach der Bestrahlung stiegen die 53BP1-Foci pro Zelle in den SCID-Neuronen signifikant an, während sie in den C57BL/6-Neuronen in diesem Zeitraum unverändert blieben. Die reparaturdefizienten ATM^{-/-}-Neurone wiesen 5 min nach der Bestrahlung ein den C57BL/6-Neuronen entsprechende Focizahl auf, was in diesem Fall auch dem höchsten detektierten Fociniveau in diesem Genotyp entsprach. Zu den folgenden Reparaturzeitpunkten nahm die Zahl der 53BP1-Foci kontinuierlich ab (Abbildung 4.10 (A)). Auch in den beiden anderen Mausstämmen war zu späteren Reparaturzeitpunkten (> 30 min) eine kontinuierliche Abnahme der 53BP1-Foci zu beobachten. Dabei war die Abnahme in den reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen zu späteren Reparaturzeitpunkten (≥ 5 h) deutlich schneller als in den reparaturdefizienten ATM^{-/-}-Neuronen. Im Gegensatz zu 30 min nach der Bestrahlung zeigten die C57BL/6-Neurone ab 5 h stetig weniger 53BP1-Foci pro Zelle als die ATM^{-/-}-Neurone (Abbildung 4.10 (A)).

4. Ergebnisse

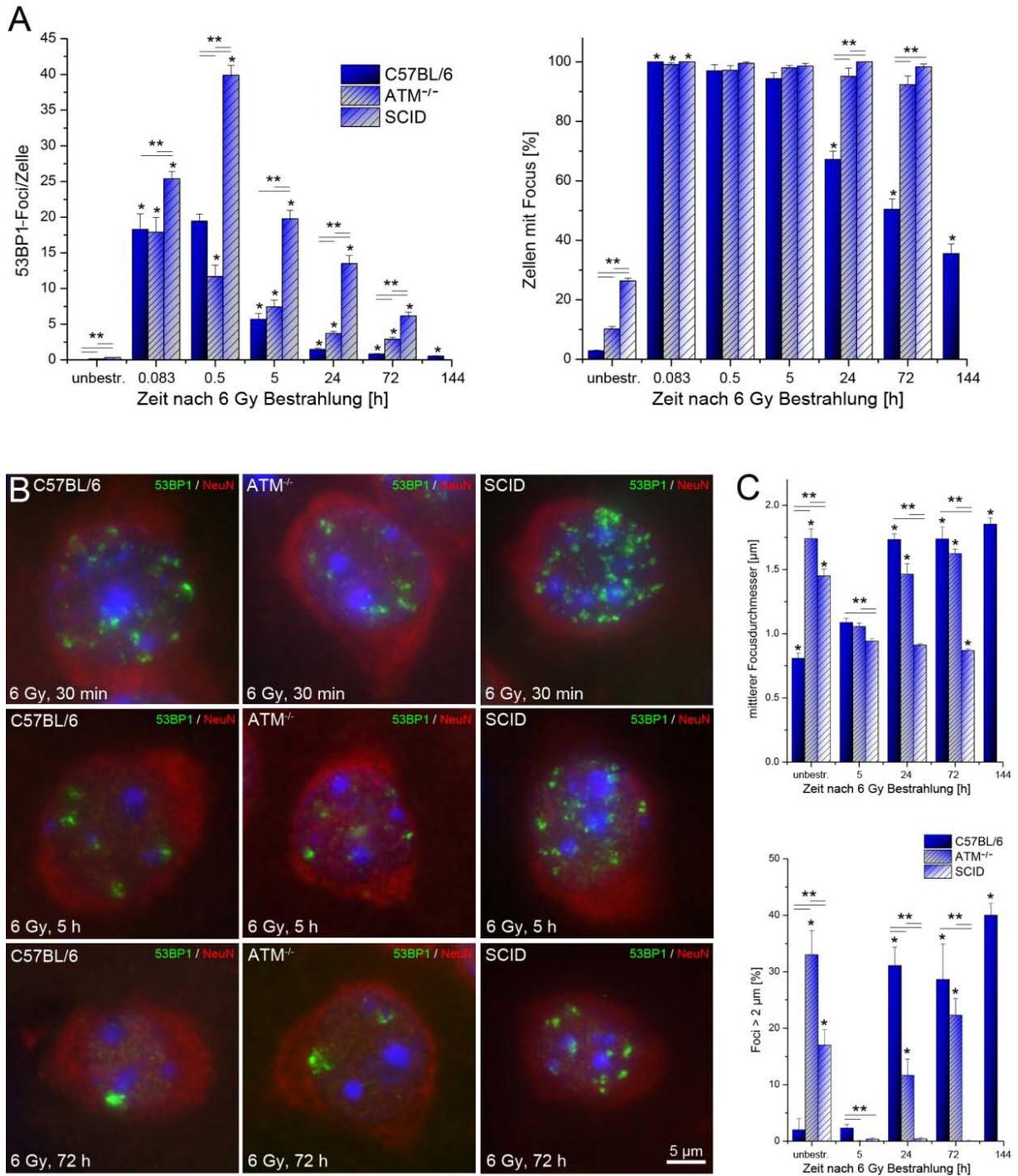


Abbildung 4.10 53BP1-Foci in reparaturprofizienten und reparaturdefizienten Neuronen nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy

(A) 53BP1-Foci pro Zelle in C57BL/6-, ATM^{-/-}- und SCID-Neuronen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einmaliger Exposition mit 6 Gy im Vergleich zu unbestrahlten Neuronen. (B) Repräsentative Aufnahme eines C57BL/6-, ATM^{-/-}- bzw. SCID-Neurons (von links nach rechts) 30 min, 5 h bzw. 72 h (von oben nach unten) nach der Bestrahlung mit 6 Gy. (C) Mittlerer Durchmesser eines 53BP1-Focus (oben) und der Anteil an Foci $\geq 2 \mu\text{m}$ (unten) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy in C57BL/6-, ATM^{-/-}- und SCID-Neuronen im Vergleich zu unbestrahlten Neuronen. (A) *: Signifikant im Bezug zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt; **: Signifikant im Bezug zum anderen Genotyp (C) *: Signifikant im Bezug zu 30 min nach Bestrahlung, **: Signifikant im Bezug zum anderen Genotyp ($p \leq 0.05$). Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler von vier bis acht unabhängigen Analysen dar.

72 h nach der Bestrahlung mit 6 Gy waren in allen drei Genotypen noch signifikant mehr 53BP1-Foci als in den unbestrahlten Kontrollen zu finden (Abbildung 4.10 (A)). Unter den Neuronen mit Reparaturdefekt (ATM^{-/-} und SCID) gab es bis einschließlich 72 h nach der

Bestrahlung kaum Zellen ohne 53BP1-Focus. Lediglich in den ATM^{-/-}-Neuronen war ein geringer Anteil (~5%) frei von 53BP1-Foci. Dagegen nahm der Anteil an Neuronen mit 53BP1-Foci in den reparaturprofizienten C57BL/6-Präparaten ab 24 h stetig ab (24 h: ~70%, 72 h: ~55%, 144 h: ~40%). Aber auch 6 Tage nach der Bestrahlung war das 53BP1-Focilniveau in reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen noch signifikant höher als in unbestrahlten Zellen (unbestrahlt: 0.81 ± 0.04 Foci/Zelle, 6 d: 1.85 ± 0.05 Foci/Zelle, Abbildung 4.10 (A)).

Wie bereits im Rahmen der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung (Abschnitt 4.3.3) beobachtet, waren auch bei der Exposition mit einer hohen Einzeldosis neben den Unterschieden in den Focizahlen deutliche Differenzen zwischen den Focigrößen zu beobachten. Ähnlich zu den Fraktionierungsexperimenten mit 100 mGy waren die frühen strahleninduzierten 53BP1-Foci (< 24 h) kleiner als viele der verbleibenden späten Foci (≥ 24 h; Abbildung 4.10 (B)). Da sich die Bestimmung des mittleren Durchmessers auf Grund der hohen Focidichte zu den frühen Untersuchungszeitpunkten (5 min und 30 min) als problematisch darstellte, wurde hier auf eine quantitative Auswertung verzichtet und nur die Präparate ab 5 h nach der Bestrahlung ausgewertet. Die 5 h nach der Bestrahlung verbliebenen Foci wiesen in allen Proben im Mittel einen Durchmesser von ca. 1 μm auf, Foci mit einem Durchmesser von mehr als 2 μm wurden nur vereinzelt gefunden (Abbildung 4.10 (C)). Ab 24 h waren die verbliebenen 53BP1-Foci in den C57BL/6- und ATM^{-/-}-Neuronen im Mittel signifikant größer als nach 5 h, dabei waren die 53BP1-Foci in den C57BL/6-Neuronen etwas größer als in den ATM^{-/-}-Neuronen. Der Anteil an 53BP1-Foci $\geq 2 \mu\text{m}$ war in den ATM^{-/-}-Neuronen 24 h nach der Exposition noch signifikant niedriger als in den C57BL/6-Neuronen (~30% vs. ~ 12% $\geq 2 \mu\text{m}$). Bis 72 h stieg der Anteil in den ATM^{-/-}-Neuronen weiter signifikant an, blieb aber unter dem der C57BL/6-Zellen. Während die Zahl der Zellen mit 53BP1-Foci in den C57BL/6-Neuronen von einem bis 6 Tage nach der Bestrahlung kontinuierlich sank, zeigten die verbleibenden Foci oftmals einen Focusdurchmesser von $\geq 2 \mu\text{m}$ (6 d: ~40%). In den bestrahlten SCID-Neuronen blieb der Durchmesser dagegen über den gesamten Zeitraum (bis zu 72 h) im Mittel weitgehend unverändert und Foci mit einem Durchmesser von $\geq 2 \mu\text{m}$ wurden nur sehr vereinzelt beobachtet (< 1%; Abbildung 4.10 (C)).

Um zu überprüfen, dass 6 Gy ebenso wie niedrigere Dosen keine apoptotische Reaktion verursachen, wurden die 6 Gy-Proben ab 5 h nach der Bestrahlung für die Apoptosemarker *cleaved*-Caspase3 und *cleaved*-PARP1 gefärbt. Für keinen der Marker fand sich in einem der drei Genotypen eine positive Zelle bei dieser Dosis.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die genetisch determinierten 53BP1-Reparaturkinetiken der drei Genotypen auch nach der einmaligen Applikation einer hohen

Dosis (6 Gy) mit niedrigeren Dosen vergleichbar sind (sowohl nach Einzeit- als auch nach fraktionierter Bestrahlung). Außerdem finden sich auch nach der einmaligen Bestrahlung mit 6 Gy deutliche Unterschiede zwischen frühen und späten 53BP1-Foci und die Induktion einer apoptotischen Reaktion bleibt aus. Die Bestrahlung mit einmalig 6 Gy ist also geeignet, die Beobachtungen der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung nachzustellen. Dennoch sind Diskrepanzen zwischen den beiden Modellen zu berücksichtigen. Obwohl die Reparaturkinetiken in ihrem Verlauf sehr ähnlich sind, zeigen sich für die Focigrößen tendenzielle Unterschiede zwischen Hoch- und Niedrigdosisbestrahlung. Im Gegensatz zur fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung – bei der die reparaturprofizienten Zellen keine großen 53BP1-Foci aufweisen – tritt nach der Bestrahlung mit 6 Gy in den C57BL/6-Neuronen ein erheblicher Anteil an großen 53BP1-Foci auf. Umgekehrt treten die in den SCID-Neuronen durch fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung verursachten, großen 53BP1-Foci nach der Exposition mit einmalig 6 Gy im untersuchten Zeitraum nicht auf. Die verschiedenen Schadensausmaße, die durch die unterschiedlich hohen Dosen verursacht werden, und deren Konsequenzen spiegeln sich also offenbar in der Focigröße wider.

4.4.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zur DNA-Reparatur in kortikalen Neuronen

Da die unterschiedlich großen 53BP1-Foci auf molekularer Ebene möglicherweise Ausdruck einer unterschiedlichen chromatinabhängigen Funktion sind, wurde die 53BP1-abhängige DSB-Reparatur nachfolgend auf elektronenmikroskopischer Ebene charakterisiert. Die in unserer Arbeitsgruppe etablierte TEM-Methode stellt für diese Fragestellung durch ihre hohe Auflösung eine sehr gut geeignete Methode dar. Durch Immunogoldmarkierung von Reparaturfaktoren kann mit dieser Methode die DNA-Schadensantwort fociunabhängig und im Kontext der Chromatinstruktur untersucht werden. Die hohe Auflösung der Methode ermöglicht auch die Untersuchung der Kernproteine des NHEJ, die sich durch ihre geringe Zahl pro DSB in der IFM nicht visualisieren lassen. Bei den Untersuchungen muss jedoch berücksichtigt werden, dass nur ein Teil des Ku70-Proteins aktiv an der Prozessierung von DSBs beteiligt ist. Um die DSB-Reparatur zu untersuchen, muss aktives von inaktivem Protein unterschieden werden. Im Rahmen der Etablierung der Methode in unserer Arbeitsgruppe wurde das focibildende Reparaturprotein 53BP1 diesbezüglich bereits eingehend charakterisiert (Rübe *et al.*, 2011). Die Charakterisierung erfolgte mit demselben Antikörper, der auch in der IFM verwendet wurde. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass aktiv an der DSB-Prozessierung beteiligtes 53BP1, welches sich in der IFM als Focus darstellt, im TEM durch Cluster aus 3-5 Goldpartikeln in heterochromatischen Bereichen des Chromatins markiert wird. Inaktives Protein, das auch in der IFM markiert wird (Abbildung 4.4), stellt sich dagegen durch einzelne Goldpartikel dar, die über den gesamten Zellkern verteilt sind. Da die Kernproteine des NHEJ keine Foci bilden, musste hier eine andere

Möglichkeit zur Unterscheidung gefunden werden. Die Markierung spezifischer post-translationaler Modifikationen, wie z.B. die spezifische Phosphorylierung an Proteinen, bildete hierbei eine Option. Ku70, eine der beiden Komponenten des KU-Heterodimers, besitzt eine solche Phosphorylierungsstelle am Serin 5 (Mensch) bzw. Serin 6 (Maus). Diese für die DNA-Reparatur spezifische phosphorylierte Form des Ku70-Proteins (pKu70) ermöglichte es, durch Verwendung eines entsprechenden spezifischen Antikörpers, das NHEJ in den Neuronen direkt zu charakterisieren.

Analog zur IFM wurde die Reparaturkinetik für 53BP1 in den kortikalen Neuronen reparaturprofizienter C57BL/6-Mäuse sowie reparaturdefizienter ATM^{-/-}- und SCID-Mäuse nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy (5 min bis 72 h) mittels TEM untersucht. Zusätzlich wurde die Kinetik für pKu70 ermittelt.

Bei der Untersuchung von pKu70 mittels TEM zeigten sich kurze Zeit (5-30 min) nach der Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 6 Gy sowohl in heterochromatischen als auch in euchromatischen Bereichen pKu70-Cluster aus zwei Goldpartikeln (pKu70-Dimere) mit einem nahezu konstanten Abstand von ca. 15 nm. In den euchromatischen Bereichen waren außerdem auch einzelne pKu70-Goldpartikel (pKu70-Einzelbeads) zu beobachten (Abbildung 4.11). Die Markierung der Reparaturfaktoren mit unterschiedlich großen Goldpartikeln ermöglichte es, 53BP1 und pKu70 gleichzeitig in den Neuronen zu untersuchen. In der Doppelfärbung von pKu70 (10 nm) mit 53BP1 (6 nm) fand man in den Neuronen des zerebralen Mauskortex eine quantitative Kollokalisierung zwischen den 53BP1-Clustern und pKu70 in heterochromatischen Bereichen zu frühen Reparaturzeitpunkten (5-30 min) nach der Bestrahlung (Abbildung 4.11).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die kurze Zeit nach der Bestrahlung auftretenden 53BP1-Foci heterochromatische Schäden markieren, die über den NHEJ-abhängigen Faktor Ku70 prozessiert werden.

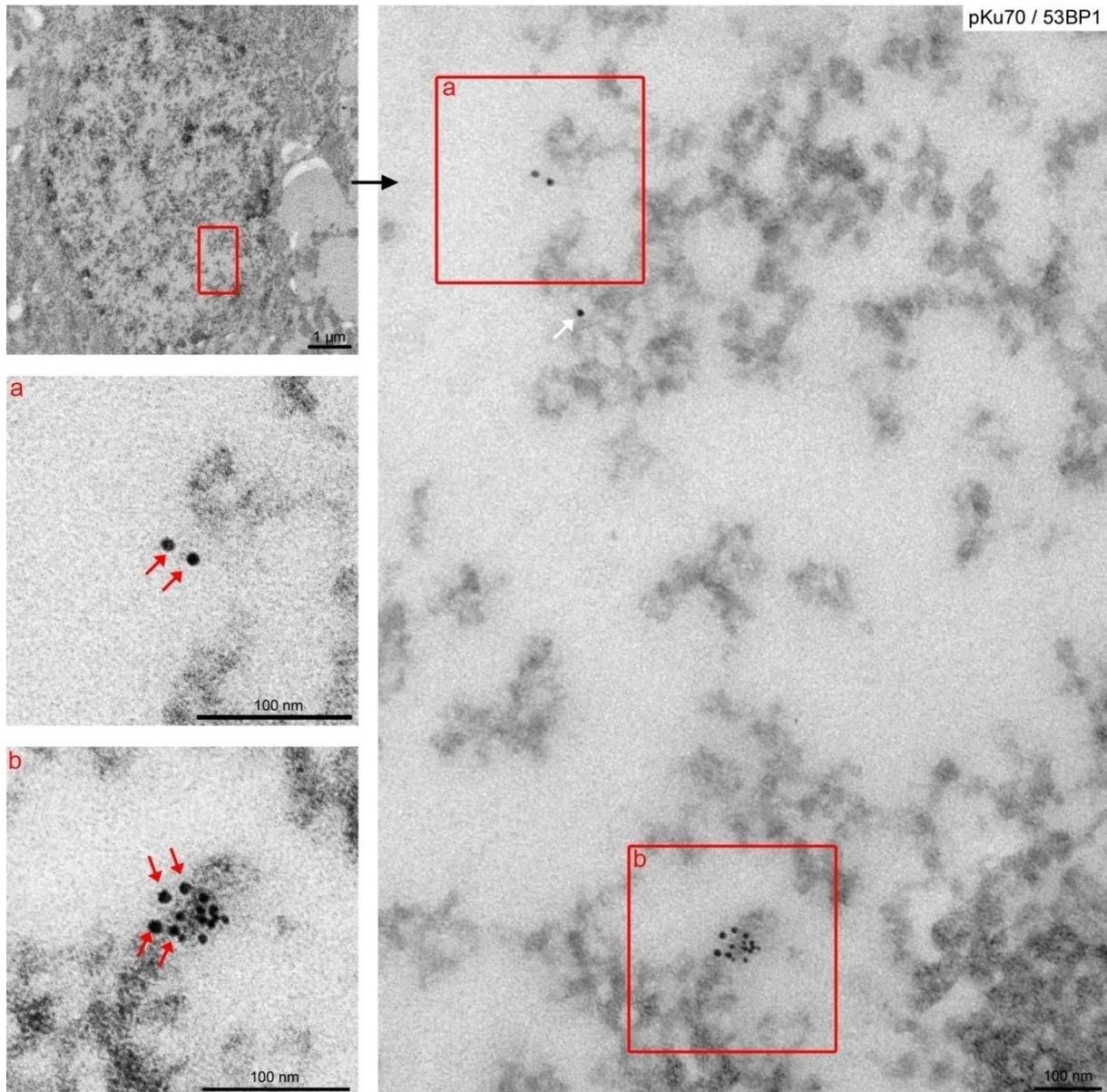


Abbildung 4.11 TEM-Aufnahme eines kortikalen Neurons des murinen Gehirngewebes nach Bestrahlung mit 6 Gy
 Dargestellt ist eine repräsentative TEM-Aufnahme eines kortikalen Neurons 30 min nach einmaliger Exposition mit 6 Gy in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die eingerahmten Regionen sind links vergrößert dargestellt. In den Präparaten wurden der focibildende Reparaturfaktor 53BP1 (6 nm) und die in der Maus an Serin 6 phosphorylierte Kernkomponente des NHEJ – Ku70 – (pKu70, 10 nm) immunologisch markiert. Neben Clustern aus zwei 10 nm-großen Goldpartikeln (pKu70) in euchromatischen Regionen (hellgrau, a) kolokalisieren in heterochromatischen Bereichen (dunkelgrau) zwei oder vier 10 nm-Goldpartikel (pKu70) mit Clustern aus 3-9 6 nm-Goldpartikeln (b). In euchromatischen Bereichen finden sich außerdem einzelne pKu70-Beads. Einzelne euchromatische pKu70-Beads sind durch einen weißen Pfeil markiert, pKu70-Dimere sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

Quantitative Auswertung reparaturprofizienter C57BL/6-Neurone im TEM

Um den zeitlichen Verlauf des NHEJ-Kernproteins pKu70 im Zusammenhang mit der 53BP1-abhängigen DSB-Reparatur besser zu verstehen, wurde die Reparaturkinetik in den mit 6 Gy bestrahlten reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen durch die separate Quantifizierung von pKu70 und 53BP1 im EC und HC untersucht. Dabei wurde zwischen verschiedenen Clustergrößen (1, 2, 4 und ≥ 6 Beads/Cluster) unterschieden.

Das meiste pKu70 trat nach der Bestrahlung mit 6 Gy als pKu70-Dimer (2 Beads/Cluster) auf. Aber auch pKu70-Einzelbeads (1 Bead/Cluster) oder Cluster aus Vielfachen von zwei (4 und ≥ 6 Beads/Cluster) wurden beobachtet. Die pKu70-Einzelbeads fanden sich dabei ausschließlich in euchromatischen Bereichen und machten dort 10 min bis 24 h nach der Bestrahlung einen erheblichen Teil des gefundenen pKu70 aus (35-50%; Abbildung 4.12). Die pKu70-Cluster > 2 Beads/Cluster wurden dagegen ausschließlich im dichten HC gefunden. Sie traten erstmals 30 min nach der Bestrahlung auf und wurden mit zunehmender Reparaturzeit immer größer. Je später der Untersuchungszeitpunkt nach der Bestrahlung, desto größer war ihr prozentualer Anteil (Abbildung 4.12).

Quantitativ zeigten sich deutliche Unterschiede in der pKu70-Kinetik zwischen EC und HC (Abbildung 4.12). Während im EC innerhalb der ersten 10 min nach Exposition ein Maximum an pKu70 beobachtet wurde (~ 1.26 pKu70-Cluster/ μm^3 , davon ~ 0.75 pKu70-Dimere/ μm^3 ($\sim 60\%$) und ~ 0.51 pKu70-Einzelbeads/ μm^3 ($\sim 40\%$)), lag das pKu70-Maximum im HC zeitlich verzögert bei 10-30 min nach der Exposition (~ 0.72 - 0.73 pKu70-Cluster/ μm^3). In Summe wurde das meiste pKu70 pro neuronalem Zellkern 10 min nach der Bestrahlung detektiert (~ 2 pKu70-Cluster/ μm^3 , davon ~ 1.5 pKu70-Dimere/ μm^3 ($\sim 75\%$); Abbildung 4.12). Extrapoliert auf einen neuronalen Zellkern ergaben sich 10 min nach der Bestrahlung mit 6 Gy rund 490 pKu70-Cluster bzw. 360 pKu70-Dimere pro Neuron. Pro Gy und Zellkern entspricht dies ungefähr 80 pKu70-Clustern oder 60 pKu70-Dimeren. Der größte Teil an euchromatischem pKu70 wurde innerhalb der ersten 30 min abgebaut. 5 h nach der Bestrahlung war im EC kaum noch pKu70 zu finden (~ 0.09 pKu70-Cluster/ μm^3 , davon jeweils $\sim 50\%$ pKu70-Dimere bzw. pKu70-Einzelbeads). Auch im HC war nach 5 h ein Großteil des pKu70 beseitigt, allerdings war der Anteil im HC im Vergleich zum EC noch mehr als doppelt so hoch (~ 0.25 pKu70-Cluster/ μm^3 , davon ~ 0.20 pKu70-Dimere/ μm^3 ($\sim 80\%$)). Bis 72 h nach der Bestrahlung nahm die Menge an pKu70 in beiden Chromatinregionen weiter kontinuierlich ab, bis nahezu kein pKu70 mehr zu detektieren war (< 0.02 pKu70-Cluster/ μm^3 ; Abbildung 4.12).

4. Ergebnisse

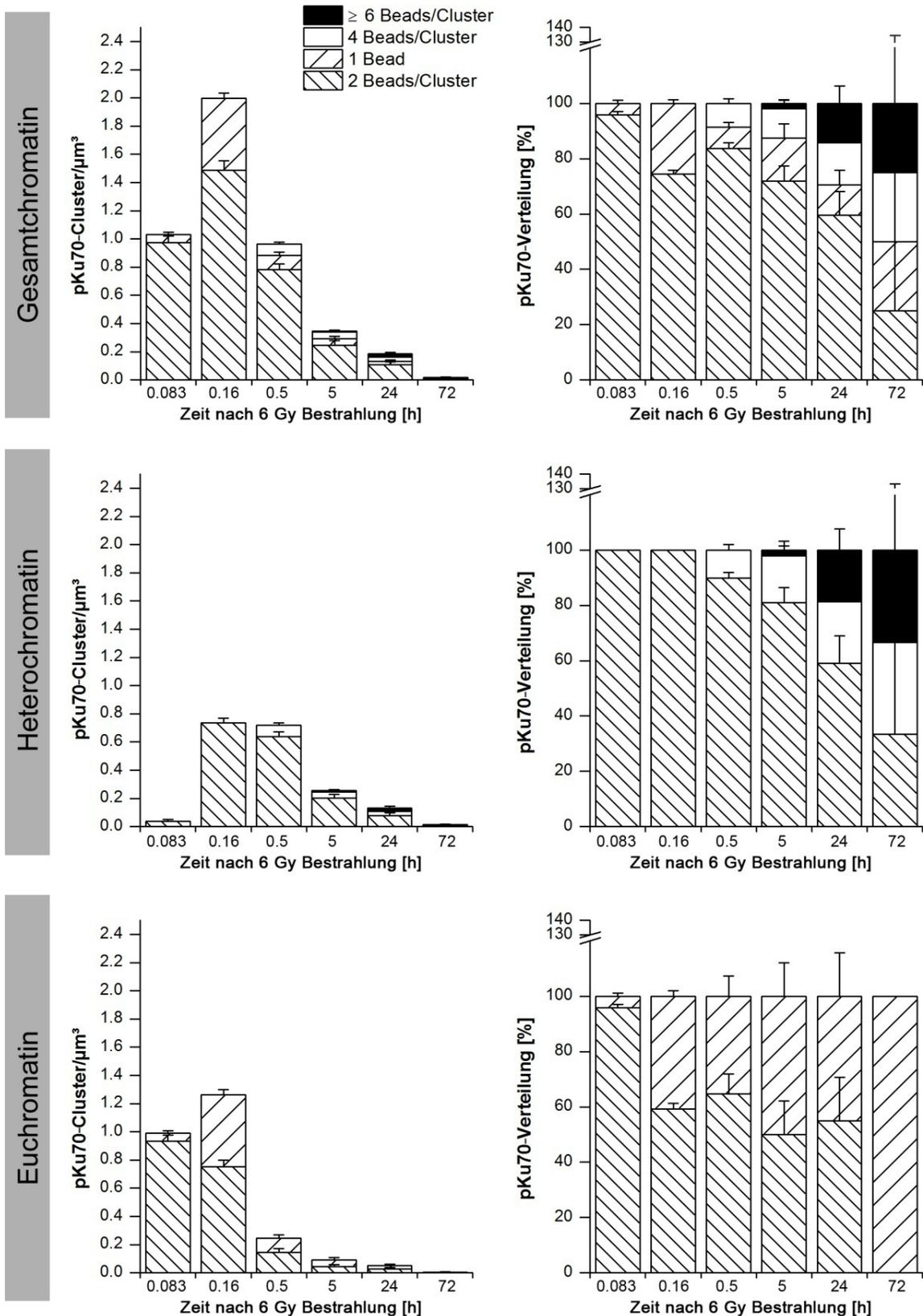


Abbildung 4.12 pKu70 in kortikalen Neuronen von reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen nach 6 Gy-Bestrahlung

Quantifizierung und Verteilung der in euchromatischen und heterochromatischen Kompartimenten detektierten pKu70-Cluster. Die pKu70-Cluster pro μm^3 (1, 2, 4 und ≥ 6 Beads/Cluster, links) und deren prozentuale Anteile (rechts) zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 10 min, 30 min, 5 h, 24 h und 72 h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy differenziert in euchromatische und heterochromatische Schäden. In EC wurden Cluster aus einem oder zwei Beads beobachtet, während im HC Cluster aus Vielfachen von zwei (2, 4 oder ≥ 6 Beads/Cluster) gefunden wurden, deren prozentualer Anteil zu späteren Reparaturzeitpunkten anstieg. Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler der Ergebnisse von 50 Zellkernanschnitten dar.

Da die 53BP1-Cluster ausschließlich in heterochromatischen Bereichen auftraten und zu frühen Zeitpunkten vollständig mit pKu70 kolokalisierten, verlief die Kinetik der 53BP1-Cluster nahezu identisch zur heterochromatischen pKu70-Kinetik (Abbildung 4.12, Abbildung 4.13). Mit fortschreitender Reparaturzeit und dem Auftreten von pKu70-Clustern aus mehr als zwei Beads pro Cluster nahm die Zahl der Kolokalisationen von pKu70 mit 53BP1 ab. Zu späten Zeitpunkten (72 h) fanden sich nur noch überdurchschnittlich große 53BP1-Cluster aus mehr als 10 Beads pro Cluster (im Folgenden als „53BP1-Großcluster“ bezeichnet), die nicht mehr mit pKu70 kolokalisierten (Abbildung 4.13).

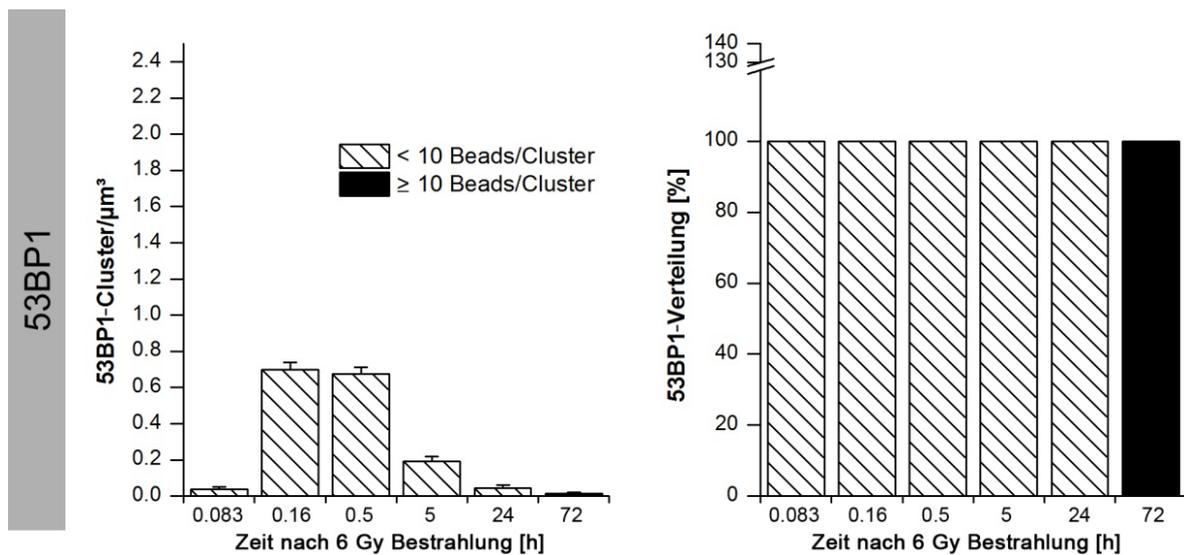


Abbildung 4.13 53BP1-Cluster in kortikalen Neuronen von reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen nach 6 Gy-Bestrahlung

Quantifizierung der in heterochromatischen Kompartimenten lokalisierten 53BP1-Cluster. Dargestellt sind die 53BP1-Cluster pro μm^3 differenziert in Cluster aus < 10 Beads und ≥ 10 Beads (links) und deren prozentualer Anteil (rechts) zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 10 min, 30 min, 5 h, 24 h und 72 h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy. 53BP1-Cluster waren ausschließlich in heterochromatischen Bereichen zu finden. Hierbei kolokalisieren die kleineren Cluster mit den heterochromatischen pKu70-Clustern, während die späten 53BP1-Großcluster (> 10 Beads/Cluster) nicht mehr mit pKu70 kolokalisieren. Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler der Ergebnisse von 50 Zellkernanschnitten dar.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Reparatur von heterochromatischen DSBs mittels NHEJ durch die Chromatinstruktur behindert wird und diese DSBs deswegen vermutlich – im Gegensatz zu euchromatischen Schäden – erst zeitlich verzögert repariert werden. Die pKu70-abhängige Reparatur von heterochromatischen Schäden erfolgt hierbei im Zusammenhang mit 53BP1. Da die zu späten Reparaturzeitpunkten (> 24 h) auftretenden 53BP1-Großcluster (> 10 Beads) dagegen keine aktive DSB-Prozessierung über pKu70 mehr zeigen, markieren die Zellen mit diesen 53BP1-Ansammlungen vermutlich Schäden, die nicht mehr über NHEJ prozessiert werden.

Quantitative Auswertung reparaturdefizienter Neurone im TEM

Um den Einfluss der Reparaturproteinkinasen ATM bzw. DNA-PKcs auf das NHEJ-Kernprotein pKu70 sowie die heterochromatische (53BP1-abhängige) DSB-Reparatur zu charakterisieren, wurde die Reparatur in den kortikalen Neuronen von reparaturdefizienten $ATM^{-/-}$ - und SCID-Mäusen 30 min, 5 h und 72 h nach der Bestrahlung mit 6 Gy für pKu70 und 53BP1 untersucht. Die quantitative Auswertung der 53BP1-Cluster in den reparaturdefizienten $ATM^{-/-}$ - und SCID-Neuronen mittels TEM zeigte beim Abgleich mit den fluoreszenzmikroskopischen Daten einen ähnlichen Verlauf (Abbildung 4.14). Analog zur IFM zeigten die unbestrahlten Neurone vergleichsweise wenige 53BP1-Cluster. Nach der Bestrahlung nahm die Zahl der 53BP1-Cluster pro μm^3 von 30 min bis 72 h in allen drei Fällen ab (C57BL/6: ~ 0.7 53BP1-Cluster/ μm^3 (30 min), < 0.02 53BP1-Cluster/ μm^3 (72 h); $ATM^{-/-}$: ~ 0.3 53BP1-Cluster/ μm^3 (30 min), < 0.06 53BP1-Cluster/ μm^3 (72 h); SCID: ~ 1.3 53BP1-Cluster/ μm^3 (30 min), < 0.07 53BP1-Cluster/ μm^3 (72 h)). Die SCID-Neurone wiesen zu jedem Zeitpunkt die höchsten Werte auf. Dagegen wiesen die $ATM^{-/-}$ -Neurone 30 min nach der Bestrahlung mit Abstand die wenigsten 53BP1-Cluster pro μm^3 auf. Die Zahl der Cluster blieb 5 h nach der Bestrahlung unverändert ($ATM^{-/-}$: ~ 0.3 53BP1-Cluster/ μm^3 (30 min und 5 h)) und nahm bis 72 h nach der Bestrahlung deutlich ab. 5 h und 72 h nach der Bestrahlung war die Zahl der 53BP1-Cluster pro μm^3 in den $ATM^{-/-}$ -Neuronen höher als in den C57BL/6-Neuronen (5 h: ~ 0.3 53BP1-Cluster/ μm^3 ($ATM^{-/-}$), ~ 0.2 53BP1-Cluster/ μm^3 (C57BL/6); 72 h: < 0.06 53BP1-Cluster/ μm^3 ($ATM^{-/-}$), < 0.02 53BP1-Cluster/ μm^3 (C57BL/6); Abbildung 4.14). Diese Beobachtungen zeigen, dass die beiden Methoden gut vergleichbar sind.

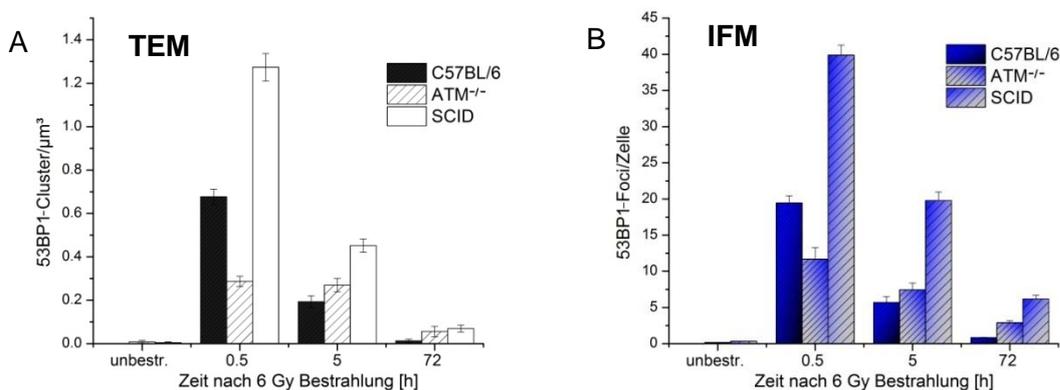


Abbildung 4.14 Gegenüberstellung der 53BP1-Quantifizierungen in der TEM und der IFM nach 6 Gy-Bestrahlung. Quantifizierung der in heterochromatischen Kompartimenten der kortikaler Neuronen von reparaturdefizienten $ATM^{-/-}$ - und SCID-Mäusen beobachteten 53BP1-Cluster im Vergleich zu reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen zu verschiedenen Reparaturzeitpunkten (30 min, 5 h und 72 h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy. Die quantitativen Daten der 53BP1-Cluster pro μm^3 im TEM (links) zeigen analoge Verhältnisse im Vergleich zu den 53BP1-Focizahlen aus der IFM (rechts). Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler der Ergebnisse von 50 Zellkernanschnitten (TEM) bzw. vier bis acht unabhängigen Auswertungen (IFM) dar.

Die quantitative pKu70-Auswertung ergab auch in den reparaturdefizienten Neuronen eine Abnahme von pKu70 mit zunehmender Reparaturzeit sowie unterschiedliche Kinetiken im EC und im HC (Abbildung 4.15). In den reparaturdefizienten ATM^{-/-}- und SCID-Neuronen fand sich zu jedem Zeitpunkt mehr pKu70 als in den reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen (Abbildung 4.15). Wie in den reparaturprofizienten Neuronen war mit Ausnahme der unbestrahlten Zellen zu den untersuchten Zeitpunkten (30 min, 5 h und 72 h) der Anteil an pKu70 in heterochromatischen Bereichen größer als in euchromatischen Bereichen (Abbildung 4.16 (A)). Außer quantitativen Unterschieden waren die in den reparaturdefizienten Neuronen (ATM^{-/-}, SCID) beobachteten Phänomene mit denen in den reparaturprofizienten (C57BL/6) vergleichbar. pKu70 trat auch in diesen als Dimer mit ähnlichem Abstand der beiden Goldpartikeln, als Vielfaches von zwei oder als Einzelbead auf. Auffällig und neu war lediglich die Beobachtung, dass die pKu70-Einzelbeads in den ATM^{-/-}-Neuronen – im Gegensatz zu C57BL/6 und SCID – nicht ausschließlich in euchromatischen Bereichen auftraten, sondern auch im HC. Sie machten den überwiegenden Anteil an pKu70 in den ATM^{-/-}-Neuronen aus (mindestens 60%). Insbesondere im EC traten fast nur einzelne pKu70-Beads auf (~70-90%; Abbildung 4.16). In den SCID-Neuronen war der Anteil an pKu70-Einzelbeads im Gegensatz dazu nur sehr gering (maximal 20%; Abbildung 4.16). Als Cluster aus Vielfachen von zwei trat pKu70 auch in den reparaturdefizienten Neuronen ausschließlich im HC auf. Auch hier wurden die pKu70-Cluster mit zunehmender Reparaturzeit größer und je später der Zeitpunkt nach der Bestrahlung, desto größer wurde der prozentuale Anteil, den sie einnahmen (Abbildung 4.15; Abbildung 4.16). Die Verteilung der unterschiedlich großen pKu70-Cluster im HC war in den reparaturprofizienten C57BL/6- und den reparaturdefizienten SCID-Zellen fast identisch (Abbildung 4.16).

Die pKu70-abhängige DSB-Reparatur erfolgt also auch, wenn eine der Proteinkinasen ATM oder DNA-PKcs in den kortikalen Neuronen fehlt. Dennoch scheint insbesondere das Fehlen von ATM Auswirkungen auf die pKu70-assoziierte Reparatur zu haben.

4. Ergebnisse

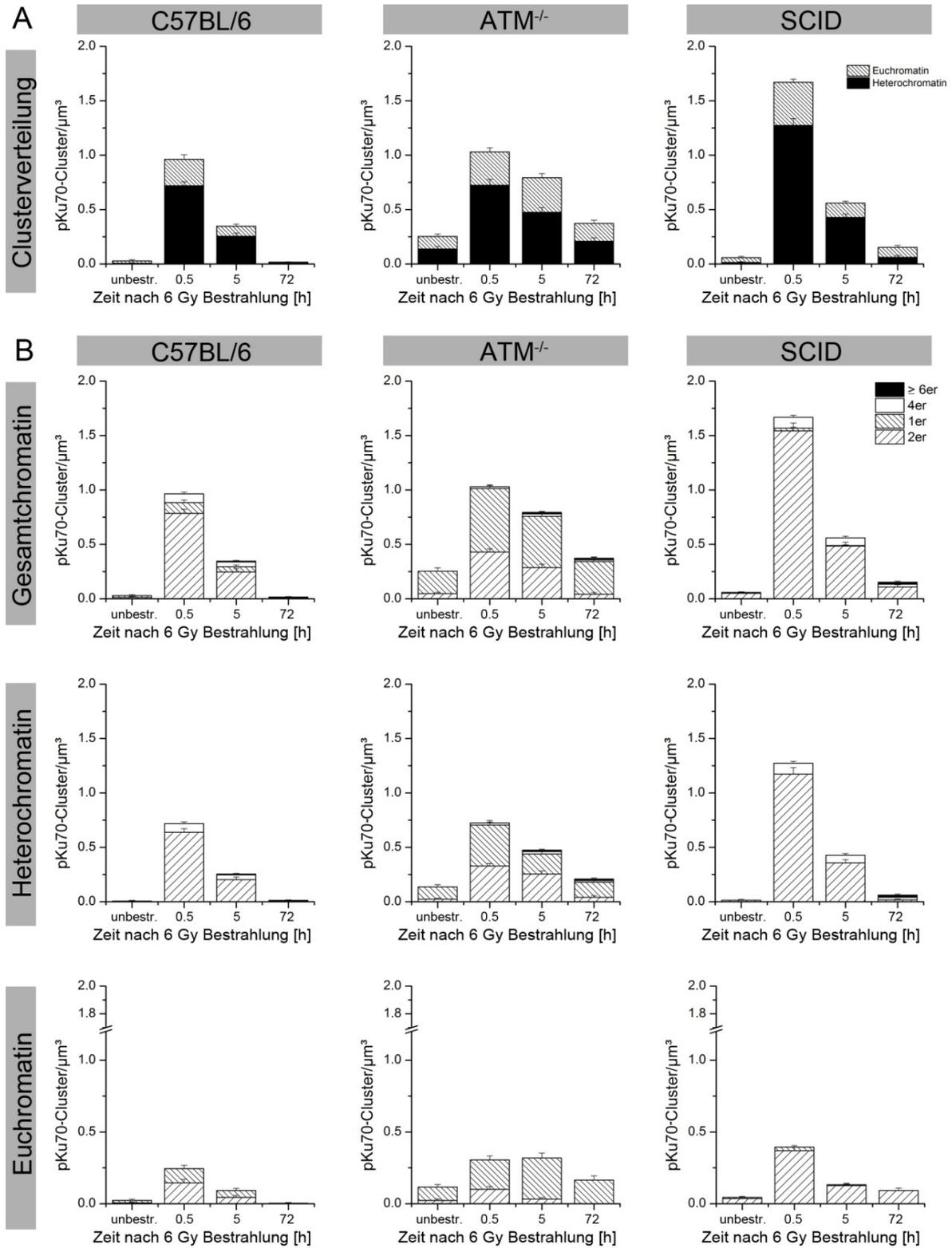


Abbildung 4.15 pKu70 in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter Mäuse nach 6 Gy-Bestrahlung

Quantifizierung der pKu70-Cluster pro µm³ in kortikalen Neuronen von reparaturdefizienten ATM^{-/-} (Mitte) und SCID-Mäusen (rechts) im Vergleich zu den reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen (links), differenziert in euchromatische und heterochromatische Cluster. (A) Durch pKu70 markierte Schäden im EC und im HC zu verschiedenen Reparaturzeitpunkten (30 min, 5 h und 72 h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy. (B) Differenzierung der unterschiedlich großen pKu70-Cluster (1, 2, 4 und ≥ 6 Beads) im gesamten Zellkern (Gesamtchromatin, oben), im HC (Mitte) und im EC (unten). Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler der Ergebnisse von 50 Zellkernanschnitten dar.

4. Ergebnisse

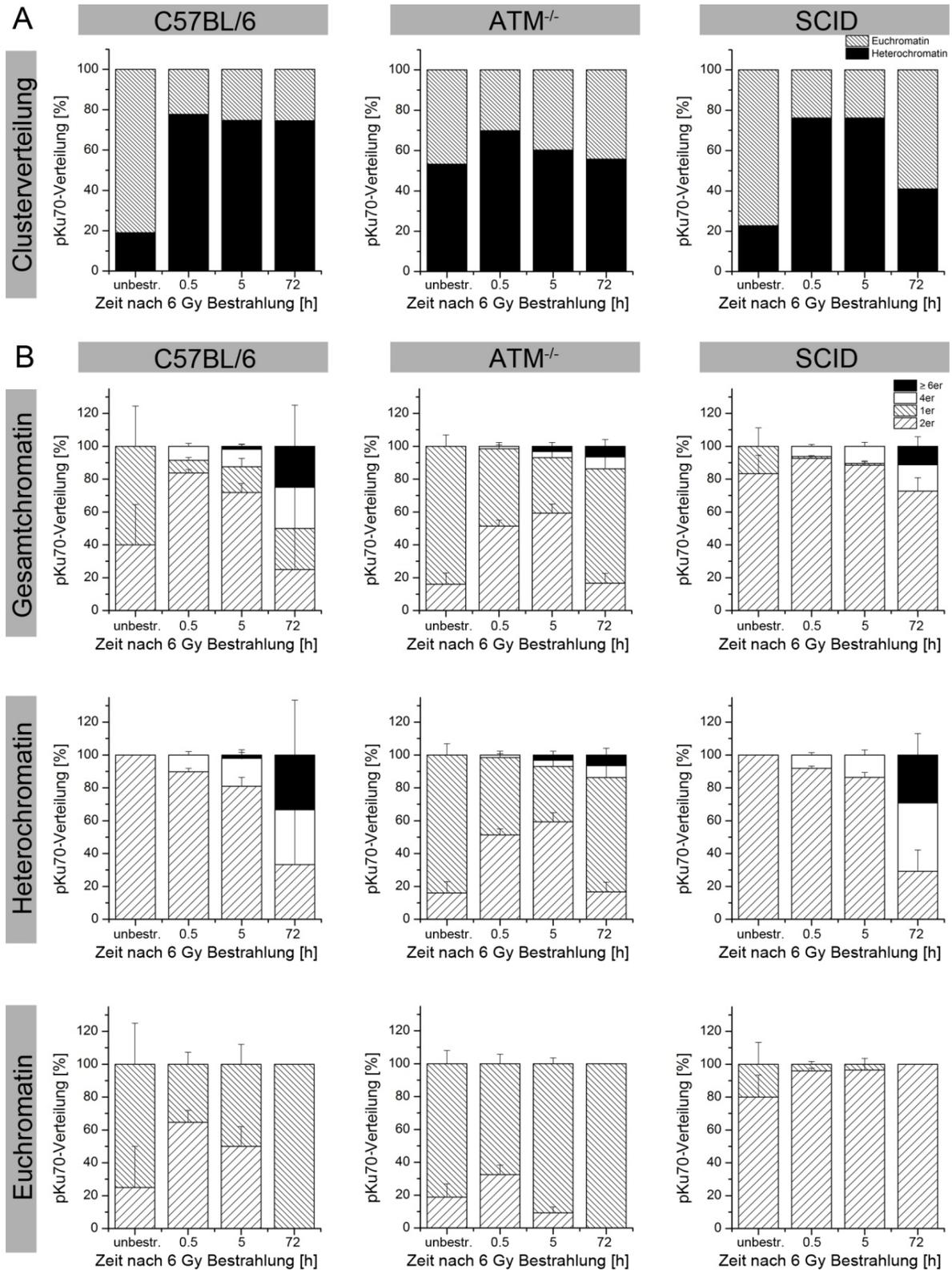


Abbildung 4.16 pKu70-Clusteranteile in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter Mäuse nach 6 Gy-Bestrahlung

Prozentuale Anteile der unterschiedlich großen pKu70-Cluster in den einzelnen Kompartimenten der kortikalen Neurone von reparaturdefizienten ATM^{-/-} (Mitte) und SCID-Mäusen (rechts) im Vergleich zu den reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen (links). (A) Verteilung von pKu70 auf EC und HC zu verschiedenen Reparaturzeitpunkten (30 min, 5 h und 72 h) nach der Bestrahlung mit 6 Gy (B). Prozentuale Anteile der unterschiedlich großen pKu70-Cluster (1, 2, 4 und ≥ 6 Beads) im gesamten Zellkern (Gesamtchromatin, oben), im HC (Mitte) und im EC (unten). Die Fehlerbalken stellen den berechneten Standardfehler der Ergebnisse von 50 Zellkernanschnitten dar.

4.4.3 Veränderungen in Histonmodifikationen und chromatinassoziierten Faktoren in Abhängigkeit von strahleninduzierten DNA-Schäden

Die Chromatinstruktur bildet einen wichtigen Faktor während der DNA-Schadensantwort und wird maßgeblich durch spezifische Histonmodifikationen kontrolliert. Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene Chromatinkomponenten im Zusammenhang mit einer DNA-Schadensantwort stehen. Zu diesen zählen neben γ H2AX – als bekannteste Histonmodifikation im Zusammenhang mit einer DSB-abhängigen DNA-Schadensantwort – u.a. H4K16ac und pKAP1. Da sich im Zuge der TEM-Analysen auch unterschiedliche Lokalisationen der Reparaturfaktoren 53BP1 und pKu70 im Chromatin zeigten, wurde die DSB-Reparatur strahleninduzierter Schäden nachfolgend in Kombination mit spezifischen Histonmodifikationen und chromatinassoziierten Faktoren untersucht.

Zum Abgleich, der anhand der unterschiedlichen Elektronendichten von HC und EC in der Elektronenmikroskopie gemachten Beobachtungen, wurden die Reparaturfaktoren 53BP1 und pKu70 in Kombination mit Markern für Heterochromatin (H3K9me3) bzw. Euchromatin (H3K9ac) gefärbt. Auch die reparaturassoziierte Histonmodifikation γ H2AX wurde in diesem Zusammenhang im Kontext der neuronalen Chromatinstruktur mit anderen Histonmodifikationen oder Reparaturfaktoren näher betrachtet. Aus den anfänglichen Arbeiten zur Charakterisierung von 53BP1 im TEM war bereits bekannt, dass die 53BP1-Cluster in den grauen und dunkelgrauen Chromatinstrukturen mit dem heterochromatischen Marker H3K9me3 kolokalisieren (Rübe *et al.*, 2011). Um auch die euchromatischen pKu70-Beads weiter zu verifizieren, wurde die Doppelmarkierung von pKu70 mit der euchromatischen Histonmodifikation H3K9ac betrachtet. Der euchromatische Marker H3K9ac, der in den hellgrauen Bereichen mit wenig Elektronendichte auftrat, kolokalisierte dort mit pKu70 und bestätigte die bereits anhand der Elektronendichte gemachten Beobachtungen des euchromatischen pKu70 (Abbildung 4.17). Die bisherigen Beobachtungen, wonach 53BP1-Cluster nur in heterochromatischen Domänen auftraten, während pKu70 außer im HC auch im EC Schäden markiert, konnten so weiter bestätigt werden.

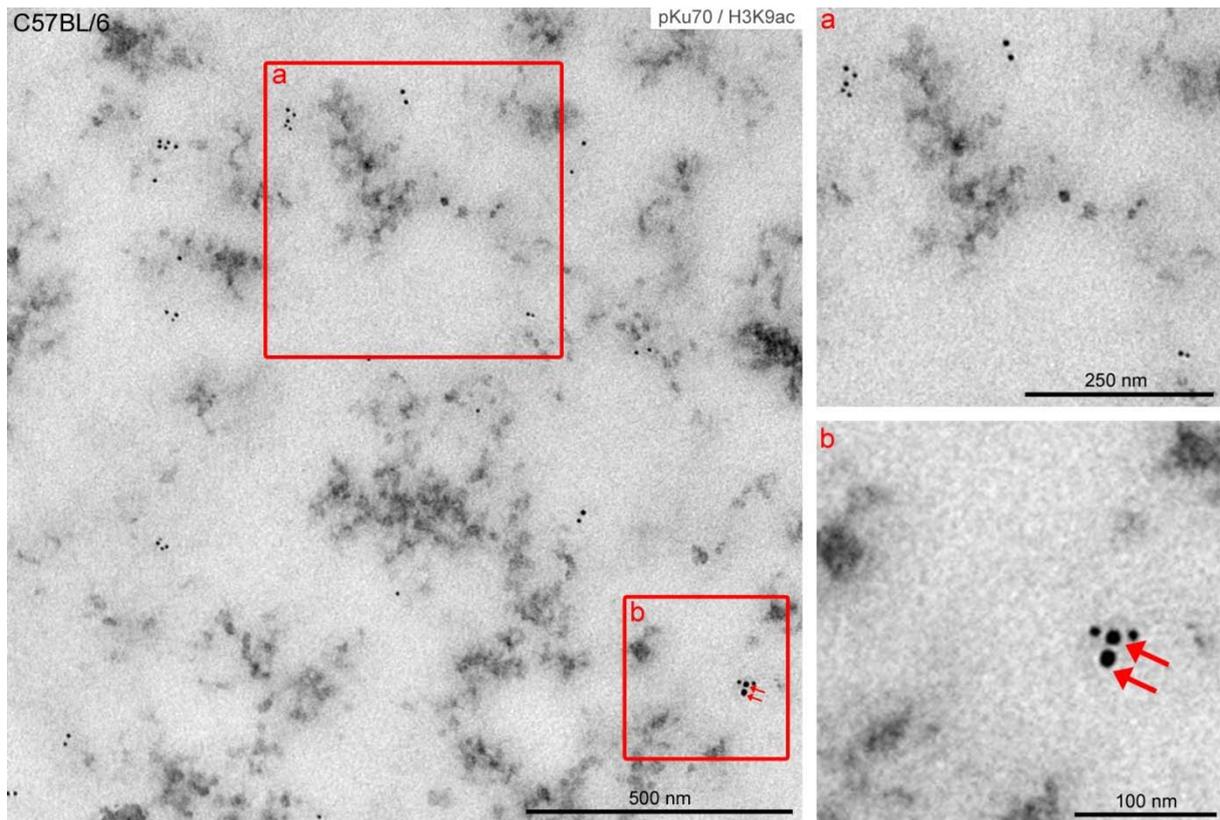


Abbildung 4.17 Reparaturfaktoren im Kontext des Chromatins in Kombination mit spezifischen Histonmodifikationen im TEM

Repräsentative TEM-Aufnahmen in unterschiedlichen Vergrößerungen nach Immunogoldmarkierung der euchromatischen Histonmodifikation H3K9ac (6 nm) in Kombination mit pKu70 (10 nm) 30 min nach 6 Gy-Bestrahlung. H3K9ac (6 nm) verteilt sich in den hellen euchromatischen Regionen mit wenig Elektronendichte (a) und kolokalisiert dort mit pKu70 (10 nm). Die beiden pKu70-Beads sind durch zwei rote Pfeile markiert (b).

Auch in der IFM lokalisierten die meisten 53BP1-Foci in der Nähe von heterochromatischen Bereichen. Der größte Teil der Foci lokalisierte am Zellkernrand in der Nähe der Zellkernmembran und im Bereich von Chromozentren (Abbildung 4.18 (A)). In der Doppelfärbung mit der heterochromatischen Histonmodifikation H3K9me3 fanden sich auch in der IFM Überlappungen der 53BP1-Foci mit H3K9me3 in den heterochromatischen Chromozentren. Der überwiegende Teil der frühen 53BP1-Foci (30 min nach der Exposition) zeigte allerdings keine offensichtliche Überlappung mit H3K9me3, was sich vermutlich auf die geringere Empfindlichkeit und Auflösung der IFM zurückführen lässt und eine detaillierte Beurteilung der Kolokalisation erschwert. Ein ähnliches Bild zeigte sich in der IFM auch für die mit 53BP1 kolokalisierende Histonvariante γ H2AX (Abbildung 4.18 (A)). Eine Beurteilung der Kolokalisation von 53BP1-Foci mit dem euchromatischen Marker H3K9ac in der IFM war durch die homogene Verteilung im Zellkern nicht durchführbar. In der Elektronenmikroskopie wurde keine Kolokalisation zwischen H3K9ac und 53BP1 gefunden. In der Doppelfärbung von 53BP1 mit γ H2AX zeigte sich, dass die zu späteren Reparaturzeitpunkten auftretenden großen 53BP1-Foci noch mit γ H2AX kolokalisierten, also auch noch andere foci bildende Faktoren enthielten (Abbildung 4.18 (B)).

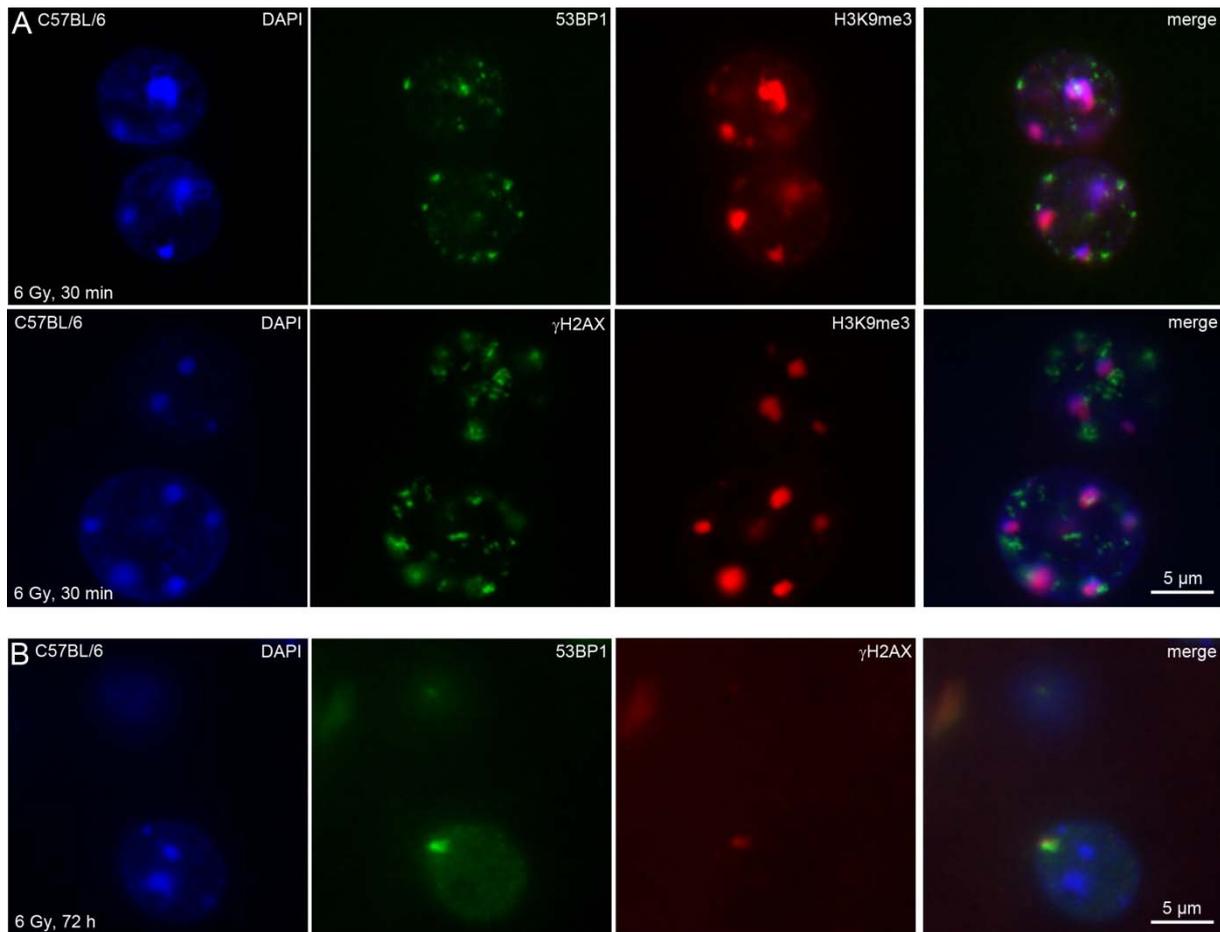


Abbildung 4.18 Reparaturfaktoren im Kontext des Chromatins in Kombination mit verschiedenen Histonmodifikationen in der IFM

Kolokalisation von 53BP1, γ H2AX und H3K9me3 zu frühen (30 min) oder späten (72 h) Zeitpunkten nach Bestrahlung (6 Gy) in der IFM. (A) Kolokalisation der foci bildenden Reparaturfaktoren 53BP1 (grün, oben) oder γ H2AX (grün, unten) mit der heterochromatischen Histonmodifikation H3K9me3 (rot) in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau). (B) 72 h nach 6 Gy-Bestrahlung kolokalisierten die verbleibenden großen 53BP1-Foci (grün) in der IFM mit der strahleninduzierten phosphorylierten Histonvariante H2AX (γ H2AX, rot).

Reparaturdefekte im Zusammenhang mit der Chromatinstruktur

Um die Unterschiede in der DNA-Schadensantwort im Kontext des Chromatins in Abhängigkeit vom Genotyp in den kortikalen Neuronen weiter zu charakterisieren, wurden Veränderungen in den beiden Faktoren H4K16ac und KAP1 – die bekannterweise im Zusammenhang mit DNA-Schadensantworten stehen – nach Bestrahlung untersucht. Auch die beiden Histonmodifikationen H3K9ac und H3K9me3 wurden nach Bestrahlung in den drei Genotypen (C57BL/6, $ATM^{-/-}$ und SCID) untersucht.

Während weder in der Menge von H3K9ac noch von H3K9me3 Veränderungen in der IFM zu beobachten waren, zeigte das H4K16ac-Signal in allen drei Mausstämmen abhängig vom untersuchten Reparaturzeitpunkt einen Anstieg bzw. einen Abfall. Der zeitliche Verlauf der Modifikation, die eine offenere Chromatinstruktur kennzeichnet, variierte dabei abhängig vom Genotyp und auch das maximale Signal schwankte je nach Genotyp. In den Abbildungen 4.19 bis 4.21 sind die Beobachtungen dargestellt.

Bei den reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen war bereits sehr früh (5-30 min) nach der 6 Gy-Bestrahlung ein sehr intensives Signal zu beobachten, welches bis 5 h nach der Bestrahlung wieder deutlich abnahm und erneut eine ähnliche Intensität zeigte wie in den unbestrahlten Kontrollen (Abbildung 4.19). Zu Beginn (5-30 min) zeigte sich in den reparaturdefizienten SCID-Neuronen ein mit den reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen vergleichbares Bild, allerdings war die Abnahme von H4K16ac hier deutlich verzögert. 5 h nach der Bestrahlung war in den SCID-Neuronen noch ein deutlich intensiveres H4K16ac-Signal zu beobachten als in den C57BL/6-Neuronen. Erst 24 h nach der Bestrahlung war das Signal in den SCID-Neuronen wieder deutlich abgeklungen und auf einem mit den unbestrahlten Kontrollen vergleichbaren Niveau (Abbildung 4.20). Die ATM^{-/-}-Neurone unterschieden sich dagegen wesentlich deutlicher von den beiden anderen Genotypen. Die Menge an H4K16ac in den unbestrahlten Zellen war im Vergleich zu den beiden anderen Mausstämmen bereits deutlich geringer. Auch zu frühen Zeitpunkten nach der Bestrahlung (5-30 min) war nur eine schwache Steigerung an H4K16ac zu beobachten. Erst 5 h nach der Bestrahlung mit 6 Gy war das maximale Signal für H4K16ac ATM^{-/-}-Neuronen erreicht. Bis 24 h nach der Bestrahlung nahm die Menge an H4K16ac ab, blieb aber höher als in den C57BL/6- und den SCID-Neuronen. 72 h nach der Bestrahlung war das Niveau an H4K16ac noch nicht bis auf das der unbestrahlten ATM^{-/-}-Kontrollen zurückgegangen und höher als in den beiden anderen Genotypen (Abbildung 4.21).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Proteinkinase ATM im Gegensatz zur Proteinkinase DNA-PKcs an der H4K16-assoziierten Chromatinöffnung beteiligt ist, da ihre Abwesenheit eine Beeinträchtigung der Kinetik der H4K16-assoziierten Chromatinöffnung verursacht, während das Fehlen von DNA-PKcs diesbezüglich keinen Effekt zeigt.

4. Ergebnisse

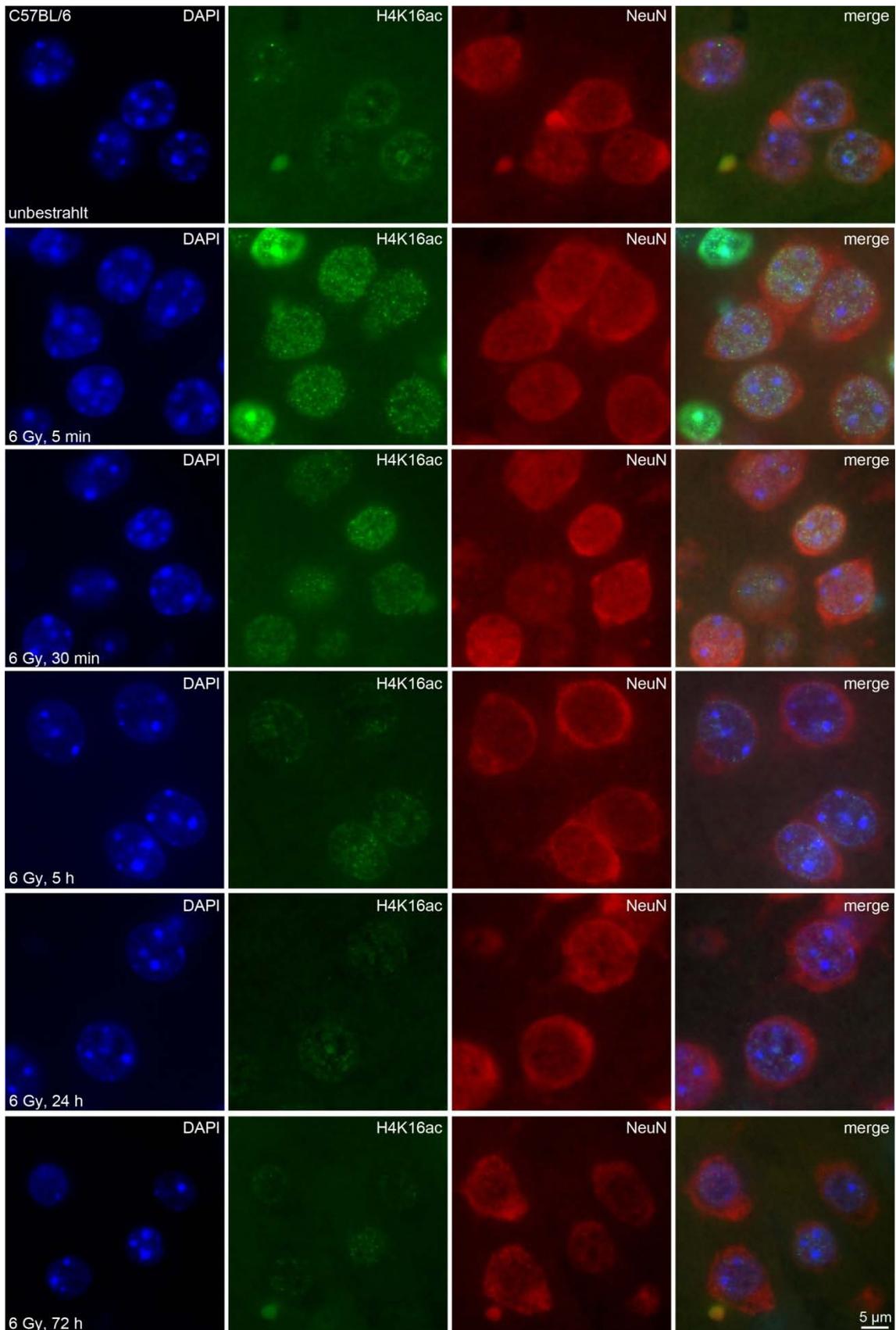


Abbildung 4.19 H4K16ac nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturprofizienter C57BL/6-Mäuse
Repräsentative Aufnahmen der Neurone des zerebralen Kortex von reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen ohne Bestrahlung und zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 30 min, 5 h, 24 h und 72 h) nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy. In der Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN (rot) wurde die euchromatische Histonmodifikation H4K16ac (grün) immunologisch in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) markiert.

4. Ergebnisse

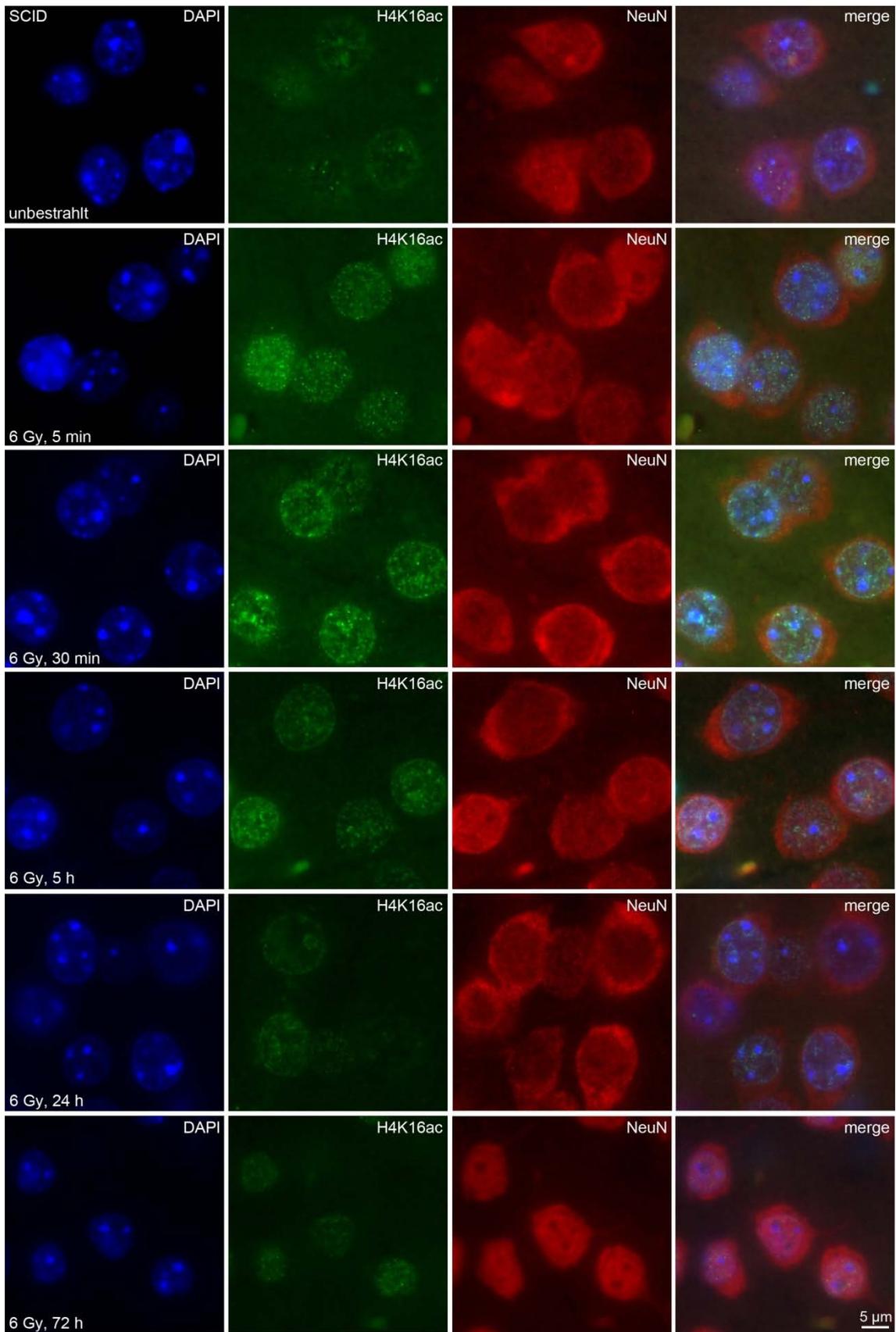


Abbildung 4.20 H4K16ac nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter SCID-Mäuse

Repräsentative Aufnahmen der Neurone des zerebralen Kortex von reparaturdefizienten SCID-Mäusen ohne Bestrahlung und zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 30 min, 5 h, 24 h und 72 h) nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy. In der Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN (rot) wurde die euchromatische Histonmodifikation H4K16ac (grün) immunologisch in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) markiert.

4. Ergebnisse

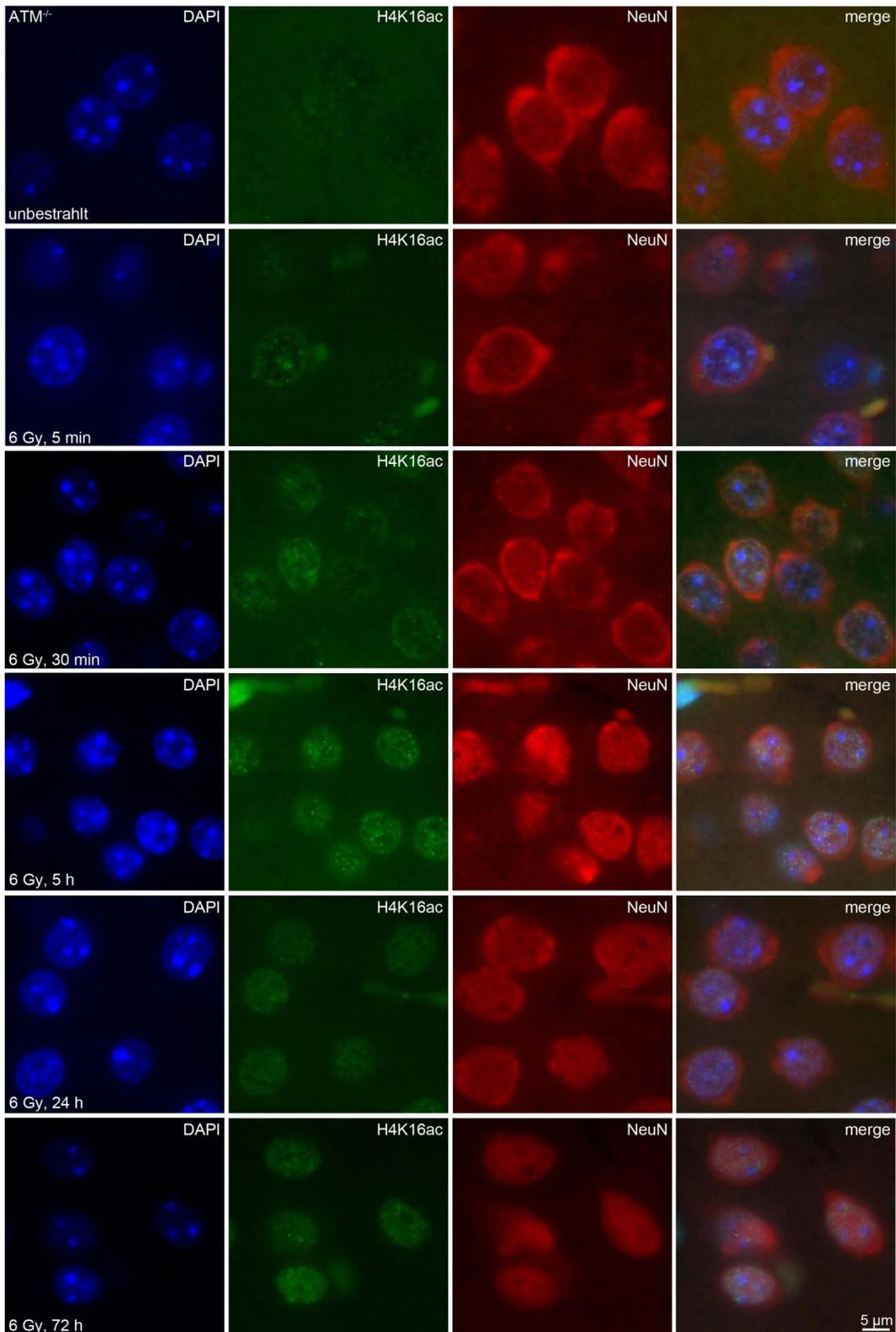


Abbildung 4.21 H4K16ac nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter $ATM^{-/-}$ -Mäuse

Repräsentative Aufnahmen der Neurone des zerebralen Kortex von reparaturdefizienten $ATM^{-/-}$ -Mäusen ohne Bestrahlung und zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 30 min, 5 h, 24 h und 72 h) nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy. In der Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN (rot) wurde die euchromatische Histonmodifikation H4K16ac (grün) immunologisch in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) markiert.

Ein weiterer, für die Chromatinstruktur relevanter Faktor, ist das heterochromatinassoziierte Protein KAP1 (engl. *KRAB-associated protein 1*). Auch von diesem Faktor ist bekannt, dass er im Rahmen der Reparatur von DSB eine wichtige Rolle spielt. KAP1 vermittelt die Heterochromatisierung des Chromatins durch Assoziation mit dem Heterochromatin Protein 1 (HP1), welches die heterochromatische Histonmodifikation H3K9me3 bindet. Nach Bestrahlung wird KAP1 durch die Proteinkinase ATM phosphoryliert und löst sich vom Chromatin, wodurch eine Öffnung des Chromatins vermittelt wird und heterochromatische Brüche repariert werden können.

Um abzuklären, ob die Öffnung und Schließung heterochromatischer Regionen durch die Phosphorylierung und die Dephosphorylierung von KAP1 auch in den kortikalen Neuronen während der Reparatur strahleninduzierter DSBs eine Rolle spielt, wurde zunächst überprüft, ob KAP1 in den kortikalen Neuronen in der IFM nachzuweisen ist und ob es durch Bestrahlung zu deutlichen Veränderungen kommt. Hierzu wurden in Kombination mit NeuN Gewebeschnitte derselben Proben, die auch zur Untersuchung von H4K16ac herangezogen wurden, zunächst für KAP1 und später auch für pKAP1 gefärbt und betrachtet. In den Neuronen des zerebralen Kortex aller drei Genotypen war KAP1 zu detektieren. Das KAP1-Protein verteilte sich gleichmäßig über den gesamten neuronalen Zellkern. Ebenso zeigten sich keine Unterschiede zwischen den unbestrahlten Neuronen der reparaturprofizienten und der reparaturdefizienten Tiere (Abbildung 4.22 (A)). Auch nach Bestrahlung waren für KAP1 keine großen Veränderungen in der IFM zu erkennen. Lediglich 5 min nach der Bestrahlung war ein intensives Signal in den Chromozentren zu finden, welches 30 min nach der Bestrahlung verschwunden war (Abbildung 4.22 (B)). Zu späteren Zeitpunkten zeigten sich keine identifizierbaren Veränderungen des KAP1-Signals mehr. Eine offensichtliche Veränderung der Menge an KAP1 war zu keinem Zeitpunkt in einem der Genotypen zu beobachten.

4. Ergebnisse

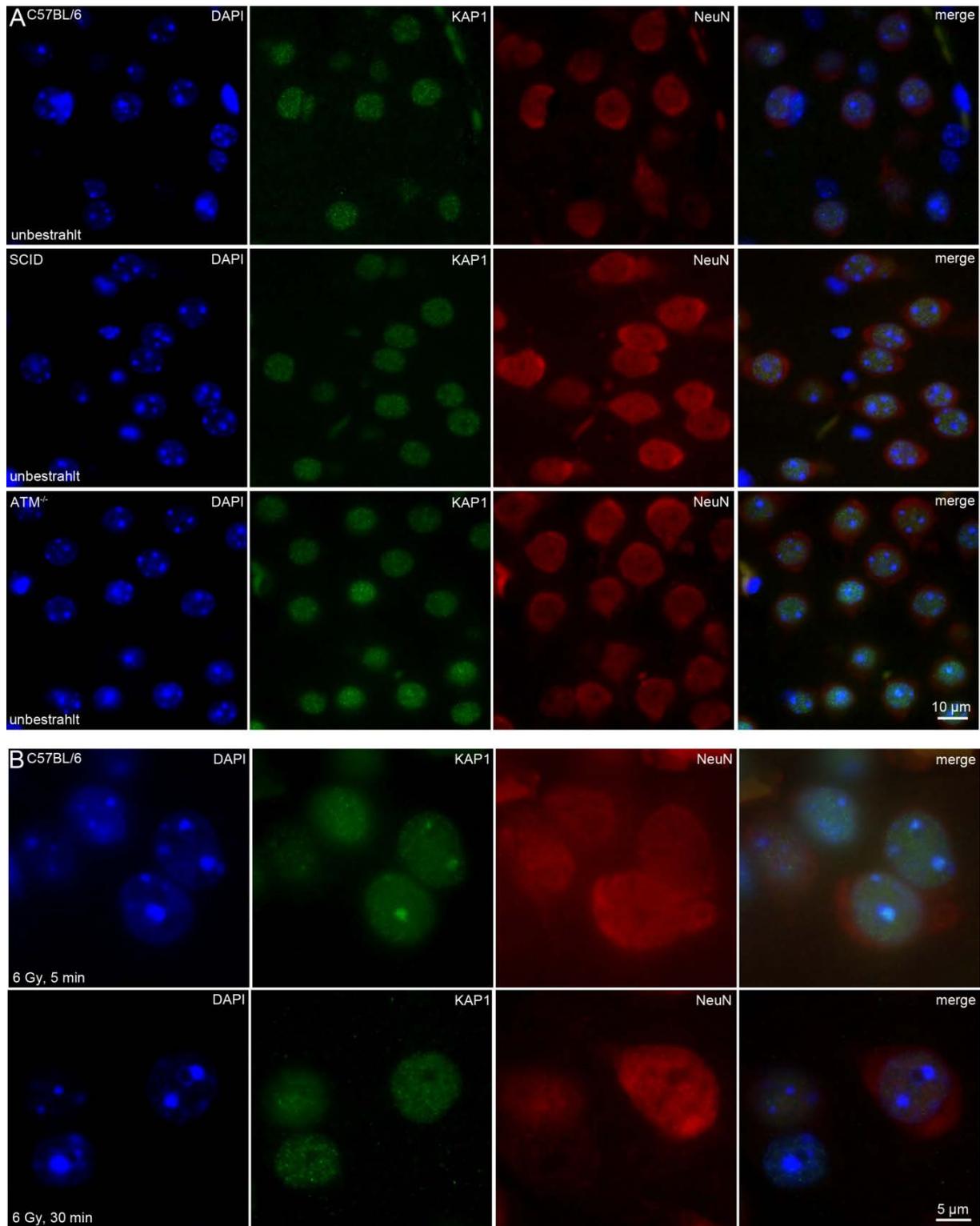


Abbildung 4.22 KAP1 in kortikalen Neuronen vor und nach Bestrahlung mit 6 Gy

Aufnahmen von Neuronen des zerebralen Kortex nach immunologischer Markierung des heterochromatinassoziierten Proteins KAP1 (grün) (A) in reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen und in reparaturdefizienten SCID- und ATM^{-/-}-Mäusen ohne Bestrahlung und (B) in C57BL/6-Neuronen zu frühen Zeitpunkten (5 min und 30 min) nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy. Die Neurone sind durch den neuronalen Marker NeuN (rot), die Zellkerne mit dem DNA-Interkalanz DAPI (blau) markiert. (A) Alle drei Genotypen sind ohne Bestrahlung positiv für KAP1. (B) 5 min nach der Bestrahlung ist eine deutliche Ansammlung von KAP1 in den heterochromatischen Chromozentren zu sehen, während diese 30 min nach der Bestrahlung kein KAP1-Signal mehr zeigen.

Unter Verwendung eines Antikörpers, welcher spezifisch an die an Serin 824 phosphorylierte Form von KAP1 (pKAP1) bindet, zeigten sich bestrahlungsabhängige Unterschiede zwischen den Reparaturzeitpunkten und den Genotypen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.23 bis 4.35 gezeigt.

Während die unbestrahlten Neurone alle negativ für pKAP1 waren, war 5 min nach der Bestrahlung mit 6 Gy sowohl in den C57BL/6-, als auch den SCID-Mäusen pKAP1 zu detektieren. Dabei war die Menge in den reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen höher als in den reparaturdefizienten SCID-Neuronen. 30 min nach der Bestrahlung kehrte sich dieser Aspekt um. Während die C57BL/6-Neurone allenfalls eine marginale Zunahme an pKAP1 in dieser Zeit verzeichneten (Abbildung 4.23), zeigten die SCID-Neurone einen deutlichen Anstieg des pKAP1-Gehalts (Abbildung 4.24). Die Menge an pKAP1 war 30 min nach der Bestrahlung deutlich höher als in den C57BL/6-Neuronen. 5 h nach der Bestrahlung war in beiden Fällen der überwiegende Teil der Neurone negativ für pKAP1. Unter den C57BL/6-Neuronen waren nur noch vereinzelt schwach pKAP1-positive Zellen zu sehen, wohingegen unter den SCID-Neuronen noch mehrere pKAP1 positive Zellen zu beobachten waren. 24 h nach der Bestrahlung wurden in beiden Fällen keine pKAP1-positiven Neurone mehr gefunden (Abbildung 4.23; Abbildung 4.24). Im Gegensatz zu den C57BL/6- und SCID-Neuronen wurde in den ATM^{-/-}-Neuronen zu keinem Zeitpunkt ein pKAP1-Signal detektiert. Auch mittels TEM wurde in ATM^{-/-}-Zellen nicht ein einziges pKAP1-Molekül detektiert, während sowohl in C57BL/6- als auch in SCID-Neuronen immunogoldmarkiertes pKAP1 zu finden war. Beim Fehlen von funktionsfähigem ATM erfolgt offensichtlich keine Phosphorylierung von KAP1 in den kortikalen Neuronen, auch nicht durch eine der anderen PIKKs (ATR oder DNA-PKcs; Abbildung 4.25).

Diese Ergebnisse zeigen, dass es auch in den kortikalen Neuronen zu einer Öffnung von KAP1-assoziierten, heterochromatischen Strukturen kommt. Diese Öffnung erfolgt in ATM-defizienten Zellen nicht, wodurch dortige Schäden wahrscheinlich nicht oder nur unzureichend prozessiert werden können.

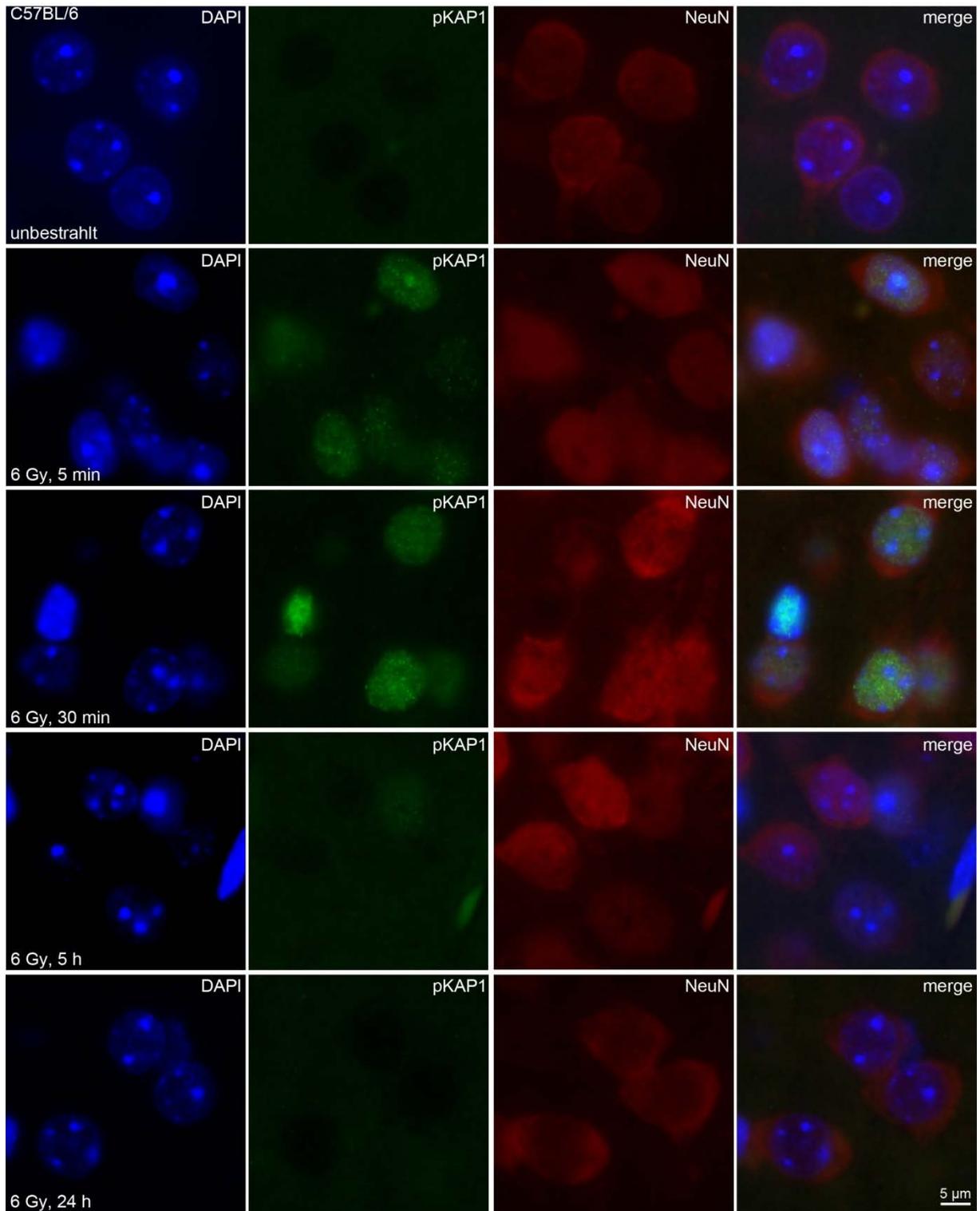


Abbildung 4.23 pKAP1 nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturprofizienter C57BL/6-Mäuse

Repräsentative Aufnahmen der Neurone des zerebralen Kortex von reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen ohne Bestrahlung und zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 30 min, 5 h und 24 h) nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy. In der Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN (rot) wurde an Serin 824 phosphoryliertes KAP1 (pKAP1, grün) immunologisch in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) markiert.

4. Ergebnisse

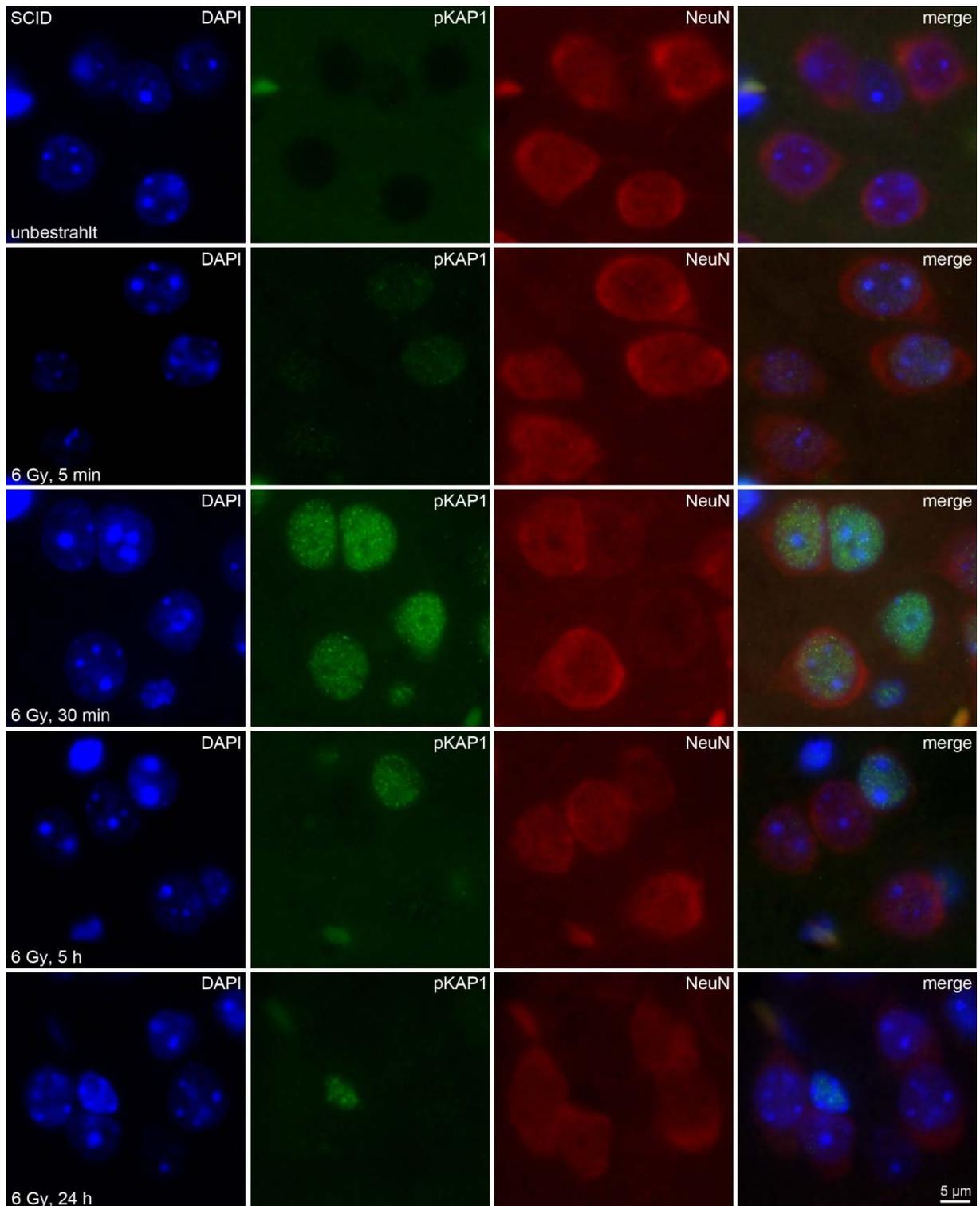


Abbildung 4.24 pKAP1 nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter SCID-Mäuse

Repräsentative Aufnahmen der Neurone des zerebralen Kortex von reparaturdefizienten SCID-Mäusen ohne Bestrahlung und zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 30 min, 5 h und 24 h) nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy. In der Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN (rot) wurde an Serin 824 phosphoryliertes KAP1 (pKAP1, grün) immunologisch in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) markiert.

4. Ergebnisse

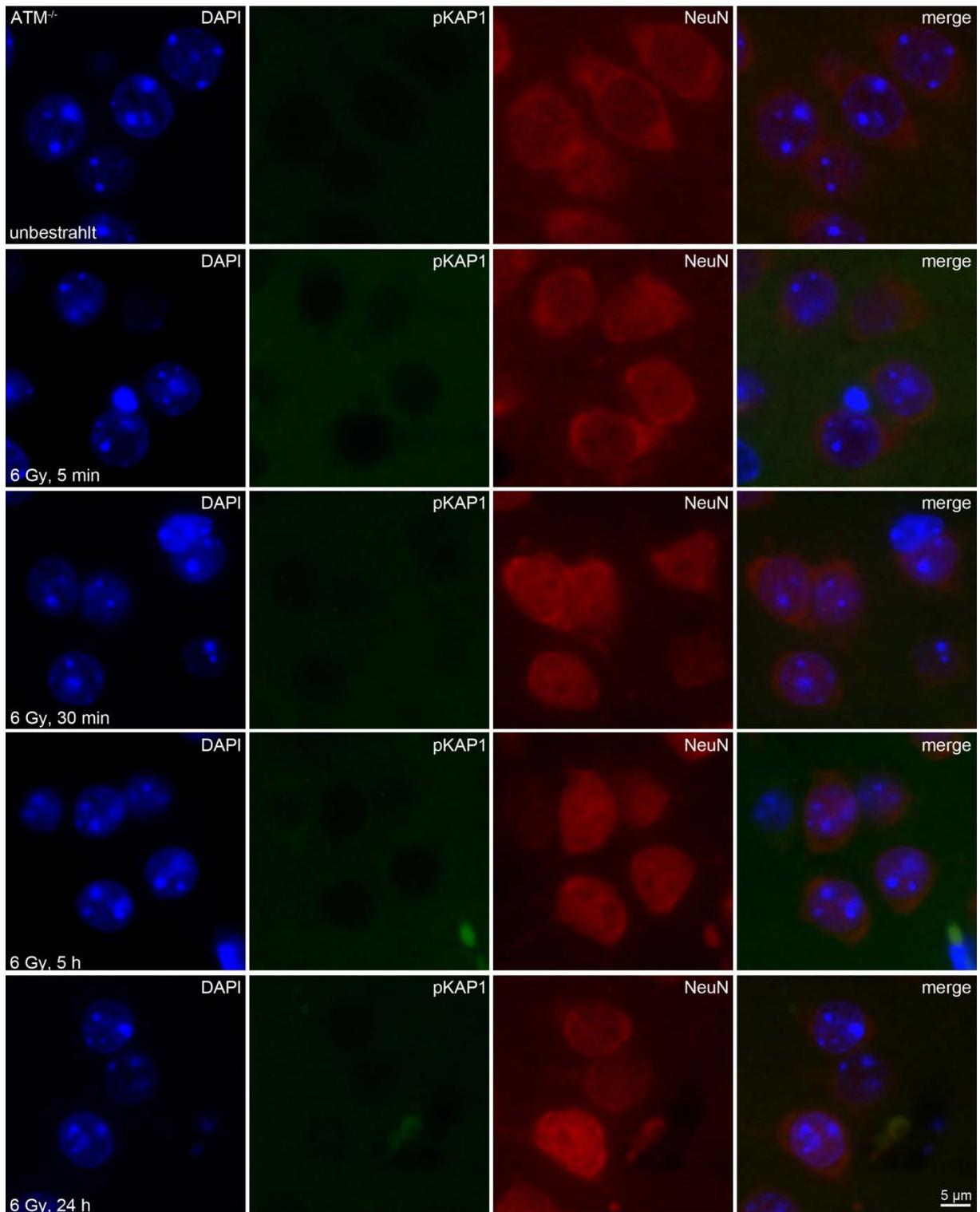


Abbildung 4.25 pKAP1 nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter ATM^{-/-}-Mäuse

Repräsentative Aufnahmen der Neurone des zerebralen Kortex von reparaturdefizienten ATM^{-/-}-Mäusen ohne Bestrahlung und zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 30 min, 5 h und 24 h) nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy. In der Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN (rot) wurde an Serin 824 phosphoryliertes KAP1 (pKAP1, grün) immunologisch in DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) markiert.

5 Diskussion

Ausdifferenzierte kortikale Neurone unterliegen keiner Zellerneuerung, wodurch falsch oder unreparierte DNA-Schäden ein Leben lang erhalten bleiben und potenziell zur Krebsentstehung beitragen können. Deshalb ist es wichtig die Qualität und die Auswirkungen von strahleninduzierten DNA-Schäden im Normalgewebe zu kennen, um so eventuelle Spätschäden abschätzen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das DNA-Reparaturverhalten nach Exposition mit ionisierender Photonenstrahlung in den NeuN-positiven Neuronen des zerebralen Mausekortex untersucht.

5.1 Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden mittels 53BP1 als Marker für DNA-Schäden

Der Reparaturfaktor 53BP1 akkumuliert ebenso wie der vielfach verwendete DSB-Marker γ H2AX in großer Zahl an DSBs und lässt sich in der Immunfluoreszenz als Focus visualisieren (Rogakou *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2000). Die Markierung von 53BP1 ermöglicht es, strahleninduzierte DSBs auch nach Expositionen mit niedrigen Strahlendosen zu untersuchen und zu quantifizieren (Grudzinski *et al.*, 2010; Schanz *et al.*, 2012). Bei der Untersuchung der durch ionisierende Strahlung in kortikalen Neuronen induzierten DSBs wurden neben unterschiedlichen 53BP1-Focizahlen auch deutliche Unterschiede in deren Größen gefunden. Diese Abweichungen waren sowohl von der Bestrahlungsdosis und der Fraktionenanzahl, als auch vom Genotyp und vom Alter der Mäuse abhängig. Auch bei sehr niedrigen Dosen (10 mGy) wurde sowohl die Induktion als auch die Reparatur von DSBs nachgewiesen.

Altersabhängige DSB-Reparaturkapazität reparaturprofizienter Neurone

Im Gegensatz zu Zellen anderer Gewebe und insbesondere zu *in vitro* Säugerzellkulturen, die eine hohe Anzahl spontan auftretender γ H2AX- und 53BP1-Foci aufweisen (Grudzinski *et al.*, 2010; Lukas *et al.*, 2011a; Schanz *et al.*, 2012), zeigen die unbestrahlten, reparaturprofizienten C57BL/6-Neurone ein sehr geringes Hintergrundniveau an 53BP1-Foci. DSBs, die durch den normalen Zellmetabolismus von endogenen Noxen (z.B. durch ROS) verursacht werden, werden also effektiv repariert. Dies zeigt, dass die Neurone über eine effiziente Reparatur von natürlich verursachten Schäden verfügen. Der aufgezeigte leichte Anstieg an Schäden im Alter könnte auf eine altersabhängige Verschlechterung der Reparaturkapazität hindeuten. Allerdings wäre auch eine Akkumulation von falsch oder unzureichend reparierten Schäden denkbar, die sich im Laufe des Lebens ansammeln. Gegen eine altersabhängige Verschlechterung der DNA-Reparaturkapazität spricht hierbei,

dass strahleninduzierte DSBs in den kortikalen Neuronen aller untersuchter Altersgruppen (0.5 Monate, 3 Monate und 24 Monate) gleich gut repariert werden. Trotz einer langsameren DSB-Reparaturkinetik im Alter ist das Niveau der verbleibenden 53BP1-Foci jeweils ähnlich. Eine verschlechterte Reparaturkapazität im Alter scheint also kein Grund für den Anstieg der Focizahl in den ausdifferenzierten Neuronen zu sein. Im Gegensatz zu den kortikalen Neuronen ist eine solche altersabhängige Verschlechterung in anderen gewebespezifischen Funktionszellen offenbar relevant. Die Haarfollikelstammzellen der murinen Haut zeigen beispielweise eine solche altersabhängige Verschlechterung der DSB-Reparatur (Schuler und Rube, 2013). Obwohl die Reparaturkapazität strahleninduzierter DSBs in den kortikalen Neuronen durch die Alterung nicht beeinträchtigt wird, zeigt die höhere Zahl an verbleibenden 53BP1-Foci nach der Bestrahlung – im Vergleich zu unbestrahlten Neuronen –, dass strahleninduzierte DSBs nicht vollständig repariert werden.

DSB-Reparaturkapazität in reparaturdefizienten Neuronen

Wird durch das Fehlen einer der Proteinkinasen ATM oder DNA-PKcs ein DNA-Reparaturdefekt verursacht, äußert sich dieser in den hier untersuchten kortikalen Neuronen bereits ohne Bestrahlung durch ein von natürlichen endo- und exogenen Noxen hervorgerufenen höheres 53BP1-Fociniveau. Je nachdem welche der beiden PIKKs fehlt, bestehen jedoch grundlegende Unterschiede für die DNA-Schadensantwort. Durch das Fehlen von funktionsfähigem DNA-PKcs wird in den unbestrahlten SCID-Neuronen ein deutlich höheres 53BP1-Fociniveau verursacht als durch das Fehlen von ATM. Dies deutet auf eine essenziellere Funktion von DNA-PKcs für die DSB-Reparatur in diesen Zellen hin. Während der Proteinkinase ATM, sowohl während des NHEJ als auch während der HR, eine Vielzahl von Funktionen zugeschrieben wird – inklusive Zellzykluskontrolle und Modulation von Signaltransduktionskaskaden – (Shiloh und Ziv, 2013), bildet die Proteinkinase DNA-PKcs in erster Linie eine der Kernkomponenten des NHEJ (Mahaney *et al.*, 2009). Da es sich bei den ausdifferenzierten Neuronen um nicht proliferierende G₀-Phase Zellen handelt, ist die Reparatur von DSBs durch HR, die primär während der S- und G₂-Phase erfolgt (van Gent *et al.*, 2001), in diesen Zellen nicht von Bedeutung. Das NHEJ bildet daher den vorherrschenden DSB-Reparaturweg in Neuronen. Die hohe Zahl der 53BP1-Foci in den SCID-Neuronen beruht daher vermutlich auf einer gestörten Verknüpfung der Bruchenden. Trotz der höheren Zahl an DNA-Schäden in den SCID-Neuronen scheint das Fehlen der Proteinkinase ATM für den Gesamtorganismus der Maus schwerwiegender zu sein, als das Fehlen der Proteinkinase DNA-PKcs, da SCID-Mäuse im Gegensatz zu ATM-defizienten Mäusen ein höheres Alter erreichen. Während ATM^{-/-}-Mäuse i.d.R. spätestens im Alter von 6 Monaten versterben (Barlow *et al.*, 1996), werden SCID-Mäuse älter als ein Jahr (Bosma *et al.*, 1983).

Ungeachtet des bereits vor einer Bestrahlung in den kortikalen Neuronen deutlich zu erkennenden DSB-Reparaturdefekts der beiden strahlensensitiven Genotypen, halten diese ein gewisses Maß an ionisierender Strahlung aus. Durch eine deutliche Abnahme der 53BP1-Foci innerhalb der ersten 24 h nach der Bestrahlung wird die Reparatur der induzierten DSBs deutlich. Dass auch nach einer Bestrahlung die Focizahlen in den SCID-Neuronen deutlich höher sind als in den $ATM^{-/-}$ -Neuronen, bestärkt die größere Bedeutung von DNA-PKcs für die DSB-Reparatur in den Neuronen weiter. Auch in den Funktionszellen anderer muriner Gewebe wird durch die Zahl der verbleibenden 53BP1-Foci nach einer Bestrahlung deutlich, dass DNA-PKcs wichtiger für die Reparatur von DSBs ist als ATM (Rübe *et al.*, 2008, 2010). Die Analyse der physikalischen Brüche in humanen Fibroblasten mittels PFGE demonstriert, dass DNA-PKcs-defiziente Zellen mehr unreparierte Brüche als ATM-defiziente Zellen behalten, während Wildtypzellen DSBs nahezu vollständig reparieren (Riballo *et al.*, 2004). Sowohl in den kortikalen Neuronen, als auch in anderen humanen und murinen Zellen ist DNA-PKcs also offensichtlich wichtiger für die Verknüpfung von DSBs als ATM.

Auch zu früheren Untersuchungszeitpunkten nach der Bestrahlung offenbaren die beiden untersuchten reparaturdefizienten Genotypen eindeutige Unterschiede in ihrem DSB-Reparaturverhalten. Während die SCID-Neurone 30 min nach der Bestrahlung im Vergleich zu Wildtypneuronen mehr Foci aufweisen, ist die Zahl in den $ATM^{-/-}$ -Neuronen deutlich geringer als in Wildtypzellen. Da die Induktion von DSBs aus physikalischer Sicht unabhängig vom Genotyp ist, sind diese unterschiedlichen Focizahlen vermutlich Ausdruck der unterschiedlich schnellen Prozessierung der induzierten Brüche. Aber auch eine verzögerte oder ausbleibende Markierung von Schäden könnte eine Ursache hierfür darstellen, da die DSBs mit dieser Methode nur indirekt über DSB-Markerproteine detektiert werden und nicht der physikalische Bruch selbst. Bei den hier untersuchten Reparaturdefekten spielen vermutlich beide Aspekte eine Rolle. Während in den reparaturdefizienten SCID-Neuronen die Schäden offensichtlich detektiert werden, scheint die Verknüpfung der Bruchenden durch ein defektes NHEJ deutlich eingeschränkt. Erkennbar wird dies auch durch die bedeutend langsamere Abnahme der 53BP1-Focizahl verglichen mit den C57BL/6- und den $ATM^{-/-}$ -Neuronen. Im Gegensatz hierzu spiegelt die geringe Zahl an 53BP1-Foci in den ATM-defizienten Neuronen kurze Zeit nach der Bestrahlung (30 min) aller Wahrscheinlichkeit nach eine verzögerte oder unvollständige focivermittelte Markierung der DSBs wider. Da die markierten Schäden innerhalb der ersten 5 h nach der Bestrahlung mit einer ähnlichen Kinetik wie in den reparaturprofizienten Neuronen abgebaut werden, wird die gestörte DSB-Reparatur durch ein stagnierendes 53BP1-Fociniveau erst zu späten Reparaturzeitpunkten klar sichtbar. Während sich das Fehlen von DNA-PKcs also offenbar durch eine generelle Beeinträchtigung der DSB-

Verknüpfung auf die Reparaturkinetik auswirkt, verursacht das Fehlen von ATM eine fehlerhafte Detektion und/oder Reparatur eines gewissen Teils von Brüchen.

Unterstützt wird diese Theorie durch Beobachtungen in primären Fibroblasten. Während in reparaturprofizienten primären Fibroblasten bereits innerhalb der ersten 15 min nach der Exposition mit 2 Gy Röntgenstrahlung die Zahl der induzierten γ H2AX-Foci deutlich absinkt, bleibt das γ H2AX-Fociniveau in Fibroblasten ohne funktionsfähige DNA-Ligase 4 (LIG4-Defekt) – einem anderen zentralen Protein des NHEJ – innerhalb dieser Zeit unverändert (Kühne *et al.*, 2004; Rothkamm und Löbrich, 2003). Erst später erfolgt auch in den LIG4-defizienten Zellen eine langsame Abnahme der γ H2AX-Focizahl (Kühne *et al.*, 2004; Rothkamm und Löbrich, 2003). Auch in ATM-defizienten Fibroblasten bzw. nach Inhibition von ATM ist die Zahl der markierten DSBs nach der Bestrahlung zunächst deutlich geringer ist als in Zellen mit aktivem ATM-Protein (Anderson *et al.*, 2001; Harding und Bristow, 2012; Kühne *et al.*, 2004; Riballo *et al.*, 2004). Der überwiegende Teil der detektierten Schäden wird von arretierten ATM-defizienten Fibroblasten dann mit einer gewöhnlichen Kinetik repariert, bis zu späteren Reparaturzeitpunkten der Rückgang der Foci stoppt (Kühne *et al.*, 2004). Während in den ATM-defizienten Fibroblasten auch über mehrere Tage (bis zu 14 Tage) nach der Bestrahlung eine weitere Abnahme ausbleibt, nimmt die Zahl der induzierten Foci in NHEJ-defizienten Fibroblasten mit einem LIG4-Defekt über diesen Zeitraum weiter stetig ab (Kühne *et al.*, 2004). Eine Verifizierung mittels PFGE beweist, dass die verbleibenden Foci tatsächlich unreparierte DSBs darstellen (Kühne *et al.*, 2004). Trotz einer nahezu vollständigen Reparatur in DNA-PKcs-defizienten Fibroblasten ist die Qualität der DSB-Reparatur deutlich schlechter als in ATM-defizienten Zellen. Während in ATM^{-/-}-Fibroblasten nur 2% der Schäden nicht korrekt verknüpft werden, sind es in NHEJ-defizienten 6x so viele (Kühne *et al.*, 2004). Zwischen ATM- und NHEJ-defizienten Zellen existieren also sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede in der DSB-Reparatur. Während NHEJ-defiziente Zellen Bruchenden zwar verknüpfen können, ist die Geschwindigkeit der Ligation reduziert und mit einer hohen Fehlerrate verbunden. ATM-defiziente Zellen können dagegen den Großteil der Brüche gut und schnell reparieren, allerdings bleibt ein Teil der Brüche unrepariert. Wie die hier erhobenen Daten zeigen, spiegelt sich dieser Unterschied auch in der DSB-Reparatur der kortikalen Neuronen deutlich wider.

DSB-Reparatur in Neuronen des jugendlichen Gehirns

Die Beobachtung, dass die Neurone der 0.5 Monate alten, reparaturprofizienten C57BL/6-Mäuse bereits 30 min nach der DSB-Induktion nur etwa die Hälfte der Foci der adulten Tiere aufweisen und die Reparatur bereits nach 5 h nahezu abgeschlossen ist, ist dagegen derzeit noch weitgehend unverstanden. Es ist unklar, ob die Reparatur der induzierten Brüche durch

bestimmte Prozesse im jugendlichen Gehirn tatsächlich signifikant schneller erfolgt als in erwachsenen Tieren oder ob ein Teil der Schäden lediglich 53BP1 unabhängig repariert wird. Da das Gehirn in diesem Alter noch starken Entwicklungsprozessen unterliegt, spielen hierbei vermutlich verschiedene Faktoren eine Rolle. Neben proliferierenden Zellen im Kortex könnte auch die Chromatinstruktur in diesem Entwicklungsstadium eine wichtige Rolle spielen. In den Neuronen des zerebralen Kortex von Ratten wurde gezeigt, dass die NHEJ-abhängige DSB-Prozessierung in jungen Tieren deutlich effizienter abläuft als in älteren Tieren (Sharma, 2007). Ähnlich zu den hier gemachten Beobachtungen fanden Ren und Peña de Ortiz, dass die NHEJ-Aktivität im Rattenhirn kurze Zeit nach der Geburt (ein bis sechs Tage) sehr gering ist, während sie dagegen zwölf Tage nach der Geburt sehr hoch ist und anschließend langsam abnimmt (Ren und Peña de Ortiz, 2002). Um die Reparatur und deren Einflussfaktoren im sich noch in der Entwicklung befindenden Gehirn genauer zu verstehen und beurteilen zu können, sind zukünftig allerdings weitergehende Untersuchungen notwendig.

DSB-Reparatur nach Niedrigdosisbestrahlung

Während die Auswirkungen therapeutischer Strahlendosen auf Normalgewebe in den vergangenen Jahren intensiv untersucht wurden, sind die Auswirkungen niedriger Strahlendosen im mGy-Bereich derzeit kaum bekannt. Ein Verständnis der Effekte solcher niedrigen Strahlendosen auf gesundes Gewebe – auch nach wiederholter Exposition – gewinnt in der heutigen Zeit jedoch immer mehr an Relevanz. Durch die Entwicklung neuer hochkonformaler Bestrahlungstechniken in der Strahlentherapie, wie der IMRT, kommt es beispielsweise während einer Tumorthherapie zur Belastung großer Normalgewebsvolumina mit niedrigen Dosen (Wannenmacher *et al.*, 2013). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Mausgenotypen (Wildtyp, ATM-defizient und DNA-PKcs-defizient) inklusive heterozygoter ATM^{+/-}-Mäuse einmalig oder fraktioniert mit niedrigen (100 mGy) bzw. sehr niedrigen (10 mGy) Dosen bestrahlt und die Auswirkungen durch das Quantifizieren der verbleibenden 53BP1-Foci untersucht.

Beide Dosen zeigen die Induktion von DNA-Schäden zu frühen Zeitpunkten nach einmaliger Exposition. Die geringere Zahl an 53BP1-Foci 5 min nach der Bestrahlung im Vergleich zu 30 min nach der Bestrahlung liegt im Einklang mit der aus der Literatur bekannten verzögerten 53BP1-Fociausbildung im Vergleich zu γ H2AX oder MDC1 (Bekker-Jensen *et al.*, 2005). Die maximale Anzahl an 53BP1-Foci wird erst 15-30 min nach der Exposition erreicht (Schultz *et al.*, 2000).

Wie auch nach der Exposition mit 2 Gy zeigen die untersuchten Genotypen kurze Zeit (30 min) nach der einmaligen Exposition mit einer niedrigen Strahlendosis (10 mGy und 100 mGy) deutliche Unterschiede in den 53BP1-Focizahlen. Entsprechend der Exposition

mit 2 Gy weisen die ATM^{-/-}-Neuronen auch nach der Exposition mit niedrigen Dosen eine gestörte Detektion der induzierten Schäden auf. Während sich das Ausbleiben bzw. die eventuell verzögerte Markierung von Brüchen durch 53BP1 nach der Bestrahlung mit 2 Gy noch vergleichsweise moderat darstellt, scheint das Fehlen der Proteinkinase ATM bei niedrigeren Dosen nochmals relevanter für die initiale Erkennung der Schäden zu sein. Während die Zahl der Foci nach der Exposition mit 100 mGy zwar nur gering aber dennoch signifikant ansteigt, bleibt eine Zunahme der 53BP1-Foci im Vergleich zu unbestrahlten Zellen nach der Exposition mit 10 mGy ganz aus. Da alle anderen Genotypen einen Anstieg der 53BP1-Focizahlen zeigen, ist die ausbleibende Zunahme der 53BP1-Foci in den ATM^{-/-}-Neuronen offenbar eine direkte Konsequenz des ATM-Mangels. Der Einfluss des ATM-Gehalts auf die Erkennung und die Markierung von DSBs wird auch durch eine geringere 53BP1-Focizahl in den heterozygoten ATM-Neuronen widerspiegelt (ATM^{+/+} > ATM^{+/-} > ATM^{-/-}). Das hohe Fociniveau in den SCID-Neuronen nach der Exposition mit 100 mGy bestätigt weiter, dass der Reparaturdefekt durch das Fehlen von DNA-PKcs nicht in der Schadenserkennung, sondern in der Religation der Bruchenden liegt. Die individuellen Unterschiede in Detektion und Reparatur von strahleninduzierten Schäden in den kortikalen Neuronen der beiden reparaturdefizienten Mausstämmen (ATM^{-/-} und SCID) finden sich also auch nach einer Exposition mit niedrigen Dosen wieder.

Die Reparatur des Hauptteils der durch die Niedrigdosisbestrahlung induzierten Schäden erfolgt innerhalb von 24 h nach der Exposition. Die weitere generelle Abnahme der 53BP1-Focizahlen bis 72 h nach der Exposition mit 100 mGy – im Gegensatz zur Exposition mit 10 mGy – demonstriert, dass die Prozessierung der durch 100 mGy induzierten Schäden nach 24 h noch nicht abgeschlossen ist. Dies könnte Ausdruck eines längeren Zeitbedarfs für die Reparatur der größeren Anzahl an Brüchen sein oder ein Indiz dafür, dass die Zahl der Brüche, die eine aufwendigere DNA-Schadensantwort benötigen bei dieser Dosis deutlich höher ist.

Nach der fraktionierten Bestrahlung kommt es mit zunehmender kumulativer Dosis – bei beiden Dosen – zu einer stetigen Akkumulation von 53BP1-Foci. Dies trifft insbesondere auf die reparaturprofizienten C57BL/6-Neurone zu, die mit bis zu 50 Fraktionen die höchste Anzahl an Fraktionen erhielten (kumulative Dosen von 0.5 Gy bzw. 5 Gy). Alle anderen untersuchten Genotypen weisen überwiegend ähnliche Tendenzen auf, wenn auch in unterschiedlichen Ausmaßen. Lediglich die reparaturprofizienten ATM-Wildtypneurone (ATM^{+/+}) zeigen als einziger untersuchter Genotyp nicht die Tendenz einer stetigen Zunahme an 53BP1-Foci mit steigender kumulativer Dosis. Die ATM-Wildtypmäuse wurden zwar nur mit bis zu maximal 40 Fraktionen bestrahlt, allerdings wäre auch hier – im Vergleich zu den Ergebnissen der C57BL/6-Wildtypneurone – ein deutlicher Anstieg zu vermuten gewesen. Individuelle genetische Hintergründe spielen also offenbar auch in reparaturprofizienten

Wildtypieren eine wichtige Rolle bei der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden. Diese Annahme wird auch durch signifikante Unterschiede in den frühen 53BP1-Focizahlen nach der einmaligen Exposition mit 10 mGy bzw. 100 mGy unterstützt.

Auch in anderen sich nicht oder nur langsam reproduzierenden gewebespezifischen Funktionszellen wurde nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung eine Akkumulation von 53BP1-Foci beobachtet. Sowohl die Kardiomyozyten im Herz, als auch die Alveolarzellen und die Bronchiolarzellen der Lunge akkumulieren im Laufe einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung mit 10 mGy oder 100 mGy 53BP1-Foci (Flockerzi *et al.*, 2014; noch nicht veröffentlichte Daten). Die genotypabhängigen Unterschiede in diesen Zellen sind denen der Neurone dabei sehr ähnlich (Flockerzi *et al.*, 2014). Reparaturprofiziente Normalgewebe mit einem höheren Zellumsatz zeigen dagegen keine einheitlichen Tendenzen. Während sich schnell erneuernde Enterozyten im Darm keine oder nur wenige Foci akkumulieren, weisen die sich langsamer erneuernden Keratinozyten der Haut nach 100 mGy-Fractionen ein konstantes, aber signifikant höheres Fociniveau als unbestrahlte Zellen auf (Schanz *et al.*, 2012; Schuler und Rube, 2013). Nach der fraktionierten Bestrahlung mit 10 mGy zeigen die Keratinozyten dagegen eine langsame Zunahme der 53BP1-Foci (Schanz *et al.*, 2012; Schuler und Rube, 2013). Auch im Thymus bewirkt eine fraktionierte Bestrahlung mit Dosen à 50 mGy eine Akkumulation von γ H2AX-Foci (Pogribny *et al.*, 2005). Die Erneuerungsrate eines Zelltyps spiegelt sich also anscheinend in der Akkumulation von 53BP1-Foci wider. Je langsamer sich Zellen erneuern, desto mehr Foci akkumulieren sie. Dies erklärt die Schadensakkumulation in den Neuronen, die ein Leben lang erhalten bleiben.

Ungeachtet der Fociakkumulation zeigen die niedrigeren Focizahlen in den reparaturdefizienten Neuronen (ATM^{-/-} und SCID) nach der fraktionierten Applikation von 2 Gy (20x 100 mGy) – im Gegensatz zur einmaligen Applikation der Gesamtdosis – eine deutlich bessere Verträglichkeit einer fraktionierten Bestrahlung. Dieser positive Effekt durch die Fraktionierung ist in den C57BL/6-Neuronen dagegen kaum zu beobachten. Da die Zahl der Foci 24 h nach der letzten Fraktion – im Gegensatz zu einmalig 2 Gy – allerdings noch signifikant abnimmt, könnte sich dieser Effekt zu späteren – bisher noch nicht untersuchten – Reparaturzeitpunkten manifestieren. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass fünf Wochen nach der letzten 100 mGy-Fraktion kein signifikanter Unterschied mehr zu den unbestrahlten Neuronen besteht. Die weitere Prozessierung der induzierten Schäden (> 72 h) bewirkt also den Abbau der im Laufe der fraktionierten 100 mGy-Bestrahlung akkumulierten Foci. Ob die durch 10 mGy-Fractionen induzierte Akkumulation dauerhaft erhalten bleibt oder auch hier langfristig ein Abbau erfolgt, ist derzeit noch nicht untersucht. Da eine Abnahme von 24 h auf 72 h jedoch ausbleibt, scheint ein langfristiger Erhalt der markierten Schäden wahrscheinlich. Um das langfristige Verhalten der 53BP1-Foci eindeutig

beurteilen zu können, steht allerdings auch hier weiterhin die Untersuchung späterer Reparaturzeitpunkte aus. Auch eine mögliche biologische Bedeutung der Fociakkumulation werden einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung ist derzeit noch unklar.

Ursache und Bedeutung unterschiedlich großer 53BP1-Foci

Neben unterschiedlichen 53BP1-Focizahlen sind zu späten Zeitpunkten (≥ 24 h) nach der Bestrahlung deutliche Unterschiede in den 53BP1-Focigrößen aufgefallen. Auch in den unbestrahlten Neuronen der reparaturdefizienten $ATM^{-/-}$ - und SCID-Mäuse sind diese besonders großen 53BP1-Foci aufgetreten. Ein gewöhnlicher 53BP1-Focus, wie er zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung auftritt, hat durchschnittlich einen Durchmesser von etwa 1 μm . Je nach Genotyp, Dosis und Untersuchungszeitpunkt zeigen die Neurone zusätzlich unterschiedliche Anteile deutlich größerer 53BP1-Foci. Harrigan *et al.* und Lukas *et al.* beschreiben in unbehandelten humanen Zelllinien ebenfalls das Auftreten von 53BP1-Foci mit einem Durchmesser von 2-3 μm , die sie als 53BP1-Nuclearbodies bezeichnen (Harrigan *et al.*, 2011; Lukas *et al.*, 2011a). Rodier *et al.* beobachteten das Auftreten von besonders großen 53BP1-Foci nach der Bestrahlung mit hohen Einzeldosen (8-10 Gy; Rodier *et al.*, 2011). Analog zu den Ergebnissen in den kortikalen Neuronen im Rahmen dieser Arbeit fanden Rodier *et al.* zu frühen Zeitpunkten nach der Bestrahlung ausschließlich kleine 53BP1-Foci. Ab 24 h nach der Bestrahlung war dann ein Teil der 53BP1-Foci erheblich größer als zu früheren Zeitpunkten (< 24 h). Diese entdeckten sie sowohl *in vitro* in humanen Zelllinien, als auch in Mauszellen (*in vitro* und *in vivo*; Rodier *et al.*, 2011).

Die fraktionierte Bestrahlung mit Fraktionen à 100 mGy verursacht in kortikalen Neuronen mit einer eingeschränkten DSB-Reparatur ($ATM^{+/+}$, $ATM^{-/-}$ und SCID) neben der Akkumulation von 53BP1-Foci auch eine stetige Zunahme an überdurchschnittlich großen Foci (≥ 2 μm) mit zunehmender kumulativer Dosis. Da die verbleibenden Foci mit fortschreitender Reparaturzeit größer werden, stehen die großen 53BP1-Foci nicht nur mit der kumulativen Dosis und einer eingeschränkten DNA-Reparatur in Verbindung, sondern auch mit der Reparaturzeit.

Die Relevanz der Dosis innerhalb eines Genotyps spiegelt sich auch nach der einmaligen Bestrahlung mit einer hohen Dosis (6 Gy) im Vergleich zur fraktionierten Bestrahlung mit 100 mGy wider. Während die fraktionierte 100 mGy-Bestrahlung in den reparaturdefizienten SCID-Neuronen eine zunehmende 53BP1-Focigröße bewirkt, ist dies nach der einmaligen Exposition mit einer hohen Dosis (6 Gy) nicht bzw. nur vereinzelt zu beobachten. Ob dies zu späteren Zeitpunkten noch auftreten würde, konnte aufgrund des Reparaturdefekts und der hohen Dosis nicht untersucht werden. Der Einfluss der Bestrahlungsvariante und -dosis wird außerdem dadurch deutlich, dass die $ATM^{-/-}$ -Neurone nach der einmaligen Bestrahlung mit 6 Gy weniger große 53BP1-Foci aufweisen als die reparaturprofizienten C57BL/6-Neurone,

während der Anteil nach fraktionierter 100 mGy-Bestrahlung in den ATM^{-/-}-Neuronen mit Abstand am größten ist. Die reparaturprofizienten ATM^{+/+}-Wildtypneurone weisen dagegen nach einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung den geringsten Anteil an großen Foci auf. Auch Lukas *et al.* und Harrigan *et al.* beschreiben, dass durch Inhibition oder Fehlen der Proteinkinase ATM die 53BP1-*Nuclearbodies* eine geringere Größe und Anzahl aufweisen (Harrigan *et al.*, 2011; Lukas *et al.*, 2011a). Obwohl derzeit noch unklar ist, welche Rolle ATM bei der Bildung der 53BP1-*Nuclearbodies* spielt, untermauern diese Beobachtungen, dass es eine Funktion gibt. Ebenso wie frühe 53BP1-Foci kolokalisieren die 53BP1-*Nuclearbodies* mit anderen Reparaturfaktoren der DSB-Reparatur wie z.B. γ H2AX (Harrigan *et al.*, 2011; Lukas *et al.*, 2011a; Rodier *et al.*, 2011), wie auch hier in den kortikalen Neuronen für γ H2AX beobachtet. Obgleich andere Reparaturproteine anscheinend einen Einfluss auf die Bildung der 53BP1-*Nuclearbodies* haben, scheinen sie dennoch nicht essenziell für deren Ausbildung zu sein.

Welche Bedeutung die 53BP1-*Nuclearbodies* für eine Zelle genau haben, bleibt derzeit noch Spekulation. Da in den vergangenen Jahren eine chromatinvermittelte Rolle von 53BP1 immer deutlicher wurde (Botuyan *et al.*, 2006; Fradet-Turcotte *et al.*, 2013; Hartlerode *et al.*, 2012; Hsiao und Mizzen, 2013; Huyen *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2013), könnten sie eine spezielle Funktion im Rahmen einer epigenetischen Markierung z.B. von komplexen oder kritischen Schäden ausüben. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung von Lukas *et al.* und Harrigan *et al.*, die eine starke Assoziation der 53BP1-*Nuclearbodies* mit G₀/G₁-Phasezellen nachgewiesen haben. Während die 53BP1-*Nuclearbodies* in der S- und G₂-Phase verloren gehen, bilden sie sich nach der Teilung – bezüglich Anzahl und teilweise Lokalisation – in beiden Tochterzellen wieder symmetrisch aus (Harrigan *et al.*, 2011; Lukas *et al.*, 2011a). Dabei lässt sich das Verschwinden nicht darauf zurückführen, dass die Zellen nicht fähig sind, 53BP1-Foci während der S-/G₂-Phase auszubilden, da Bestrahlung auch in proliferierenden Zellen während der S-/G₂-Phase 53BP1-Foci induziert (Lukas *et al.*, 2011a). 53BP1-*Nuclearbodies* scheinen also in enger Verbindung mit dem normalen Zellhaushalt und der Chromatinstruktur einer sich nicht reproduzierenden Zelle zu stehen. Zwar kann ein zellzyklusabhängiges Verhalten der 53BP1-*Nuclearbodies* in ausdifferenzierten kortikalen Neuronen nicht beurteilt werden, jedoch gerade weil es sich bei ihnen um G₀-Phase Zellen handelt, untermauert das den Bezug dieser 53BP1-Strukturen zu nicht proliferierenden Zellen. Auch Rodier *et al.* interpretieren die späten, großen 53BP1-„Foci“ als persistierende Chromatinveränderungen, die beispielsweise komplexe Schäden markieren, während die kleinen transienten 53BP1-Foci zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung reparable DNA-Läsionen kennzeichnen (Rodier *et al.*, 2011). So markieren die 53BP1-*Nuclearbodies*, die in den unbestrahlten Neuronen der reparaturdefizienten ATM^{-/-}- und SCID-Mäuse auftreten, möglicherweise keine unreparierten DSBs, sondern bilden eher epigenetische Markierungen

im Chromatin von schlecht oder unzureichend reparierten DNA-Schäden. So könnte beispielweise die Transkription geschädigter Gene in dieser Region zum Schutz der Zelle dauerhaft stillgelegt werden. Tatsächlich scheint es sich bei den 53BP1-*Nuclearbodies* um Regionen mit einer niedrigeren Transkriptionsrate zu handeln (Harrigan *et al.*, 2011).

Welchen Effekt die wiederholte Exposition mit niedrigen Dosen im Vergleich zu einer einmalig applizierten hohen Dosis auf die Integrität der Chromatinstruktur genau hat, kann an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch scheint es sowohl in den reparaturprofizienten als auch in den reparaturdefizienten Neuronen unterschiedliche Folgen zu haben. Ein „protektiver Effekt“ der Fraktionierung im Gegensatz zur einmaligen Applikation einer hohen Dosis könnte sich auch epigenetisch in der chromatinvermittelten DNA-Schadensantwort darstellen. Die beiden unterschiedlichen Bestrahlungsvarianten und das daraus resultierende Schadensmuster sowie dessen Reparatur scheinen zumindest relevant für die Ausbildung der 53BP1-*Nuclearbodies* zu sein. Auch die Reparaturkinasen ATM und DNA-PKcs spielen hierbei offenbar eine wichtige Rolle in den Neuronen, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen.

5.2 Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden im Kontext des Chromatins

Um die chromatinabhängige DNA-Schadensantwort in reparaturprofizienten und reparaturdefizienten kortikalen Neuronen genauer zu charakterisieren, wurde insbesondere die elektronenmikroskopische Analyse eingesetzt. Diese Methode ermöglicht eine detaillierte Darstellung der Chromatinstruktur im Zellkern und eine separate Auswertung von Schäden in euchromatischen oder heterochromatischen Chromatinstrukturen durch die Unterscheidung von HC (dunklere Bereiche, da hohe Elektronendichte) und EC (helle Bereiche, da geringe Elektronendichte). Durch die hohe Auflösung der Methode ermöglicht sie außerdem die Untersuchung der zentralen Proteine des NHEJ, deren Darstellung aufgrund ihrer geringen Zahl pro DSB in der IFM nicht möglich ist (Lorat *et al.*, 2012; Rube *et al.*, 2011).

Erkenntnisse zur chromatinabhängigen DNA-Schadensantwort in kortikalen Neuronen durch die Transmissionselektronenmikroskopie

Den initialen Schritt des NHEJ bildet die Bindung der ringförmigen Ku70/Ku80-Heterodimere an die DSB-Bruchenden, wodurch diese stabilisiert und in räumlicher Nähe gehalten werden. Durch ihre hohe sequenzunabhängige Affinität zu freien DNA-Enden binden sie schnell an die Bruchenden und schützen sie vor einer evtl. unspezifischen Prozessierung (Cary *et al.*, 1997). Da zur Charakterisierung der NHEJ-abhängigen DSB-Reparatur an der DSB-Prozessierung beteiligtes Protein vom übrigen Ku70-Protein abgegrenzt werden muss, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Ku70-Antikörper verwendet, der spezifisch die

phosphorylierte Ku70-Untereinheit (pKu70) des KU-Heterodimers detektiert. Die Phosphorylierung von Ku70 erfolgt durch die Proteinkinase DNA-PKcs nach deren Bindung an den KU-Komplex (Chan *et al.*, 1999; Douglas *et al.*, 2005) und bleibt über den gesamten Reparaturprozess bis zur Ablösung der Proteine vom reparierten Schaden erhalten (Mahaney *et al.*, 2009). Aus diesem Grund bietet diese post-translationale Modifikation eine gut geeignete Möglichkeit, spezifisch das an DSBs lokalisierte Ku70-Protein zu markieren. Der Bruch wird im TEM durch zwei Goldpartikel mit annähernd konstantem Abstand markiert, welche die beiden Ku70-Untereinheiten am Bruch detektieren. Die während dieser Arbeit in den reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen gefundene schnelle euchromatische pKu70-Kinetik, bei der 30 min nach der Bestrahlung im EC nur noch 15% des maximalen pKu70-Werts detektiert werden, demonstriert, dass gut zugängliche Brüche durch die wenigen Prozessierungsschritte mittels NHEJ sehr schnell repariert werden. Auch PFGE-Untersuchungen, welche die physikalischen Brüche nachweisen, zeigen trotz der Applikation sehr hoher Strahlendosen, dass nach 30 min bereits die Hälfte der induzierten DSBs repariert ist (Kinner *et al.*, 2008). Dem gegenüber steht eine Zunahme der 53BP1-Foci innerhalb dieser Zeit in der IFM. Auch in der Elektronenmikroskopie findet sich in dieser Zeit ein Anstieg der 53BP1-Cluster. Durch die eindeutige Identifizierung der Lokalisation von 53BP1 im HC, die sich in der IFM nicht beurteilen lässt, liefern die TEM-Untersuchungen die Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtungen. Wie durch die pKu70-Identifikation gezeigt werden kann, markiert 53BP1 nur die heterochromatischen DSBs. Die deutlich langsamer verlaufende pKu70-vermittelte Detektion und Reparatur der heterochromatischen Brüche macht die „natürliche“ Barriere der Chromatinstruktur für die Reparatur von DSBs deutlich. Die Erreichbarkeit der Bruchenden für die Reparaturfaktoren scheint im dicht gepackten HC also erst durch Öffnung oder Lockerung der Chromatinstruktur geschaffen werden zu müssen, bevor eine Religation des Bruchs erfolgen kann. Diese Hypothese wird auch von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen unterstützt (Jakob *et al.*, 2011; Kruhlak *et al.*, 2006; Murga *et al.*, 2007).

Die einmaligen Möglichkeiten der Elektronenmikroskopie, Kernkomponenten des NHEJ und DSB-Reparaturfaktoren im Kontext der Chromatinstruktur darzustellen, erlauben es im Vergleich zur IFM, die DSB-Reparatur detaillierter zu charakterisieren. Außerdem liefern die elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Erklärung für die Diskrepanzen zwischen PFGE und IFM. Während die PFGE durch die physikalisch-chemische Analyse den Nachweis aller DSBs gewährleistet, zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass die 53BP1-Focianalysen in der IFM nur bestimmte Schäden detektieren. Die Untersuchung der DSB-Reparatur mittels TEM ermöglicht es also, nicht nur die Stärken der PFGE- und IFM-Analysen zu vereinigen und deren Nachteile zu kompensieren, sondern auch die DSB-Reparatur in euchromatische und heterochromatische Komponenten zu trennen.

Die genaue Funktion der foci bildenden Reparaturfaktoren war lange Zeit unklar. Entsprechend neuerer Erkenntnisse übernehmen die in der Fluoreszenz darstellbaren foci bildenden Histonmodifikationen und Reparaturproteine (γ H2AX, 53BP1, MDC1, ATM etc.) eine Mediatorfunktion in einer komplexen Signaltransduktionskaskade zur Erkennung und Freilegung von DSBs im kompakten HC durch Lockern der Chromatinstruktur. Sie bilden also keine Komponenten der eigentlichen DNA-Strang-Verknüpfung, sondern sind vielmehr Teil der epigenetischen Regulation der Chromatinstruktur (Bekker-Jensen und Mailand, 2010; Goodarzi und Jeggo, 2012; Lukas *et al.*, 2011b). Durch die Beobachtung, dass 53BP1-Cluster ausschließlich mit heterochromatischen pKu70-Clustern assoziiert sind und nicht mit euchromatischem pKu70 kolokalisieren, wird diese Hypothese weiter untermauert. Auch der Aspekt, dass die 53BP1-Cluster in den kortikalen Neuronen ausschließlich in heterochromatischen Randbereichen zu detektierten sind und die 53BP1-Foci in der IFM überwiegend an der Kernlamina, an der viel HC lokalisiert ist, oder am Rand von heterochromatischen Chromozentren beobachtet werden, spricht dafür, dass 53BP1 nur eine Komponente der heterochromatischen DNA-Schadensantwort ist. Auch für die foci bildenden Reparaturfaktoren γ H2AX und MDC1 zeigte unsere Arbeitsgruppe bereits, dass diese ausschließlich in heterochromatischen Regionen detektiert werden (Rübe *et al.*, 2011).

Die zu späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung (≥ 24 h) im dichten HC (konstitutives HC) gefundenen großen 53BP1-Cluster (53BP1-Großcluster) aus mehr als 10 Goldpartikeln, welche im Gegensatz zu den kleineren 53BP1-Clustern aus 3-9 Goldpartikeln nicht mehr mit pKu70 kolokalisieren, stellen vermutlich keine aktiv prozessierten Schäden mehr dar. Die in der IFM detektierten großen 53BP1-Foci (53BP1-*Nuclearbodies*) und die 53BP1-Großcluster markieren vermutlich dieselben Strukturen. Dass diese Schäden keine aktive Prozessierung durch NHEJ mehr zeigen, festigt weiter die Vermutung, dass es sich hierbei um eine andere Art von Schadensmarkierung handelt. So wird eine persistierende epigenetische 53BP1-Markierung kritischer DNA-Schäden zum Schutz der Zellintegrität nach der Prozessierung immer naheliegender. Dennoch ist die genaue biologische Konsequenz dieser 53BP1-Strukturen derzeit noch nicht eindeutig geklärt.

Die Bedeutung der mit fortschreitender Reparaturzeit in heterochromatischen Regionen auftretenden pKu70-Großcluster (4er und ≥ 6 er Cluster) ist derzeit noch weitgehend unklar. Sie könnten mehrere Brüche markieren, die in direkter räumlicher Nähe im dichten HC aufgetreten sind und mit fortschreitender Reparaturzeit freigelegt werden, oder aber sog. Reparaturzentren darstellen, in denen eine Ansammlung von DSBs durch dynamische Prozesse erfolgt (Aten *et al.*, 2004; Kruhlak *et al.*, 2006; Murga *et al.*, 2007). Auch eine ATP-unabhängige Translokation der KU-Heterodimere auf den DNA-Strängen könnte eine Aufreihung von mehreren KU-Dimeren auf den beiden DNA-Strängen bewirken (Paillard und Strauss, 1991). Die ausschließlich in euchromatischen Bereichen der reparaturprofizienten

C57BL/6-Neurone gefundenen pKu70-Einzelbeads sind vermutlich Ausdruck einer unsymmetrischen Ablösung der KU-Moleküle vom reparierten Bruch. Da für die Religation der DSBs aller Wahrscheinlichkeit nach eine offene euchromatische Struktur erzeugt wird, müssen die gebundenen Reparaturfaktoren von der DNA gelöst werden, bevor die ursprüngliche Chromatinkonfiguration wieder hergestellt werden kann. Die Bedeutung der in den reparaturdefizienten ATM^{-/-}-Neuronen erstmals auch in heterochromatischen Bereichen auftretenden pKu70-Einzelbeads sowie deren hohe Zahl (sowohl im EC als auch insbesondere im HC) bleibt derzeit noch fraglich. Da ATM-defizienten Zellen insbesondere ein heterochromatischer Reparaturdefekt zugeschrieben wird (Goodarzi *et al.*, 2008; Ziv *et al.*, 2006), könnte dies ein Zeichen einer unvollständigen Entfaltung des HC und einer im nicht ganz entfalteten HC erfolgenden Reparatur – sofern möglich – sein. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass die Phosphorylierung (z.B. aus sterischen Gründen) gehemmt ist und daher nur teilweise erfolgt. Geht man davon aus, dass die einzelnen pKu70-Beads die Ablösung der Reparaturfaktoren vom reparierten Bruch darstellen, könnte der sehr geringe Anteil einzelner pKu70-Beads in den SCID-Neuronen (< 5%) die gehemmte Ligation der Bruchenden widerspiegeln. Dies würde die Ansicht, dass der Defekt in den SCID-Neuronen erst in den letzten Schritten der Reparatur zum Tragen kommt, weiter unterstützen. Auch die Beobachtung, dass sich die pKu70-Kinetik der SCID-Neurone – außer durch den geringen Anteil an einzelnen pKu70-Beads – nur durch ihr höheres pKu70-Niveau von den reparaturprofizienten C57BL/6-Neuronen unterscheidet, spricht für die Theorie einer gestörten End-zu-End-Verknüpfung in Abwesenheit der NHEJ-Kernkomponente DNA-PKcs.

Zusammengefasst unterstützen die Daten der pKu70-Analyse die Hypothese, dass das Fehlen von ATM am Anfang der Reparaturkaskade Störungen in der Detektion und Freilegung heterochromatischer DSBs verursacht, während das Fehlen von DNA-PKcs erst bei der Verknüpfung der Bruchenden zu Problemen führt. Auf welchem Weg die Reparatur der DSBs ohne DNA-PKcs dann letztendlich vermittelt wird, kann bisher nicht erklärt werden. Da pKu70 nachgewiesen wurde, scheint eine Reparatur über das C-NHEJ in den Mausneuronen auch ohne DNA-PKcs mit einer verlangsamten Kinetik möglich zu sein. Die Phosphorylierung von pKu70 könnte beispielsweise durch eine der Proteinkinasen ATM oder ATR übernommen werden, da die PIKKs sich in ihren Funktionen teilweise unterstützen und/oder ersetzen können, falls die Hauptkinase fehlt (z.B. bei der Phosphorylierung von H2AX oder 53BP1; Harding und Bristow, 2012; Stiff *et al.*, 2004). Die finale Verknüpfung könnte auf diesem Weg auch ohne funktionsfähiges DNA-PKcs vermittelt werden. Auch ein „Switch“ zum A-NHEJ wäre denkbar. Da dieses nach bisherigem Wissensstand allerdings pKu70-unabhängig verläuft, bleibt die Funktion der pKu70-Cluster in diesem Fall unklar. Um

diesen Aspekt genauer zu beleuchten und zu charakterisieren, müssen in zukünftigen Experimenten noch weitere potenziell beteiligte Reparaturfaktoren untersucht werden.

DNA-Schadensabhängige Chromatinöffnung durch spezifische post-translationale Histonmodifikationen

Bevor es zu einer Religation der DNA-Bruchenden kommen kann, muss der Schaden zunächst im Kontext der aktuellen Chromatinstruktur erkannt und prozessiert worden sein. Insbesondere die dicht gepackten heterochromatischen Bereiche des Chromatins bilden hierbei zunächst eine natürliche Barriere für die Anlagerung von Reparaturfaktoren an einen Bruch. Um die Bruchenden wieder miteinander zu verknüpfen, muss diese natürliche Barriere also zunächst – z.B. durch Öffnen oder Lockern der Chromatinstruktur – überwunden werden. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche post-translatorische Histonmodifikationen und chromatinbindende Faktoren identifiziert, die an der Vermittlung der chromatinabhängigen DNA-Schadensantwort beteiligt sind. Die vermutlich bekannteste post-translatorische Histonmodifikation γ H2AX wird in Folge eines DSBs über einen weiten Bereich auf beiden Seiten des Bruchs durch ATM oder DNA-PKcs phosphoryliert (Burma *et al.*, 2001; Rogakou *et al.*, 1998, 1999; Stiff *et al.*, 2004). Sie dient vermutlich als Ankerstelle für andere chromatinassoziierte Reparaturfaktoren wie z.B. MDC1 (Lou *et al.*, 2006; Stucki *et al.*, 2005) und hat sowie andere Phosphorylierungen vermutlich einen indirekten Einfluss auf die Chromatinkonfiguration (Misri *et al.*, 2008; Xu und Price, 2011). Die Acetylierung von Histonen ist dagegen eine Histonmodifikation, die direkt mit der Öffnung des Chromatins in Verbindung steht (Misri *et al.*, 2008; Xu und Price, 2011). Eine enge Verbindung der Acetylierung von verschiedenen Lysinen, sowohl in den Histonen (Bird *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2005; Murr *et al.*, 2006; Tamburini und Tyler, 2005), als auch in Nicht-Histonproteinen (z.B. p53, ATM, DNA-PKcs und Ku70; Chen *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2005, 2007; Sykes *et al.*, 2006), ist im Zusammenhang mit einer DNA-Schadensantwort in den letzten Jahren immer offensichtlicher geworden. Dabei scheint vor allem die Acetylierung von Histon H4 eine essenzielle Rolle zu spielen (Bird *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2010; Murr *et al.*, 2006; Ogiwara *et al.*, 2011; Tamburini und Tyler, 2005), insbesondere an Lysin 16 (Gupta *et al.*, 2005, 2008; Hajji *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Taipale *et al.*, 2005). Durch die besonders wichtige Rolle des N-Terminus von Histon H4 – speziell AS 14-23 – für die Chromatinfaltung (Dorigo *et al.*, 2003; Luger *et al.*, 1997) und die Hyperacetylierung von Histontermini (> 6 Ac/Oktamer), welche die Faltung in die kompakten 30 nm-Chromatinfiber verhindert (Tse *et al.*, 1998), wird die Theorie einer H4K16ac-abhängigen Chromatinöffnung zur DSB-Reparatur bekräftigt. Die Faltung in die kompakten 30 nm-Chromatinfiber und die Möglichkeit des Chromatins „Cross-Fibers“ zu bilden, kann alleine durch die Acetylierung von H4K16 verhindert werden (Shogren-Knaak *et*

al., 2006). Der Verlust von H4K16ac stellt außerdem ein gängiges Kennzeichen von Tumorzellen dar (Fraga *et al.*, 2005). Aus diesem Grund untermauert der im Rahmen dieser Arbeit gefundene Anstieg an H4K16ac kurze Zeit nach der Bestrahlung (5-30 min) eine schnelle Öffnung des Chromatins in den kortikalen Neuronen nach einer DSB-Induktion, wodurch das Anlagern der Reparaturproteine ermöglicht wird. Nach Abschluss der DSB-Reparatur kommt es dann durch Deacetylierung von H4K16ac wieder zur Herstellung des ursprünglichen H4K16ac-Gehalts und der ursprünglichen Chromatinkonfiguration. Unterstützt wird diese Theorie durch die Resultate von Gupta *et al.* in humanen Fibroblasten sowie von Li *et al.* in embryonalen Mausfibroblasten (MEFs), die eine Zunahme an H4K16ac innerhalb der ersten Stunde nach der Exposition mit ionisierender Strahlung beobachten (Gupta *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010). Werden DSBs dagegen chemisch mit Bleomycin oder enzymatisch über eine I-Sec-Schnittstelle induziert, kommt es in einer Vielzahl humaner Zelltypen zunächst zu einer Abnahme der Menge an H4K16ac, bis zu späteren Zeitpunkten wieder eine Zunahme erfolgt (Hsiao und Mizzen, 2013; Miller *et al.*, 2010). Auch nach einer Laser-Mikrobeam-Bestrahlung kommt es zu einem derartigen 2-phasigen Prozess (Miller *et al.*, 2010). Die Ursache für diese unterschiedlichen Beobachtungen resultiert wahrscheinlich aus den anders gearteten Methoden zur DSB-Induktion. Denn sowohl Chemotherapeutika als auch Enzyme sind – im Gegensatz zu ionisierender Strahlung – über einen längeren Zeitraum aktiv und induzieren daher ständig neue Schäden. Außerdem können sie die DNA nur an sterisch zugänglichen Bereichen schädigen, während ionisierende Strahlung überall DSBs induzieren kann.

Wie die eigenen Ergebnisse für die kortikalen Neuronen zeigen, scheint die Acetylierung von Lysin 9 in Histon H3 (H3K9) für die Reparatur strahleninduzierter DSB nicht relevant zu sein. Obgleich Tjeertes *et al.* bei einem groß angelegten Screening zur Identifikation von Veränderungen in verschiedenen Histonmodifikationen nach DSB-Induktion eine Abnahme der Acetylierung von H3K9 und K56 fanden, wurde während dieser Arbeit zu keinem Zeitpunkt eine Änderung im H3K9ac-Gehalt in den kortikalen Neuronen der Maus nach der Bestrahlung mit 6 Gy beobachtet. Der von Tjeertes *et al.* gefundene Effekt war nach der Bestrahlung mit einer hohen Dosis ionisierender Strahlung (15 Gy) – im Gegensatz zur chemischen Induktion mit Phleomycin oder Methylmethansulfonat – allerdings nur sehr schwach (Tjeertes *et al.*, 2009). Die Art der Schadensinduktion spielt offensichtlich eine wesentliche Rolle im Rahmen der chromatinabhängigen DNA-Schadensantwort und vermutlich auch für die Region in der die Schäden induziert werden. Signifikante Änderungen in der Acetylierung H3K9 oder einer der anderen drei Acetylierungsstellen in Histon H4 (K5, K8 oder K12) wurden auch in anderen Untersuchungen im Rahmen einer strahleninduzierten DNA-Schadensantwort nicht erfasst (Li *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Ogiwara *et al.*, 2011; Tjeertes *et al.*, 2009).

KAP1 vermittelte Chromatinöffnung

Um die Reparatur von Schäden im kompakten HC zu ermöglichen, müssen die Bruchenden für die Reparaturfaktoren zugänglich gemacht werden. Ein früher Schritt hierbei ist die spezifische Phosphorylierung des Transkriptionsrepressors KAP1 an Serin 824 (pKAP1) durch ATM (White *et al.*, 2012; Ziv *et al.*, 2006) infolge der Tip60-vermittelten Acetylierung von ATM (Goodarzi *et al.*, 2008). Über die Assoziation mit den Proteinen der HP1-Familie ist KAP1 an der heterochromatischen Packung des Chromatins beteiligt (Sun *et al.*, 2009; White *et al.*, 2012). Durch die Phosphorylierung wird die Bindung an HP1 geschwächt und es kommt zur Relaxation des Chromatins (Goodarzi *et al.*, 2008; Ziv *et al.*, 2006). Wie der hier erbrachte Nachweis von pKAP1 kurze Zeit nach der DSB-Induktion zeigt, findet eine solche pKAP1-assoziierte Öffnung heterochromatischer Chromatinstrukturen auch in den kortikalen Neuronen statt. Die Bildung von pKAP1-Foci nach dem Abklingen des pan-nukleären Signals, wie sie von Noon *et al.* zu späteren Zeitpunkten (4-8 h) nach Bestrahlung in humanen primären Fibroblasten in heterochromatischen Regionen detektiert wurden (Noon *et al.*, 2010), wurde in den kortikalen Neuronen der Maus nicht beobachtet. Der vergleichsweise geringe Anteil an HC in den transkriptionell hochaktiven Neuronen könnte hierfür einen möglichen Grund darstellen. Wahrscheinlicher scheint allerdings ein speziesspezifischer Unterschied zwischen Mensch und Maus, da die pKAP1-Foci nur in den untersuchten humanen Fibroblasten beschrieben werden, aber nicht in den untersuchten NIH3T3-Mauszellen (Noon *et al.*, 2010).

DNA-Schadensabhängige Chromatinöffnung in reparaturdefizienten Neuronen

Die in den ATM^{-/-}-Neuronen vollständig ausbleibende Phosphorylierung von KAP1 zeigt, dass die Phosphorylierung *in vivo* exklusiv durch ATM erfolgt und auch nicht durch eine der anderen PIKKs ausgeglichen wird. Ein Teil der Brüche kann also offensichtlich weder detektiert noch freigelegt werden und somit auch nicht religiert werden. Die mittels PFGE in ATM-defizienten Zellen detektierten unreparierten DSBs (Kühne *et al.*, 2004; Löbrich und Jeggo, 2005) könnten hieraus resultieren. Auch die gefundene verzögerte H4K16ac-vermittelte Öffnung des Chromatins in ATM-defizienten Zellen im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen spricht für einen heterochromatischen Reparaturdefekt in den ATM-defizienten Zellen. Dies nicht zuletzt auch, weil die für die Acetylierung von H4K16 in Säugerzellen verantwortliche HAT *male absent on the first* (MOF) mit ATM assoziiert ist und weil der *knockdown* von MOF zu einem Ataxia Teleangiectasia (A-T)-ähnlichen Phänotyp führt (Gupta *et al.*, 2005). Da H4K16ac außerdem in einem direkten Bezug zur Bindung von 53BP1 an das Chromatin steht (Hsiao und Mizzen, 2013; Tang *et al.*, 2013), könnten die gehemmte H4K16ac-vermittelte Chromatinöffnung und die gestörte frühe Focientwicklung in einer direkten Verbindung miteinander stehen. Die Bindung von 53BP1 an das Chromatin

erfolgt spezifisch an die Histonmodifikation H4K20me2 (Botuyan *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008). Ist Lysin 16 an diesem Histon nicht acetyliert, kann 53BP1 an das Chromatin binden (Hsiao und Mizzen, 2013; Tang *et al.*, 2013). Ist dagegen Lysin 16 am selben H4-Histon acetyliert, an dem auch zweifach methyliertes Lysin 20 vorliegt, wird die Bindung von 53BP1 an H4K20me2 gehemmt. Ist H4K16 acetyliert, geht die ionische Wechselwirkung des Histons mit der negativ geladenen Glutaminsäure 1551 (Glu1551) von 53BP1 verloren und die Bindung von 53BP1 an das Chromatin wird geschwächt (Tang *et al.*, 2013).

Dass der Defekt in den SCID-Neuronen nur zu späteren Reparaturzeitpunkten durch einen längeren Erhalt der untersuchten Chromatinkomponenten sichtbar wird, deutet weiter darauf hin, dass der Defekt nicht in der Erkennung und Freilegung der Schäden liegt, sondern in der Verknüpfung der Bruchenden selbst, weshalb die Wiederherstellung der ursprünglichen Chromatinstruktur erst verzögert erfolgen kann.

Die genauere Untersuchung der chromatinabhängigen DNA-Schadensantwort in den kortikalen Neuronen mittels IFM konnte die Umstrukturierung des Chromatins im Rahmen der DSB-Reparatur weiter bestätigen. Das Fehlen von ATM bewirkt hierbei anscheinend eine Störung der Chromatinöffnung. Während die ATM-spezifische Phosphorylierung von KAP1 ausbleibt, könnte die fehlende Assoziation von ATM an seine Interaktionspartner MOF und Tip60 die verzögerte Acetylierung von H4K16ac verursachen. Dagegen ist DNA-PKcs für die KAP1- und die H4K16ac-abhängige Chromatinöffnung offenbar nicht essenziell (Abbildung 5.1).

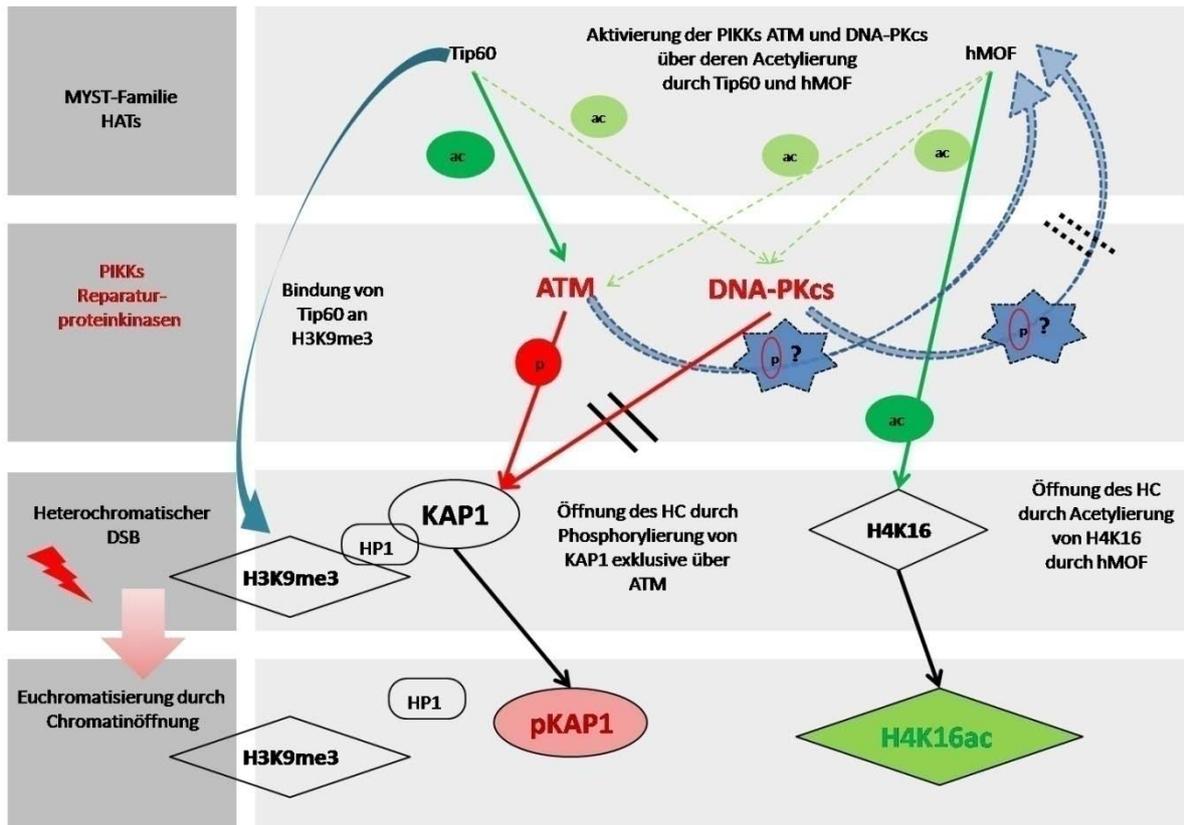


Abbildung 5.1 Bedeutung von ATM und DNA-PKcs für die Reparatur heterochromatischer Brüche

Die Acetylierung von H4K16 erfolgt in Säugerzellen fast ausschließlich durch die Acetyltransferase (HAT) MOF (*male absent on the first*; Smith *et al.*, 2005; Taipale *et al.*, 2005). Durch den *knockdown* von humanem MOF (hMOF) und den damit verbundenen globalen Verlust von H4K16ac kommt es zu einer auf mehreren Ebenen gestörten DNA-Schadensantwort, z.B. G₂/M-Phasearrest, Chromosomenaberrationen und einer defekten Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden (Gupta *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2005; Taipale *et al.*, 2005). Ebenso wie sein Proteinfamilienmitglied Tip60 ist hMOF durch die Acetylierung von ATM und DNA-PKcs direkt an der Aktivierung der beiden PIKKs beteiligt (Gupta *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2005, 2007). Der *knockout* bzw. *knockdown* einer der beiden HATs hemmt die Aktivierung der PIKKs und die Zellen zeigen eine eingeschränkte DSB-Reparatur, sowohl über NHEJ als auch über HR (Gupta *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2005). Trotz einer großen Sequenzhomologie sowie derselben Domänenstruktur üben die beiden HATs der MYST-Proteinfamilie (Voss und Thomas, 2009) unterschiedliche Funktionen im Rahmen der DNA-Schadensantwort aus. Tip60 ist außer durch die Hyperacetylierung des Chromatins an Histon H4 im Bereich von DSBs (nicht dargestellt) durch die Acetylierung der Proteinkinase ATM an deren DNA-schadensabhängiger Aktivierung beteiligt (Murr *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2005, 2007, 2009). Die Tip60-abhängige Aktivierung von ATM ist für die Reparatur von Brüchen im kompakten HC entscheidend (Goodarzi *et al.*, 2008). Infolge von DSBs im HC kommt es zur Bindung von Tip60 an die heterochromatische Histonmodifikation H3K9me3 und zur Aktivierung von ATM durch dessen Acetylierung (Sun *et al.*, 2007, 2009). In Folge dieser Aktivierung phosphoryliert ATM den Transkriptionsrepressor KAP1 spezifisch am Serin 824 (pKAP1; White *et al.*, 2012; Ziv *et al.*, 2006). Durch die Assoziation von KAP1 mit den Proteinen der HP1-Familie, welche die heterochromatische Histonmodifikation H3K9me3 binden, ist KAP1 an der heterochromatischen Packung des Chromatins beteiligt (Sun *et al.*, 2009; White *et al.*, 2012). Durch die Phosphorylierung wird die Bindung an HP1 geschwächt und es kommt zur Relaxation des Chromatins (Goodarzi *et al.*, 2008; Ziv *et al.*, 2006). Da sich das Fehlen von ATM in den kortikalen Neuronen auf die Kinetik der Acetylierung von H4K16 auswirkt, scheint ATM – im Gegensatz zu DNA-PKcs – die hMOF-vermittelte Acetylierung von H4K16 zu regulieren.

5.3 Besondere Funktion von DNA-Reparaturfaktoren im zentralen Nervensystem

Das Fehlen von DNA-Reparaturfaktoren resultiert in einer Vielzahl pathologischer Konsequenzen, inklusive neurologischer Symptome (Rolig und McKinnon, 2000). Beim Menschen sind Krankheitsbilder, die aus Mutationen in Proteinen der DSB-Reparatur resultieren, oft mit neurologischen Symptomen, wie Mikrozephalie oder Neurodegenerationen assoziiert (Buck *et al.*, 2006a; Cantagrel *et al.*, 2007; Frappart und

McKinnon, 2006; O'Driscoll *et al.*, 2001). Neben Mutationen in der Proteinkinase ATM (*Ataxia Teleangiectasia*, A-T) oder einer der Komponenten des MRN-Komplexes MRE11 (*A-T like disorder*, ATLD) und NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome*, NBS) sind – sofern bekannt – auch Defekte in den Kernkomponenten des NHEJ oft mit neuropathologischen Charakteristika verbunden. Während es sich bei A-T Patienten meist um Null-Mutationen handelt, die einen kompletten Verlust des ATM-Proteins verursachen, sind die Mutationen in den NHEJ-Kernkomponenten LIG4 oder XLF/Cernunnos hypomorph (Buck *et al.*, 2006a, 2006b; Gilad *et al.*, 1998).

Neuronale Degenerationen in NHEJ-defizienten Mausmodellen

Auch im Mausmodell ist der Verlust von Reparaturproteinen – insbesondere während der embryonalen Entwicklung – mit neurodegenerativen Aspekten verbunden (Barlow *et al.*, 1996; Borghesani *et al.*, 2000; Dar *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998a; Gatz *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2000; Orii *et al.*, 2006; Sekiguchi *et al.*, 2001; Shull *et al.*, 2009). Die komplette Inaktivierung mancher NHEJ-Proteine (LIG4, XRCC4) resultiert sogar, aufgrund massiv ansteigender Apoptose von post-mitotischen Neuronen im sich entwickelnden Nervensystem, in einer späten embryonalen Letalität (Frank *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998a; Gatz *et al.*, 2011). Ku70- und Ku80-defiziente Mäuse sind zwar vital, aber deutlich kleiner als die Wildtypmäuse und zeigen während der embryonalen Entwicklung eine erhöhte Zahl apoptotischer Zellen (Gao *et al.*, 1998b; Gu *et al.*, 1997, 2000; Nussenzweig *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1996). Ku70-defiziente Mäuse zeigen in diversen Hirnregionen (inklusive zerebralem Kortex) des sich entwickelnden Nervensystems zwischen 10% und 45% an apoptotischen Zellen im Vergleich zu LIG4-defizienten Embryonen (Gu *et al.*, 2000). Dies könnte auch ein Grund für deren Überleben sein. Nach der Geburt scheinen die KU-Proteine dann eine weniger wichtige Rolle zu spielen, da keine apoptotischen Zellen mehr gefunden werden. Auch sonst zeigen KU-defiziente Mäuse nach der Geburt keine sichtbaren neuronalen Defekte mehr. Wie KU-defiziente Neurone auf Bestrahlung reagieren, ist dabei derzeit noch unklar. Möglicherweise verursachen strahleninduzierte DSBs erneut eine neuronale Apoptose. In den drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Genotypen (C57BL/6, SCID und ATM^{-/-}) wurde bei keiner Dosis und zu keinem Untersuchungszeitpunkt auch nur eine apoptotische Zelle (*cleaved-Caspase3* oder *cleaved-PARP1*) gefunden. DNA-PKcs-defiziente Mäuse zeigen als einzige der fünf zentralen Komponenten des NHEJ (Ku70, Ku80, DNA-PKcs, XRCC4 und LIG4) keine Apoptose während der Embryonalentwicklung (Gao *et al.*, 1998a; Gatz *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2000). Auch nach der Geburt zeigen SCID-Mäuse keinerlei Wachstumsstörung und/oder neurologische Symptome (Bosma und Carroll, 1991; Gao *et al.*, 1998b; Gu *et al.*, 2000). Der einzige zu beobachtende Phänotyp ist der Immundefekt und die Strahlensensitivität, wie auch die hier untersuchten SCID-Mäuse

bestätigen. Zu keiner Zeit wurde im untersuchten neuronalen Gewebe der SCID-Mäuse ein morphologischer Unterschied zu reparaturprofizienten Neuronen beobachtet. Auch Verhaltensauffälligkeiten wurden weder vor noch nach der Bestrahlung bemerkt. Der im Gegensatz zu den anderen Komponenten geringere Effekt durch den Verlust von DNA-PKcs, lässt eine weniger wichtige Rolle von DNA-PKcs für die neuronale Integrität in der Maus vermuten. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen, dass DNA-PKcs-defiziente humane Fibroblasten – im Gegensatz zu LIG4-defizienten Fibroblasten – innerhalb der ersten 24 h nach Bestrahlung einen deutlichen Teil der induzierten DSBs reparieren können (Riballo *et al.*, 2004). Auch im Rattenhirn kann die DSB-Reparatur durch DNA-Ligase-Inhibitoren blockiert werden (Ren und Peña de Ortiz, 2002). Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, können die post-mitotischen Neurone der Maus einen großen Teil der strahleninduzierten DSBs reparieren. Die spontan und natürlich auftretenden Null-Mutationen, die in verschiedenen Säugetierspezies beschrieben sind (Maus, Hund und Pferd), zeigen außer dem SCID-Phänotyp keine weiteren schwerwiegenden pathologischen Auffälligkeiten (Bosma und Carroll, 1991; Meek *et al.*, 2001, 2009; Wiler *et al.*, 1995). Dies und die deutlich geringere DNA-PKcs-Aktivität in Wildtypzellen der drei Spezies im Vergleich zu humanen Zellen spricht für eine weniger essenzielle Rolle der Proteinkinase im Tier im Vergleich zum Menschen, obgleich die absolute Notwendigkeit der Proteinkinase auch zwischen den Tierspezies variiert (Meek *et al.*, 2001). Mit abnehmender Komplexität eines Organismus scheint DNA-PKcs eine immer geringere Rolle für dessen Integrität einzunehmen. So findet sich in Hefezellen beispielsweise kein Homolog zu DNA-PKcs, während Homologe zu anderen Komponenten des NHEJ bekannt sind (Jeggo, 1998).

Neuronale Effekte in NHEJ-defizienten Menschen

Beim Menschen war lange Zeit kein Fall einer spontanen Mutation im DNA-PKcs codierenden Prkdc-Gen bekannt. Erst in den vergangenen Jahren wurden zwei Patienten beschrieben, die sich in ihrer Symptomatik stark unterschieden (van der Burg *et al.*, 2009; Woodbine *et al.*, 2013). Während einer der beiden Fälle bis auf den radiosensitiven SCID-Phänotyp nicht weiter auffällig war, zeigte der andere eine schwere neurologische Degeneration und Wachstumsretardierung. Begründet liegt die unterschiedliche Schwere der Erkrankungen vermutlich in den unterschiedlichen Mutationen und den damit verbundenen Auswirkungen auf die Expression und die Enzymaktivität von DNA-PKcs. Während die Proteinexpression und die enzymatische Aktivität bei einem Patienten weitgehend unbeeinflusst waren, fehlte die enzymatische Aktivität im zweiten Fall fast vollständig. Die schwerwiegende Symptomatik des Patienten, das geringe erreichte Lebensalter von weniger als 3 Jahren und der Aspekt, dass keine weiteren inaktivierenden Mutationen im Prkdc-Gen beim Menschen bekannt sind, spricht für eine essenzielle Funktion der Proteinkinase

DNA-PKcs beim Menschen im Gegensatz zur Maus, bei der die natürliche Mutation des Proteins keinerlei Kinaseaktivität zeigt (Woodbine *et al.*, 2013). Dass Mutationen von Ku70, Ku80 oder XRCC4 beim Menschen nicht bekannt sind – obgleich hypomorphe Mutationen nicht ausgeschlossen werden können – und dass die Mutationen in DNA-PKcs-, LIG4- und XLF-Proteinen hypomorph sind, spricht für eine essenzielle Rolle der zentralen Proteine des NHEJ während der humanen Embryonalentwicklung und evtl. auch während der Entwicklung des Nervensystems. Einen speziesspezifischen Unterschied und die Wichtigkeit der zentralen Faktoren des NHEJ für den Menschen lässt auch der hohe KU- und DNA-PKcs-Gehalt in Primaten im Vergleich zu Nagern vermuten (Finnie *et al.*, 1995). Für eine wichtige Rolle des NHEJ im Gehirn und während der Neurogenese sprechen außerdem Befunde, die zeigen, dass Neurone und Gliazellen des ZNS im Vergleich zu anderen Zellen und Geweben die höchste Expression an Ku80 und DNA-PKcs zeigen, und post-mitotische Neurone des zerebralen Kortex während der Embryonalentwicklung im Vergleich zu post-natalen Neuronen ein höheres Niveau an Ku80 und DNA-PKcs aufweisen (Moll *et al.*, 1999; Oka *et al.*, 2000).

Neuronale Degenerationen in Folge von ATM-Mutationen

Die Proteinkinase ATM scheint trotz schwerwiegender Degenerationen für den Menschen nicht essenziell zu sein, da es sich bei den Mutationen in Patienten meist um Null-Mutationen handelt. Zu den zahlreichen Charakteristika von A-T Patienten zählt insbesondere die zerebelläre Ataxie. Diese ist gekennzeichnet durch eine Atrophie des Kleinhirns assoziiert mit dem Verlust von Purkinje- und Granularzellen (Rolig und McKinnon, 2000). Obwohl mehrere verschiedene ATM-defiziente Mausmodelle entwickelt wurden, sind die von A-T Patienten bekannten neuronalen Degenerationen in der Maus nur schwach bis gar nicht ausgeprägt (Lavin, 2013). Lediglich zwei Mausmodelle zeigen ähnlich wie A-T Patienten morphologische Neurodegenerationen im Kleinhirn (Borghesani *et al.*, 2000; Kuljis *et al.*, 1997). Der in dieser Arbeit untersuchte ATM-defiziente Mausstamm weist zwar schwache neurologische Defekte auf, aber keine im Lichtmikroskop sichtbaren Neurodegenerationen (Barlow *et al.*, 1996). Auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen nach Bestrahlung ist keine offensichtliche morphologische Veränderung beobachtet worden. Die Notwendigkeit für das Nervensystem scheint also auch bei diesem Reparaturfaktor zwischen Mensch und Maus zu variieren. Die Gründe für die Neurodegenerationen in A-T Patienten sind dabei bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Es wird sowohl eine zytoplasmatische Funktion von ATM unabhängig von DNA-Schäden in Neuronen postuliert, als auch eine Degeneration auf Grund der defekten DNA-Schadensantwort (Dar *et al.*, 2006; Herrup *et al.*, 2013; Jacquemin *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009).

Interessanterweise zeigen Mäuse ohne die HAT MOF – im Gegensatz zu ATM-defizienten Mäusen – einen zu A-T Patienten ähnlichen neuronalen Phänotyp (Barlow *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2011). Vermutlich durch den Verlust der Purkinjezellen zeigen sie analog zu A-T Patienten eine zerebelläre Fehlfunktion, inklusive gestörter Feinmotorik, Gleichgewichtsstörungen und Ataxie. Auch der Effekt, dass die Mäuse anfangen, rückwärts zu laufen, spricht für eine essenzielle Rolle der Acetylierung von H4K16 in Nervenzellen unabhängig von der Bestrahlung. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf einen defekten ATM-MOF-Signalweg im Zusammenhang mit der neuronalen Chromatinstruktur. Diese Hypothese müsste allerdings noch weiter untersucht werden. Analog zu den ATM-defizienten Mäusen haben die MOF-defizienten Mäuse nur eine geringe Lebenserwartung von weniger als 3 Monaten (Kumar *et al.*, 2011).

Die Bedeutung von DSB-Reparaturproteinen für die Integrität des ZNS

Proteine der DSB-Reparatur – insbesondere die zentralen Komponenten des NHEJ – sind für die Integrität des Nervensystems offenbar sehr wichtig, sowohl während der neuronalen Entwicklung als auch in späteren Lebensphasen. Die genauen molekularen Mechanismen der DNA-Reparaturfaktoren im Nervensystem und während der neuronalen Entwicklung sind dabei derzeit noch weitgehend unklar. Sowohl während der Neurogenese als auch in adulten Neuronen könnte oxidativer Stress durch eine hohe metabolische Aktivität ein Grund für die Wichtigkeit der Faktoren der DNA-Schadensantwort im ZNS sein. In primären, kortikalen Zellkulturen von Ku70-defizienten Mäusen reduzieren Antioxidanzien oder ein geringer Sauerstoffgehalt das hohe neuronale Zellsterben, während sich in Wildtypkulturen hierdurch keine Auswirkungen zeigen (Narasimhaiah *et al.*, 2005). Auch die Akkumulation von oxidativen Schäden in der DNA steht im Verdacht, neben Alterungseffekten ebenfalls eine kritische Rolle für die Pathogenese von verschiedenen, nicht genetischen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit und Parkinson-Krankheit, zu spielen (Szumiel und Foray, 2011). Beispielsweise ist der DNA-PKcs-Proteingehalt in kortikalen Extrakten von Alzheimer Patienten im Vergleich zu normalen Zellen signifikant niedriger (Shackelford, 2006).

Obwohl das Mausmodell die Wichtigkeit der DNA-Reparaturfaktoren im Menschen nicht in allen Einzelheiten widerspiegelt, liefert es wichtige Ansätze, um die essenzielle Funktion der DNA-Reparatur für die Integrität des Nervensystems und des Organismus darzustellen. Insbesondere die neuronale Chromatinstruktur scheint hierbei eine Schlüsselrolle beim Schutz des neuronalen Netzwerks zu haben.

6 Ausblick

Um die Bedeutung der DSB-Reparatur und deren Faktoren für die neuronale Integrität weiter zu charakterisieren, sind aufbauend auf den bisher gewonnenen Erkenntnissen noch verschiedene Fragestellungen offen.

Insbesondere die langfristige Entwicklung der verbleibenden 53BP1-Strukturen nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung ist von großem Interesse. Bleiben die induzierten 53BP1-Akkumulationen nach der Exposition mit 10 mGy-Fraktionen im Gegensatz zu 100 mGy-Fraktionen dauerhaft in den Neuronen erhalten oder findet auch hier bis mehrere Wochen nach der letzten Bestrahlung eine Abnahme der induzierten 53BP1-Foci statt? Auch die langfristige Entwicklung der Schäden in den reparaturdefizienten Neuronen bleibt zu klären. Können die SCID-Neurone die akkumulierenden kleinen 53BP1-Foci über einen längeren Zeitraum reduzieren oder bleiben die induzierten Schäden auch über mehrere Wochen nach der letzten Bestrahlung erhalten? Genauer zu charakterisieren bleibt außerdem die Bedeutung der großen 53BP1-*Nuclearbodies* und deren biologische Relevanz. Welche Konsequenzen haben sie für die Integrität der Neurone? Haben sie eine schützende Funktion für die Zelle oder sind sie Zeichen einer Zelltransformation infolge der Strahlenexposition? Wie verarbeitet das gesunde neuronale Gewebe den chronischen Stress durch die tägliche Strahlenbelastung? Verändern Zellen, die täglich niedrigen Strahlendosen ausgesetzt sind, möglicherweise ihren Proteinhaushalt und ihr RNA-Expressionsprofil (mRNA und/oder siRNAs) z.B. durch einen höheren Gehalt an Reparatur- oder epigenetischen Faktoren?

Da KU-defiziente Mäuse im Gegensatz zu SCID-Mäusen während der Embryonalentwicklung eine erhöhte Zahl an apoptotischen Neuronen aufweisen, wäre auch die Untersuchung der DSB-Reparatur strahleninduzierter Schäden in KU-defizienten Neuronen von Interesse. Obwohl KU-defiziente Mäuse nach ihrer Geburt keine sichtbaren neuronalen Defekte mehr zeigen, ist unklar, wie die NHEJ-defizienten Neurone auf strahleninduzierte DSBs reagieren. Wie essenziell sind Ku70 oder Ku80 während der neuronalen DSB-Reparatur im Vergleich zu DNA-PKcs? Zeigen sie nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung neuronale Apoptose, wie stellt sich die 53BP1-assoziierte Reparatur im Vergleich zu SCID- und $ATM^{-/-}$ -Neuronen dar und/oder unterscheiden sie sich in ihrer chromatinassoziierten DSB-Reparatur?

Da britische Wissenschaftler jüngst ab einer kumulativen Dosis von 50 mGy ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Gehirntumoren nach CTs im Kindesalter festgestellt haben (Pearce *et al.*, 2012), sind auch insbesondere die Effekte niedriger Strahlendosen auf das gesunde, sich noch entwickelnde kindliche Gehirn von großer Relevanz. Da die Exposition

mit niedrigen Strahlendosen insbesondere Störungen bei der neuronalen Entwicklung verursacht, sollen in zukünftigen Experimenten auch die biologischen Auswirkungen einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung auf das junge, noch nicht ausgereifte Gehirn untersucht werden. Hierbei stellt sich insbesondere die Frage nach langfristigen Schäden in den hippocampalen Stammzellen, die in starker Verbindung mit der Gedächtnisfunktion stehen und ein regeneratives Potenzial für das Gehirn besitzen.

In Bezug auf eine weitere Charakterisierung der chromatinabhängigen DNA-Schadensantwort in den ausdifferenzierten Neuronen steht neben einer weiteren Charakterisierung der 53BP1-Großcluster eine weitere Charakterisierung der pKu70-Cluster aus. Durch Darstellung der Bruchenden mittels TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) könnten die Proteinansammlungen durch eine vorhandene oder ausbleibende Kolo-kalisation mit physikalischen Bruchenden weiter untersucht werden. Auch die Bedeutung der einzelnen pKu70-Beads könnte so weiter beurteilt werden. Ob es sich bei den verbleibenden 53BP1-Großclustern tatsächlich um dauerhafte Chromatinveränderungen handelt, könnte durch die Analyse assoziierter Histonmodifikationen oder Proteine mittels TEM oder CHIP (Chromatin-Immunpräzipitation) weiter bewertet werden.

Um die hochkomplexe Schaltzentrale des Menschen vor möglichen Strahlenschäden bestmöglich zu schützen, ist es wichtig, diese Fragen in Zukunft beantworten zu können.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

- [1] Ahn, S.Y., Nevaldine, B., Hahn, P.J. (1991). Direct measurement by pulsed-field gel electrophoresis of induction and rejoining of X-ray-induced double-strand breaks in cultured mouse cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 661–675.
- [2] Altmann, K.-H., Mutter, M. (1993). Die chemische Synthese von Peptiden und Proteinen. *Chem. Unserer Zeit* 27, 274–286.
- [3] Anderson, L., Henderson, C., Adachi, Y. (2001). Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1719–1729.
- [4] Aten, J.A., Stap, J., Krawczyk, P.M., van Oven, C.H., Hoebe, R.A., Essers, J., Kanaar, R. (2004). Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303, 92–95.
- [5] Bamberg, M., Molls, M., Sack, H. (eds) (2003). *Radiologie - Grundlagen*. W. Zuckschwerdt Verlag, München Wien New York.
- [6] Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D., *et al.* (1996). *Atm*-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86, 159–171.
- [7] Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (eds) (2008). *Neurowissenschaften: Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*. 3rd ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford.
- [8] Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Melander, F., Bartek, J., Lukas, J. (2005). Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *J. Cell Biol.* 170, 201–211.
- [9] Bekker-Jensen, S., Mailand, N. (2010). Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair* 9, 1219–1228.
- [10] Bird, A.W., Yu, D.Y., Pray-Grant, M.G., Qiu, Q., Harmon, K.E., Megee, P.C., Grant, P.A., Smith, M.M., Christman, M.F. (2002). Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* 419, 411–415.
- [11] Borghesani, P.R., Alt, F.W., Bottaro, A., Davidson, L., Aksoy, S., Rathbun, G.A., Roberts, T.M., Swat, W., Segal, R.A., Gu, Y. (2000). Abnormal development of Purkinje cells and lymphocytes in *Atm* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3336–3341.
- [12] Bosma, G.C., Custer, R.P., Bosma, M.J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 527–530.
- [13] Bosma, M.J., Carroll, A.M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 323–350.
- [14] Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.-E., Thompson, J.R., Chen, J., Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127, 1361–1373.

- [15] Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J.A., Bickmore, W.A. (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* 10, 211–219.
- [16] Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondanèche, M.-C., Sanal, O., Plebani, A., Stéphan, J.-L., Hufnagel, M., le Deist, F., *et al.* (2006a). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124, 287–299.
- [17] Buck, D., Moshous, D., de Chasseval, R., Ma, Y., le Deist, F., Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A., Casanova, J.-L., Lieber, M.R., de Villartay, J.-P. (2006b). Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase IV. *Eur. J. Immunol.* 36, 224–235.
- [18] Cantagrel, V., Lossi, A.-M., Lisgo, S., Missirian, C., Borges, A., Philip, N., Fernandez, C., Cardoso, C., Figarella-Branger, D., Moncla, A., *et al.* (2007). Truncation of NHEJ1 in a patient with polymicrogyria. *Hum. Mutat.* 28, 356–364.
- [19] Cary, R.B., Peterson, S.R., Wang, J., Bear, D.G., Bradbury, E.M., Chen, D.J. (1997). DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4267–4272.
- [20] Cedervall, B., Wong, R., Albright, N., Dynlacht, J., Lambin, P., Dewey, W.C. (1995). Methods for the quantification of DNA double-strand breaks determined from the distribution of DNA fragment sizes measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Radiat. Res.* 143, 8–16.
- [21] Chan, D.W., Ye, R., Veillette, C.J., Lees-Miller, S.P. (1999). DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 1819–1828.
- [22] Chen, C.-S., Wang, Y.-C., Yang, H.-C., Huang, P.-H., Kulp, S.K., Yang, C.-C., Lu, Y.-S., Matsuyama, S., Chen, C.-Y., Chen, C.-S. (2007). Histone deacetylase inhibitors sensitize prostate cancer cells to agents that produce DNA double-strand breaks by targeting Ku70 acetylation. *Cancer Res.* 67, 5318–5327.
- [23] Dar, I., Biton, S., Shiloh, Y., Barzilai, A. (2006). Analysis of the ataxia telangiectasia mutated-mediated DNA damage response in murine cerebellar neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 7767–7774.
- [24] Dar, I., Yosha, G., Elfassy, R., Galron, R., Wang, Z.-Q., Shiloh, Y., Barzilai, A. (2011). Investigation of the functional link between ATM and NBS1 in the DNA damage response in the mouse cerebellum. *J. Biol. Chem.* 286, 15361–15376.
- [25] Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K., Richmond, T.J. (2003). Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J. Mol. Biol.* 327, 85–96.
- [26] Douglas, P., Gupta, S., Morrice, N., Meek, K., Lees-Miller, S.P. (2005). DNA-PK-dependent phosphorylation of Ku70/80 is not required for non-homologous end joining. *DNA Repair* 4, 1006–1018.
- [27] Downs, J.A., Nussenzweig, M.C., Nussenzweig, A. (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* 447, 951–958.
- [28] Dueva, R., Iliakis, G. (2013). Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl. Cancer Res.* 2, 163–177.

- [29] Finnie, N.J., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Jeggo, P.A., Jackson, S.P. (1995). DNA-dependent protein kinase activity is absent in *xrs-6* cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 320–324.
- [30] Flentje, M., Asadpour, B., Latz, D., Weber, K.J. (1993). Sensitivity of neutral filter elution but not PFGE can be modified by non-dsb chromatin damage. *Int. J. Radiat. Biol.* 63, 715–724.
- [31] Flockerzi, E. (2014). Auswirkungen von Einzeit- und Fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung auf Lungengewebe. Dissertation, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar.
- [32] Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C.Y., Huang, H., Landry, M.-C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., *et al.* (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* 499, 50–54.
- [33] Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Roperio, S., Petrie, K., *et al.* (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 37, 391–400.
- [34] Frank, K.M., Sekiguchi, J.M., Seidl, K.J., Swat, W., Rathbun, G.A., Cheng, H.L., Davidson, L., Kangaloo, L., Alt, F.W. (1998). Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* 396, 173–177.
- [35] Frappart, P.-O., McKinnon, P.J. (2006). Ataxia-telangiectasia and related diseases. *Neuromolecular Med.* 8, 495–511.
- [36] Gademann, G., Schlegel, W., Debus, J., Schad, L., Bortfeld, T., Höver, K.H., Lorenz, W.J., Wannemacher, M. (1993). Fractionated stereotactically guided radiotherapy of head and neck tumors: a report on clinical use of a new system in 195 cases. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 29, 205–213.
- [37] Gao, Y., Sun, Y., Frank, K.M., Dikkes, P., Fujiwara, Y., Seidl, K.J., Sekiguchi, J.M., Rathbun, G.A., Swat, W., Wang, J., *et al.* (1998a). A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* 95, 891–902.
- [38] Gao, Y., Chaudhuri, J., Zhu, C., Davidson, L., Weaver, D.T., Alt, F.W. (1998b). A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity* 9, 367–376.
- [39] Gatz, S.A., Ju, L., Gruber, R., Hoffmann, E., Carr, A.M., Wang, Z.-Q., Liu, C., Jeggo, P.A. (2011). Requirement for DNA ligase IV during embryonic neuronal development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 10088–10100.
- [40] Gilad, S., Chessa, L., Khosravi, R., Russell, P., Galanty, Y., Piane, M., Gatti, R.A., Jorgensen, T.J., Shiloh, Y., Bar-Shira, A. (1998). Genotype-phenotype relationships in ataxia-telangiectasia and variants. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 551–561.
- [41] Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., Jackson, S.P. (2003). MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 952–956.

- [42] Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M., Jeggo, P.A. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell* 31, 167–177.
- [43] Goodarzi, A.A., Jeggo, P., Löbrich, M. (2010). The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair* 9, 1273–1282.
- [44] Goodarzi, A.A., Jeggo, P.A. (2012). The heterochromatic barrier to DNA double strand break repair: how to get the entry visa. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 11844–11860.
- [45] Gratzl, M., Junqueira, L.C.U., Carneiro, J. (eds) (2005). *Histologie*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- [46] Grudzenski, S., Raths, A., Conrad, S., Rube, C.E., Löbrich, M. (2010). Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14205–14210.
- [47] Gu, Y., Seidl, K.J., Rathbun, G.A., Zhu, C., Manis, J.P., van der Stoep, N., Davidson, L., Cheng, H.L., Sekiguchi, J.M., Frank, K., *et al.* (1997). Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 7, 653–665.
- [48] Gu, Y., Sekiguchi, J., Gao, Y., Dikkes, P., Frank, K., Ferguson, D., Hasty, P., Chun, J., Alt, F.W. (2000). Defective embryonic neurogenesis in Ku-deficient but not DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2668–2673.
- [49] Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C., Almouzni, G. (2004). Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J. Cell Biol.* 166, 493–505.
- [50] Gupta, A., Sharma, G.G., Young, C.S.H., Agarwal, M., Smith, E.R., Paull, T.T., Lucchesi, J.C., Khanna, K.K., Ludwig, T., Pandita, T.K. (2005). Involvement of human MOF in ATM function. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5292–5305.
- [51] Gupta, A., Guerin-Peyrou, T.G., Sharma, G.G., Park, C., Agarwal, M., Ganju, R.K., Pandita, S., Choi, K., Sukumar, S., Pandita, R.K., *et al.* (2008). The mammalian ortholog of *Drosophila* MOF that acetylates histone H4 lysine 16 is essential for embryogenesis and oncogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 28, 397–409.
- [52] Hajji, N., Wallenborg, K., Vlachos, P., Füllgrabe, J., Hermanson, O., Joseph, B. (2010). Opposing effects of hMOF and SIRT1 on H4K16 acetylation and the sensitivity to the topoisomerase II inhibitor etoposide. *Oncogene* 29, 2192–2204.
- [53] Harding, S.M., Bristow, R.G. (2012). Discordance between phosphorylation and recruitment of 53BP1 in response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 1432–1444.
- [54] Harrigan, J.A., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Dimitrova, D.S., Polo, S.E., Bradshaw, C.R., Fraser, P., Jackson, S.P. (2011). Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *J. Cell Biol.* 193, 97–108.
- [55] Hartlerode, A.J., Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem. J.* 423, 157–168.

- [56] Hartlerode, A.J., Guan, Y., Rajendran, A., Ura, K., Schotta, G., Xie, A., Shah, J.V., Scully, R. (2012). Impact of histone H4 lysine 20 methylation on 53BP1 responses to chromosomal double strand breaks. *PLoS One* 7, e49211.
- [57] Herrup, K., Li, J., Chen, J. (2013). The role of ATM and DNA damage in neurons: upstream and downstream connections. *DNA Repair* 12, 600–604.
- [58] Hevesy, G., Hofer, E. (1934). Die Verweilzeit des Wassers im Menschlichen Körper: Untersucht mit Hilfe von „schwerem“ Wasser als Indicator. *Klin. Wochenschr.* 13, 1524–1526.
- [59] Hsiao, K.-Y., Mizzen, C.A. (2013). Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *J. Mol. Cell Biol.* 5, 157–165.
- [60] Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R.A., Jr, Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S., Halazonetis, T.D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432, 406–411.
- [61] Jacquemin, V., Rieunier, G., Jacob, S., Bellanger, D., d' Enghien, C.D., Laugé, A., Stoppa-Lyonnet, D., Stern, M.-H. (2012). Underexpression and abnormal localization of ATM products in ataxia telangiectasia patients bearing ATM missense mutations. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 20, 305–312.
- [62] Jakob, B., Splinter, J., Conrad, S., Voss, K.-O., Zink, D., Durante, M., Löbrich, M., Taucher-Scholz, G. (2011). DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res.* 39, 6489–6499.
- [63] Jeggo, P.A. (1998). Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat. Res.* 150, 80–91.
- [64] Jeong, J., Juhn, K., Lee, H., Kim, S.-H., Min, B.-H., Lee, K.-M., Cho, M.-H., Park, G.-H., Lee, K.-H. (2007). SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp. Mol. Med.* 39, 8–13.
- [65] Jiang, X., Sun, Y., Chen, S., Roy, K., Price, B.D. (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, 15741–15746.
- [66] Kauffmann, G.W., Moser, E., Sauer, R. (eds) (2006). *Radiologie*. 3rd ed. Elsevier, Urban & Fischer, München.
- [67] Khanna, K.K., Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27, 247–254.
- [68] Kiefer, J. (1989). *Biologische Strahlenwirkung: Eine Einführung in die Grundlagen von Strahlenschutz und Strahlenanwendung*. 2nd ed. Birkhäuser, Basel.
- [69] Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36, 5678–5694.
- [70] Kobayashi, N., Agematsu, K., Sugita, K., Sako, M., Nonoyama, S., Yachie, A., Kumaki, S., Tsuchiya, S., Ochs, H.D., Sugita, K., *et al.* (2003). Novel Artemis gene mutations of radiosensitive severe combined immunodeficiency in Japanese families. *Hum. Genet.* 112, 348–352.

- [71] Kotnis, A., Du, L., Liu, C., Popov, S.W., Pan-Hammarström, Q. (2009). Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **364**, 653–665.
- [72] Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* **172**, 823–834.
- [73] Kühne, M., Riballo, E., Rief, N., Rothkamm, K., Jeggo, P.A., Löbrich, M. (2004). A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res.* **64**, 500–508.
- [74] Kuljis, R.O., Xu, Y., Aguila, M.C., Baltimore, D. (1997). Degeneration of neurons, synapses, and neuropil and glial activation in a murine *Atm* knockout model of ataxia-telangiectasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12688–12693.
- [75] Kumar, R., Hunt, C.R., Gupta, A., Nannepaga, S., Pandita, R.K., Shay, J.W., Bachoo, R., Ludwig, T., Burns, D.K., Pandita, T.K. (2011). Purkinje cell-specific *moesin* gene deletion results in an ataxia-telangiectasia-like neurological phenotype and backward walking in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3636–3641.
- [76] Lavin, M.F. (2013). The appropriateness of the mouse model for ataxia-telangiectasia: neurological defects but no neurodegeneration. *DNA Repair* **12**, 612–619.
- [77] Li, J., Han, Y.R., Plummer, M.R., Herrup, K. (2009). Cytoplasmic ATM in neurons modulates synaptic function. *Curr. Biol.* **19**, 2091–2096.
- [78] Li, L., Moshous, D., Zhou, Y., Wang, J., Xie, G., Salido, E., Hu, D., de Villartay, J.-P., Cowan, M.J. (2002). A founder mutation in *Artemis*, an SNM1-like protein, causes SCID in Athabascan-speaking Native Americans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 6323–6329.
- [79] Li, X., Corsa, C.A.S., Pan, P.W., Wu, L., Ferguson, D., Yu, X., Min, J., Dou, Y. (2010). MOF and H4 K16 acetylation play important roles in DNA damage repair by modulating recruitment of DNA damage repair protein Mdc1. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5335–5347.
- [80] Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., Ward, D.C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* **80**, 224–234.
- [81] Löbrich, M., Jeggo, P.A. (2005). The two edges of the ATM sword: Co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother. Oncol.* **76**, 112–118.
- [82] Lorat, Y., Schanz, S., Schuler, N., Wennemuth, G., Rube, C., Rube, C.E. (2012). Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS One* **7**, e38165.
- [83] Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., *et al.* (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol. Cell* **21**, 187–200.

- [84] Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- [85] Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grøfte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., *et al.* (2011a). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 243–253.
- [86] Lukas, J., Lukas, C., Bartek, J. (2011b). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* 13, 1161–1169.
- [87] MacDonald, M. (2009). *Dein Gehirn - Das fehlende Handbuch: Ein missing manual.* Pogue Press, O'Reilly, Köln.
- [88] Mahaney, B.L., Meek, K., Lees-Miller, S.P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem. J.* 417, 639–650.
- [89] Meek, K., Kienker, L., Dallas, C., Wang, W., Dark, M.J., Venta, P.J., Huie, M.L., Hirschhorn, R., Bell, T. (2001). SCID in Jack Russell terriers: a new animal model of DNA-PKcs deficiency. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 2142–2150.
- [90] Meek, K., Jutkowitz, A., Allen, L., Glover, J., Convery, E., Massa, A., Mullaney, T., Stanley, B., Rosenstein, D., Bailey, S.M., *et al.* (2009). SCID dogs: similar transplant potential but distinct intra-uterine growth defects and premature replicative senescence compared with SCID mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 2529–2536.
- [91] Miller, K.M., Tjeertes, J.V., Coates, J., Legube, G., Polo, S.E., Britton, S., Jackson, S.P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1144–1151.
- [92] Misri, S., Pandita, S., Kumar, R., Pandita, T.K. (2008). Telomeres, histone code, and DNA damage response. *Cytogenet. Genome Res.* 122, 297–307.
- [93] Moll, U., Lau, R., Sypes, M.A., Gupta, M.M., Anderson, C.W. (1999). DNA-PK, the DNA-activated protein kinase, is differentially expressed in normal and malignant human tissues. *Oncogene* 18, 3114–3126.
- [94] Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., *et al.* (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105, 177–186.
- [95] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263–273.
- [96] Murga, M., Jaco, I., Fan, Y., Soria, R., Martinez-Pastor, B., Cuadrado, M., Yang, S.-M., Blasco, M.A., Skoultchi, A.I., Fernandez-Capetillo, O. (2007). Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *J. Cell Biol.* 178, 1101–1108.

- [97] Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.-G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z.-Q., Herceg, Z. (2006). Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 8, 91–99.
- [98] Murray, J.M., Stiff, T., Jeggo, P.A. (2012). DNA double-strand break repair within heterochromatic regions. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 173–178.
- [99] Nagel, F. (2012). Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile: Interdisziplinäre Erklärungsansätze der Verarbeitung und Wirkung audiovisueller Kommunikation. In: Nagel F. Die Wirkung verbaler und nonverbaler Kommunikation in TV-Duellen, VS Verlag für Sozialwissenschaften, Wiesbaden, pp 49–63.
- [100] Narasimhaiah, R., Tuchman, A., Lin, S.L., Naegele, J.R. (2005). Oxidative damage and defective DNA repair is linked to apoptosis of migrating neurons and progenitors during cerebral cortex development in Ku70-deficient mice. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 15, 696–707.
- [101] Nevaldine, B., Longo, J.A., Vilenchik, M., King, G.A., Hahn, P.J. (1994). Induction and repair of DNA double-strand breaks in the same dose range as the shoulder of the survival curve. *Radiat. Res.* 140, 161–165.
- [102] Noon, A.T., Shibata, A., Rief, N., Löbrich, M., Stewart, G.S., Jeggo, P.A., Goodarzi, A.A. (2010). 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat. Cell Biol.* 12, 177–184.
- [103] Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M.C., Li, G.C. (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 382, 551–555.
- [104] O’Driscoll, M., Cerosaletti, K.M., Girard, P.M., Dai, Y., Stumm, M., Kysela, B., Hirsch, B., Gennery, A., Palmer, S.E., Seidel, J., *et al.* (2001). DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell* 8, 1175–1185.
- [105] Ogiwara, H., Ui, A., Otsuka, A., Satoh, H., Yokomi, I., Nakajima, S., Yasui, A., Yokota, J., Kohno, T. (2011). Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene* 30, 2135–2146.
- [106] Oka, A., Takashima, S., Abe, M., Araki, R., Takeshita, K. (2000). Expression of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and Ku80 in developing human brains: implication of DNA-repair in neurogenesis. *Neurosci. Lett.* 292, 167–170.
- [107] Olive, P.L., Banáth, J.P. (1995). Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. *Radiat. Res.* 142, 144–152.
- [108] Orii, K.E., Lee, Y., Kondo, N., McKinnon, P.J. (2006). Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10017–10022.
- [109] Paillard, S., Strauss, F. (1991). Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA. *Nucleic Acids Res.* 19, 5619–5624.

- [110] Pauly, H., Pfister, H., Rajewsky, B. (1966). Über die direkte und indirekte Strahlenwirkung auf Enzyme in der Zelle. *Biophysik* 3, 36–39.
- [111] Pearce, M.S., Salotti, J.A., Little, M.P., McHugh, K., Lee, C., Kim, K.P., Howe, N.L., Ronckers, C.M., Rajaraman, P., Sir Craft, A.W., *et al.* (2012). Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet* 380, 499–505.
- [112] Pogribny, I., Koturbash, I., Tryndyak, V., Hudson, D., Stevenson, S.M.L., Sedelnikova, O., Bonner, W., Kovalchuk, O. (2005). Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus. *Mol. Cancer Res. MCR* 3, 553–561.
- [113] Rea, S., Xouri, G., Akhtar, A. (2007). Males absent on the first (MOF): from flies to humans. *Oncogene* 26, 5385–5394.
- [114] Ren, K., Peña de Ortiz, S. (2002). Non-homologous DNA end joining in the mature rat brain. *J. Neurochem.* 80, 949–959.
- [115] Riballo, E., Kühne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G.C.M., Recio, M.-J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., *et al.* (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell* 16, 715–724.
- [116] Riballo, E., Woodbine, L., Stiff, T., Walker, S.A., Goodarzi, A.A., Jeggo, P.A. (2009). XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res.* 37, 482–492.
- [117] Rink, H. (1971). Die Radiolyse des Wassers. *Chem. Unserer Zeit* 5, 90–95.
- [118] Rodier, F., Muñoz, D.P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppé, J.-P., Campeau, E., Beauséjour, C.M., Kim, S.-H., *et al.* (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.* 124, 68–81.
- [119] Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- [120] Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146, 905–916.
- [121] Rolig, R.L., McKinnon, P.J. (2000). Linking DNA damage and neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 23, 417–424.
- [122] Rothkamm, K., Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5057–5062.
- [123] Rube, C.E., 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 6546–6555.

- [124] Rbe, C.E., Fricke, A., Wendorf, J., Sttzel, A., Kühne, M., Ong, M.F., Lipp, P., Rbe, C. (2010). Accumulation of DNA double-strand breaks in normal tissues after fractionated irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **76**, 1206–1213.
- [125] Rbe, C.E., Lorat, Y., Schuler, N., Schanz, S., Wennemuth, G., Rbe, C. (2011). DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA Repair* **10**, 427–437.
- [126] Ruiz de Almodóvar, J.M., Steel, G.G., Whitaker, S.J., McMillan, T.J. (1994). A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 641–649.
- [127] Sanders, S.L., Portoso, M., Mata, J., Bhler, J., Allshire, R.C., Kouzarides, T. (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**, 603–614.
- [128] Sarkaria, J.N., Bush, C., Eady, J.J., Peacock, J.H., Steel, G.G., Yarnold, J.R. (1998). Comparison between pulsed-field gel electrophoresis and the comet assay as predictive assays for radiosensitivity in fibroblasts. *Radiat. Res.* **150**, 17–22.
- [129] Sauer, R. (1993). *Strahlentherapie und Onkologie fr Technische Assistenten in der Medizin*. 2nd ed. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore.
- [130] Schanz, S., Schuler, N., Lorat, Y., Fan, L., Kaestner, L., Wennemuth, G., Rbe, C., Rbe, C.E. (2012). Accumulation of DNA damage in complex normal tissues after protracted low-dose radiation. *DNA Repair* **11**, 823–832.
- [131] Schatz, D.G. (2004). V(D)J recombination. *Immunol. Rev.* **200**, 5–11.
- [132] Schlegel, W., Pastyr, O., Bortfeld, T., Becker, G., Schad, L., Gademann, G., Lorenz, W.J. (1992). Computer systems and mechanical tools for stereotactically guided conformation therapy with linear accelerators. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **24**, 781–787.
- [133] Schneider, G., Burkart, W. (1998). Gesundheitliche Risiken ionisierender Strahlung. *Radiol.* **38**, 719–725.
- [134] Schuler, N., Rbe, C.E. (2013). Accumulation of DNA damage-induced chromatin alterations in tissue-specific stem cells: the driving force of aging? *PloS One* **8**, e63932.
- [135] Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A., Halazonetis, T.D. (2000). p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* **151**, 1381–1390.
- [136] Schwarz, K., Gauss, G.H., Ludwig, L., Pannicke, U., Li, Z., Lindner, D., Friedrich, W., Seger, R.A., Hansen-Hagge, T.E., Desiderio, S., *et al.* (1996). RAG mutations in human B cell-negative SCID. *Science* **274**, 97–99.
- [137] Sekiguchi, J., Ferguson, D.O., Chen, H.T., Yang, E.M., Earle, J., Frank, K., Whitlow, S., Gu, Y., Xu, Y., Nussenzweig, A., *et al.* (2001). Genetic interactions between ATM and the nonhomologous end-joining factors in genomic stability and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3243–3248.

- [138] Seyffert, W. (2003). Lehrbuch der Genetik. 2nd ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford.
- [139] Shackelford, D.A. (2006). DNA end joining activity is reduced in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 27, 596–605.
- [140] Sharma, S. (2007). Age-related nonhomologous end joining activity in rat neurons. *Brain Res. Bull.* 73, 48–54.
- [141] Sharma, G.G., So, S., Gupta, A., Kumar, R., Cayrou, C., Avvakumov, N., Bhadra, U., Pandita, R.K., Porteus, M.H., Chen, D.J., *et al.* (2010). MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3582–3595.
- [142] Shiloh, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem. Sci.* 31, 402–410.
- [143] Shiloh, Y., Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 197–210.
- [144] Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M.J., Davie, J.R., Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844–847.
- [145] Shull, E.R.P., Lee, Y., Nakane, H., Stracker, T.H., Zhao, J., Russell, H.R., Petrini, J.H.J., McKinnon, P.J. (2009). Differential DNA damage signaling accounts for distinct neural apoptotic responses in ATLD and NBS. *Genes Dev.* 23, 171–180.
- [146] Smith, E.R., Cayrou, C., Huang, R., Lane, W.S., Côté, J., Lucchesi, J.C. (2005). A human protein complex homologous to the *Drosophila* MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9175–9188.
- [147] Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64, 2390–2396.
- [148] Strahl, B.D., Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.
- [149] Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213–1226.
- [150] Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13182–13187.
- [151] Sun, Y., Xu, Y., Roy, K., Price, B.D. (2007). DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8502–8509.
- [152] Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrappetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstine, J.R., Price, B.D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat. Cell Biol.* 11, 1376–1382.
- [153] Swift, M., Morrell, D., Massey, R.B., Chase, C.L. (1991). Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* 325, 1831–1836.

- [154] Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S., McMahon, S.B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol. Cell* 24, 841–851.
- [155] Szumiel, I., Foray, N. (2011). Chromatin acetylation, β -amyloid precursor protein and its binding partner FE65 in DNA double strand break repair. *Acta Biochim. Pol.* 58, 11–18.
- [156] Taipale, M., Rea, S., Richter, K., Vilar, A., Lichter, P., Imhof, A., Akhtar, A. (2005). hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6798–6810.
- [157] Tamburini, B.A., Tyler, J.K. (2005). Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4903–4913.
- [158] Tang, J., Cho, N.W., Cui, G., Manion, E.M., Shanbhag, N.M., Botuyan, M.V., Mer, G., Greenberg, R.A. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 317–325.
- [159] Thompson, D., Duedal, S., Kirner, J., McGuffog, L., Last, J., Reiman, A., Byrd, P., Taylor, M., Easton, D.F. (2005). Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 813–822.
- [160] Tjeertes, J.V., Miller, K.M., Jackson, S.P. (2009). Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *EMBO J.* 28, 1878–1889.
- [161] Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P., Hansen, J.C. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4629–4638.
- [162] Van der Burg, M., van Veelen, L.R., Verkaik, N.S., Wiegant, W.W., Hartwig, N.G., Barendregt, B.H., Brugmans, L., Raams, A., Jaspers, N.G.J., Zdzienicka, M.Z., *et al.* (2006). A new type of radiosensitive T-B-NK⁺ severe combined immunodeficiency caused by a LIG4 mutation. *J. Clin. Invest.* 116, 137–145.
- [163] Van der Burg, M., Ijspeert, H., Verkaik, N.S., Turul, T., Wiegant, W.W., Morotomi-Yano, K., Mari, P.-O., Tezcan, I., Chen, D.J., Zdzienicka, M.Z., *et al.* (2009). A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B- SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J. Clin. Invest.* 119, 91–98.
- [164] Van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* 2, 196–206.
- [165] Wannemacher, M., Wenz, F., Debus J. (eds) (2013). *Strahlentherapie*. 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- [166] White, D., Rafalska-Metcalf, I.U., Ivanov, A.V., Corsinotti, A., Peng, H., Lee, S.-C., Trono, D., Janicki, S.M., Rauscher, F.J., 3rd (2012). The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: regulation by HP1 proteins and serine 473/824 phosphorylation. *Mol. Cancer Res. MCR* 10, 401–414.
- [167] Wiler, R., Leber, R., Moore, B.B., VanDyk, L.F., Perryman, L.E., Meek, K. (1995). Equine severe combined immunodeficiency: a defect in V(D)J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11485–11489.

- [168] Woodbine, L., Neal, J.A., Sasi, N.-K., Shimada, M., Deem, K., Coleman, H., Dobyns, W.B., Ogi, T., Meek, K., Davies, E.G., *et al.* (2013). PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *J. Clin. Invest.* 123, 2969–2980.
- [169] Xu, Y., Price, B.D. (2011). Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 261–267.
- [170] Yang, H., Pesavento, J.J., Starnes, T.W., Cryderman, D.E., Wallrath, L.L., Kelleher, N.L., Mizzen, C.A. (2008). Preferential dimethylation of histone H4 lysine 20 by Suv4-20. *J. Biol. Chem.* 283, 12085–12092.
- [171] Zhu, C., Bogue, M.A., Lim, D.S., Hasty, P., Roth, D.B. (1996). Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* 86, 379–389.
- [172] Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., Shiloh, Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat. Cell Biol.* 8, 870–876.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

(p)KAP1	(phosphoryliertes) KRAB-associated protein 1
(p)Ku70	(phosphoryliertes) Ku70 Reparaturprotein
53BP1	p53 Bindungsprotein 1; engl. <i>p53 binding protein 1</i>
abs.	absolut
Ac	Acetylgruppe
A-NHEJ	alternatives NHEJ; engl. <i>alternative NHEJ</i>
AS	Aminosäure
A-T	Ataxia-Teleangiectasia
ATLD	<i>A-T like disorder</i>
ATM	<i>Ataxia Teleangiectasia mutated protein</i>
ATM ^{-/-}	für das ATM-Allel homozygote negativer Genotyp
ATM ^{+/-}	für das ATM-Allel heterozygoter Genotyp
ATM ^{+/+}	ATM-Wildtyp
ATR	<i>Ataxia Teleangiectasia and Rad3-related protein</i>
BER	Basenaustauschreparatur, engl. <i>base excision repair</i>
bp	Basenpaare, engl. <i>base pairs</i>
BRCA1/2	<i>breast-cancer protein 1 bzw. 2</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation, engl. <i>chromatin immunoprecipitation</i>
C-NHEJ	klassisches NHEJ, engl. <i>classical NHEJ</i>
CT	Computertomographie
d	Tage, engl. <i>days</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
DNA-PKcs	DNA-PK Untereinheit, engl. <i>DNA proteinkinase subunit</i>
DSB	DNA-Doppelstrangbruch, engl. <i>DNA double strand break</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA, engl. <i>double-strand deoxyribonucleic acid</i>
e ⁻	negativ geladenes Elektron
EC	Euchromatin
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere, <i>lat. et alii (maskulin), et aliae (feminin), et alia (neutrum)</i>
evtl.	eventuell
Exo1	Exonuclease1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
Gy	Gray
h	Stunden, engl. <i>hours</i>
H2AX	Histonvariante des Histons H2A
H3K9ac	an Lysin 9 acetyliertes Histon 3
H3K9me3	an Lysin 9 dreifachmethyliertes Histon 3
H4K16ac	an Lysin 16 acetyliertes Histon 4
H4K20me1/2	an Lysin 20 einfach- bzw. zweifachmethyliertes Histon 4
HAT	Histonacetyltransferase

HC	Heterochromatin
HDAC	Histondeacetylase
HP1	Heterochromatin Protein1
HR	Homologe Rekombination
i.d.R.	in der Regel
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie, engl. <i>intensity modulated radiotherapy</i>
inkl.	inklusive
KG	Körpergewicht
KRAB	<i>Krüppel-associated box repression domain</i>
Ktrl.	Kontrolle
KU	Ku70/Ku80-Heterodimer
lat.	lateinisch
LIG1/3/4	Ligase1, 3 oder 4
Mbp	Megabasenpaare, engl. <i>mega base pairs</i>
min	Minuten
mo	Monate
MOF	<i>male absent on the first</i>
Mre11	<i>meiotic recombination protein 11</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRN-Komplex	Mre11-RAD50-NBS1-Komplex
MV	Megavolt
MYST	Moz, Ybf2/sas3, sas2, Tip60 Proteinfamilie
NBS	<i>Nijmegen breakage syndrome</i>
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome protein 1</i>
neo-Kassette	PGK-Neomycin-Kassette
NeuN	neuronales Protein
NHEJ	Nicht-homologes Endjoining, engl. <i>non-homologous end joining</i>
PARP1	Poly-[ATP-Ribose]-polymerase 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PFA	para-Formaldehyd
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PGK	Phosphoglycerinkinase
PIKK	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase</i>
Prkdc-Gen	codierendes Gen für das Protein DNA-PKcs
PTV	Planungszielvolumen, engl. <i>planning target volume</i>
px	pixel
Rad50-59	DNA-Reparaturproteine
RAG1/2	<i>recombination activation gen 1 bzw. 2</i>
RIF	strahleninduzierte Foci, engl. <i>radiation induced foci</i>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, engl. <i>reactive oxygen species</i>
RPA	Replikationsprotein A
rpm	Rotationsrunden pro Minute, engl. <i>revolutions per minute</i> ;
RS-SCID	radiosensitiver SCID
RT	Raumtemperatur

SCID	schwere kombinierte Immundefizienz, engl. <i>Severe combined Immunodeficiency</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	sogenannt
SSB	Einzelstrangbruch, engl. <i>single strand break</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA, engl. <i>single strand deoxyribonucleic acid</i>
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Temp.	Temperatur
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
ü. N.	über Nacht
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
vs.	versus
WB	Western Blot
WT	Wildtyp, engl. <i>wilde type</i>
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC1/4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1 bzw. 4</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
γ H2AX	Histon H2A-Variante H2AX phosphoryliert an Serin 139

Zudem wurden gängige SI-Einheiten verwendet.

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	DSB-Reparaturwege in eukaryontischen Zellen	8
Abbildung 2.2	Aufbau und Struktur des Chromatins.....	11
Abbildung 3.1	CT-geplante Dosisverteilung im Mausgewebe.....	28
Abbildung 3.2	Schematische Darstellung der Niedrigdosisexperimente	29
Abbildung 4.1	Markierung von Neuronen im zerebralen Kortex.....	37
Abbildung 4.2	Chromatinstruktur in kortikalen Neuronen unbestrahlter C57BL/6-Mäuse	38
Abbildung 4.3	Neuronale Chromatinstruktur im TEM	40
Abbildung 4.4	53BP1 in kortikalen Neuronen unbestrahlter C57BL/6-Mäuse	42
Abbildung 4.5	53BP1-Foci vor und nach Bestrahlung in Mäusen mit unterschiedlichem Alter und/oder Genotyp	44
Abbildung 4.6	53BP1-Foci in reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen.....	47
Abbildung 4.7	TEM-Untersuchung nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen.....	49
Abbildung 4.8	53BP1-Foci in reparaturdefizienten Mäusen nach fraktionierter Bestrahlung mit niedrigen Dosen.....	52
Abbildung 4.9	53BP1-Focigröße nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung mit 100 mGy.....	54
Abbildung 4.10	53BP1-Foci in reparaturprofizienten und reparaturdefizienten Neuronen nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy	57
Abbildung 4.11	TEM-Aufnahme eines kortikalen Neurons des murinen Gehirngewebes nach Bestrahlung mit 6 Gy	61
Abbildung 4.12	pKu70 in kortikalen Neuronen von reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen nach 6 Gy-Bestrahlung	63
Abbildung 4.13	53BP1-Cluster in kortikalen Neuronen von reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen nach 6 Gy-Bestrahlung	64
Abbildung 4.14	Gegenüberstellung der 53BP1-Quantifizierungen in der TEM und der IFM nach 6 Gy-Bestrahlung.....	65
Abbildung 4.15	pKu70 in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter Mäuse nach 6 Gy-Bestrahlung	67
Abbildung 4.16	pKu70-Clusteranteile in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter Mäuse nach 6 Gy-Bestrahlung	68
Abbildung 4.17	Reparaturfaktoren im Kontext des Chromatins in Kombination mit spezifischen Histonmodifikationen im TEM.....	70
Abbildung 4.18	Reparaturfaktoren im Kontext des Chromatins in Kombination mit verschiedenen Histonmodifikationen in der IFM	71
Abbildung 4.19	H4K16ac nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturprofizienter C57BL/6-Mäuse.....	73
Abbildung 4.20	H4K16ac nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter SCID-Mäuse.....	74
Abbildung 4.21	H4K16ac nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter ATM ^{-/-} -Mäuse.....	75
Abbildung 4.22	KAP1 in kortikalen Neuronen vor und nach Bestrahlung mit 6 Gy	77
Abbildung 4.23	pKAP1 nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturprofizienter C57BL/6-Mäuse	79
Abbildung 4.24	pKAP1 nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter SCID-Mäuse.....	80

Abbildung 4.25	pKAP1 nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen reparaturdefizienter ATM ^{-/-} -Mäuse.....	81
Abbildung 5.1	Bedeutung von ATM und DNA-PKcs für die Reparatur heterochromatischer Brüche.....	99

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Übersicht über die Absorptionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfilter	19
Tabelle 3.2	PCR-Ansätze für die Amplifikation des ATM-Allelteilstücks	27
Tabelle 3.3	PCR-Programm für die Amplifikation des ATM-Allelteilstücks.....	27

8 Veröffentlichungen

Publikationen

Schanz, S., Flockerzi, E., Schuberth, K. & Rube, C. E. Genetically-defined DNA repair capacity determines the extent of DNA damage accumulation in healthy mouse tissues after very low doses of ionizing radiation (submitted)

Lorat, Y., Brunner, C.; **Schanz, S.**; Jakob, B.; Taucher-Scholz G. & Rube, C. E. Nanoscale analysis of clustered DNA damage after high-LET radiation by quantitative electron microscopy – the heavy burden to repair (submitted)

Flockerzi, E., **Schanz, S.** & Rube, C.E. (2014). Even low doses of radiation lead to DNA damage accumulation in lung tissue according to the genetically-defined DNA repair capacity. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* *111*, 212–218.

Schanz, S., Schuler, N., Lorat, Y., Fan, L., Kaestner, L., Wennemuth, G., Rube C. & Rube, C. E. (2012). Accumulation of DNA damage in complex normal tissues after protracted low-dose radiation. *DNA repair*, *11*(10), 823–832. doi:10.1016/j.dnarep.2012.07.005

Lorat, Y., **Schanz, S.**, Schuler, N., Wennemuth, G., Rube, C., & Rube, C. E. (2012). Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS one*, *7*(5), e38165. doi:10.1371/journal.pone.0038165

Rube, C. E., Lorat, Y., Schuler, N., **Schanz, S.**, Wennemuth, G., & Rube, C. (2011). DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA repair*, *10*(4), 427–437. doi:10.1016/j.dnarep.2011.01.012

Vorträge

European Network of Excellence Low Dose Research toward Multidisciplinary Integration (DoReMi) 3rd Periodic Meeting in München

08. -10. Juli 2014

Poster

Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie e.V. (DEGRO), 18. Jahrestagung in Wiesbaden
07.- 10. Juni 2012

Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS), 14. Jahrestagung in Rheinbach/Köln
13. - 15. September 2011

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. med. Claudia E. Rube für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung dieser Doktorarbeit sowie die Unterstützung bei der freien und selbstständigen Planung und Umsetzung der Experimente. Weiter gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Christian Rube für die zwischenzeitliche Finanzierung und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Mathias Montenarh für die wissenschaftliche Begleitung der Arbeit.

Ich bedanke mich beim Team des strahlenbiologischen Labors der Universitätsklinik des Saarlandes für die gute Zusammenarbeit. Ein ganz besonderer Dank geht an...

...Frau Dr. rer. med. Yvonne Lorat für die Einarbeitung in die Elektronenmikroskopie und die enge Zusammenarbeit bei der gemeinschaftlichen Anfertigung der elektronenmikroskopischen Daten. Die Anfertigung der Gewebeschnitte, die Färbungen für die quantitativen Auswertungen sowie die Erfassung der quantitativen Daten am TEM sind dabei ihr zuzuschreiben/ zu verdanken. Die enge Kooperation im gemeinsamen Themengebiet und der stetige Gedankenaustausch in vielen fachlichen Gesprächen war stets sehr hilfreich und hat neue Sichtweisen eröffnet.

... Frau M.Sc. Angelika Grewenig für die Unterstützung im Labor und viele gute Gespräche.

... Herrn Elias Flockerzi für die gute und enge Zusammenarbeit sowie das eingehende und kritische Korrekturlesen.

Auch ein besonderer Dank geht an alle weiteren Korrektoren, die viel Zeit, Arbeit und Nerven in das ausführliche Lesen dieser Arbeit investiert haben.

Frau Margit Hut aus der Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei der Asservation der Gewebe in Paraffin durch die stetige Bedienung des Einbettautomaten.

Bei Herrn PD Dr. rer. nat. R. Schubert und seiner Arbeitsgruppe des allergologischen Labors des Klinikums der Johann Wolfgang von Goethe Universität in Frankfurt/Main bedanke ich mich für die Bereitsstellung des ATM-Mausstamms.

Ein weiterer Dank geht an das *“European Network of Excellence DoReMi – Low Dose Research towards Multidisciplinary Integration”* durch das Teile dieser Arbeit unterstützt und mit finanziert wurden. [Agreement number 249689; WP6 individual sensitivities; Task 6.10]

9. Danksagung

Mein größter Dank geht an meine Familie und meine Freunde, die mich während dieser Promotion stets seelisch und moralisch unterstützt haben und mich in schweren Zeiten immer wieder aufgebaut und mir den Rücken gestärkt haben. Leider kann ich Euch hier nicht alle Aufzählen, aber ihr wisst wer gemeint ist. Danke, dass ich Euch habe!

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Stefanie Schanz
*15.01.1985 Grünstadt
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademischer Werdegang

Seit 01/2010

Universitätsklinikum Homburg

Wissenschaftliche Mitarbeiterin im strahlenbiologischen Labor der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes bei Frau Prof. Dr. med. Claudia E. Rube

10/2004 –
12/2009

Technische Universität Kaiserslautern

Studiengang Diplom-Chemie
Vertiefungsrichtung *Life Science*

12/2009

Abgabe der Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie
→*“Versuche zur Kopplung von Gelonin an einen monoklonalen PD1 Antikörper und immunologischer Nachweis des Konjugates nach der Isolation“*

10/2007
10/2006

Abschluss des Basisstudiums
Vordiplom

08/2001 –
03/2004

Integrierte Gesamtschule Wörrstadt

Abitur

08/1995 –
06/2001

Realschule Nierstein

Mittlere Reife mit Empfehlung für Oberstufe am Gymnasium

Auszeichnungen

09/2010

Diplom-/Masterpreis der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM) 2010