

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
(Direktorin: Prof. Dr. Cordula Petersen)
Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie
(Leitung: Prof. Dr. Ekkehard Dikomey)

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG VERSCHIEDENER SURROGATMARKER DER INDIVIDUELLEN ZELLULÄREN STRAHLENEMPFINDLICHKEIT

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Nele Julia Hoffmann
aus Hamburg

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17. Dezember 2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. A. Raabe

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. K. Borgmann

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. C. Petersen

INHALTSVERZEICHNIS

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	6
2. EINLEITUNG	9
2.1. Radiotherapie in der Behandlung maligner Tumoren	9
2.2. Parameter der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit	11
2.3. Nachweismethoden der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit	15
2.3.1. Kolonietest	15
2.3.2. Chromosomenaberrationen	16
2.3.3. Reparatur-assoziierte Proteine	16
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1. Beschreibung der untersuchten Probanden	19
3.2. Gewinnung und Aufbereitung der Lymphozyten	19
3.3. Bestrahlung und Dosimetrie	20
3.4. Angewandte Methoden zur Messung von DNA-Strangbrüchen und DNA-Reparatur	21
3.4.1. γ H2A.X- und pATM-Immunfluoreszenzassay	21
3.4.2. G ₀ /G ₁ -Assay	23
3.4.3. Flusszytometrische Auswertung der γ H2A.X-Signale	27
3.5. Materialien	30
4. ERGEBNISSE	34
4.1. Immunhistochemischer Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels der reparatur-assoziierten Proteine γH2A.X und pATM	34
4.2. Nachweis reparatur-assoziiierter Proteine in unbestrahlten Lymphozyten	35
4.3. Nachweis reparatur-assoziiierter Proteine in bestrahlten Lymphozyten	40
4.3.1. Dosis-Effekt-Zusammenhänge	43

4.3.2.	Konsistenz der Ergebnisse nach 4 und 6 Gy	46
4.3.3.	Assoziation von γ H2A.X und pATM-Foci	48
4.4.	Bestimmung der individuellen Strahlensensibilität mittels Chromosomenaberrationen	56
4.5.	Flusszytometrischer Nachweis des γH2A.X-Signals	62
5.	DISKUSSION	68
5.1.	Immunhistochemischer Nachweis und mikroskopische Darstellung residueller γH2A.X- und pATM-Foci	69
5.2.	Nachweis reparatur-assoziiertes Proteine in unbestrahlten Lymphozyten	70
5.3.	Nachweis reparatur-assoziiertes Proteine in bestrahlten Lymphozyten	72
5.3.1.	Die Häufigkeiten residueller Foci pro Zelle folgen einer Poisson-Verteilung	72
5.3.2.	Die Anzahl residueller Foci nimmt mit steigender Dosis zu	73
5.3.3.	Individuelle Unterschiede in der Anzahl residueller Foci sind dosisunabhängig	76
5.3.4.	Assoziation von γ H2A.X und pATM-Foci	77
5.4.	Vergleich der Ergebnisse des Foci-Nachweises mit denen des Nachweises letaler Chromosomenaberrationen	79
5.5.	Flusszytometrischer Nachweis residueller γH2A.X-Foci	83
5.5.1.	Dosis-Effekt-Beziehung und Variabilität des γ H2A.X-Signals	84
5.5.2.	Vergleich der Ergebnisse des γ H2A.X- und pATM-Foci-Nachweises mit den Ergebnissen des flusszytometrischen γ H2A.X-Nachweises	87
5.6.	Ausblick	90
6.	ZUSAMMENFASSUNG	91
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
8.	LITERATURVERZEICHNIS	95
9.	ANHANG	103
9.1.	Versuchsprotokolle	104

9.1.1. Lymphozyten-Isolierung und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis (γ H2A.X, pATM)	104
9.1.2. Lymphozytenaufbereitung und G ₀ /G ₁ -Assay	107
9.1.3. Flusszytometrischer Nachweis mittels FACS-KIT (γ H2A.X)	108
9.2. Häufigkeitsverteilungen der γH2A.X- und pATM-Foci aller Probanden nach 0 Gy, 4 Gy und 6 Gy	110
9.3. Danksagung	121
9.4. Lebenslauf	122
9.5. Eidesstattliche Versicherung	123

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Die Strahlentherapie ist bei der Behandlung von Tumoren ein wesentlicher Bestandteil des therapeutischen Konzepts. Die applizierte Gesamtdosis wird dabei vor allem durch die unvermeidbare Bestrahlung von umliegendem Normalgewebe und dem damit verbundenen Risiko strahleninduzierter akuter oder chronischer Nebenwirkungen von betroffenen Geweben oder Organen limitiert. Somit wird der Erfolg einer strahlentherapeutischen Behandlung davon bestimmt, dass die zur Heilung nötige Maximaldosis auf den Tumor appliziert werden kann und gleichzeitig die Toleranzdosis der umliegenden Gewebe nicht überschritten wird. Die klinische Strahlenempfindlichkeit, d. h. das Risiko radiogener Nebenwirkungen, ist dabei eng mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit assoziiert (Borgmann et al., 2002, Oppitz et al., 2001, Peacock et al., 2000, Tucker et al., 1992).

Das Konzept der Individualisierung der Strahlentherapie basiert auf der Beobachtung, dass einzelne Patienten¹ sehr unterschiedlich auf Bestrahlung reagieren und dass diese *klinische* Strahlenempfindlichkeit auf Unterschiede in der individuellen *zellulären* Strahlenempfindlichkeit zurückgeführt werden kann. Das Konzept hat zum Ziel, die Gesamtdosis der Bestrahlung dem Risiko des einzelnen Patienten anzupassen und nicht wie bisher, die Gesamtdosis auf Grundlage des Risikos des gesamten Patientenkollektivs festzulegen. Dieses Vorgehen wäre nicht nur mit einer Senkung des Risikos für strahlungsbedingte Schäden bei als strahlensensibel identifizierten Patienten verbunden, sondern würde für die Mehrheit der Patienten eine Erhöhung der zu verschreibenden Dosis erlauben und somit deren Heilungswahrscheinlichkeit erhöhen (Jones et al., 1995). Abschätzungen zufolge wäre durch die Individualisierung der eingesetzten Dosis ein therapeutischer Gewinn von über 20% zu erwarten (Bentzen, 1997, Mackay und Hendry, 1999).

Voraussetzung für diese Individualisierung der Therapie ist die Charakterisierung der Patienten bezüglich ihrer zellulären Strahlenempfindlichkeit. Zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit wurden in der Vergangenheit verschiedene Verfah-

¹ Bei allen Bezeichnungen, die auf Personen bezogen sind, meint die Formulierung beide Geschlechter, unabhängig von der in der Formulierung verwendeten konkreten geschlechtsspezifischen Bezeichnung.

ren entwickelt, die auf dem Nachweis strahleninduzierter DNA-Schäden bzw. deren funktionellen Konsequenzen beruhen. Doch sind diese Methoden generell sehr zeit- und arbeitsintensiv und nicht für den Einsatz im klinischen Kontext oder für größere Patientenkollektive geeignet.

Mit der Entwicklung des sogenannten „Foci-Assays“ steht seit einigen Jahren eine methodische Alternative zur Verfügung, die auf dem Nachweis einzelner strahlungsinduzierter Doppelstrangbrüche basiert. Es wird davon ausgegangen, dass die Strahlenempfindlichkeit von Zellen maßgeblich durch diejenigen Doppelstrangbrüche bedingt wird, die von der Zelle nicht repariert werden konnten. Daher gelten diese residuellen Doppelstrangbrüche als Surrogatmarker der zellulären Strahlenempfindlichkeit und können als sogenannte „Foci“ unter Verwendung geeigneter Antikörper gegen reparaturassoziierte Proteine nachgewiesen werden (vgl. u.a. Löbrich et al., 2010, Redon et al., 2011).

Diese Methode hat das Potenzial, bereits geringe individuelle Unterschiede in der Reaktion auf Bestrahlung darzustellen und bietet zudem die Möglichkeit der Automatisierung. Somit ist sie von größtem klinischem Interesse.

Die Güte des Verfahrens hängt dabei von einigen Faktoren ab, wie z.B. der Wahl des zum Nachweis verwendeten Reparaturproteins, aber auch von methodischen Aspekten, wie z.B. der Erfassungsmethode des Fluoreszenzsignals (mikroskopische Auszählung oder flusszytometrische Messung). Entwickelt wurde der Assay für das reparaturassoziierte Histon-Protein H2A.X in seiner phosphorylierten Form (γ H2A.X). Mittlerweile stehen allerdings kommerziell erwerbbar Antikörper für eine Reihe weiterer reparaturassoziiierter Proteine zur Verfügung. Insbesondere die phosphorylierte Form der Proteinkinase ATM (pATM, ATM: ataxia telangiectasia mutated) ist relevant, da diese in der Signalkaskade der Doppelstrangbruch-Reparatur dem γ H2A.X vorgeschaltet ist und als zentrales Reparaturprotein angesehen wird (vgl. u.a. Bartkova et al., 2005, Tanaka et al., 2007a). Daten bezüglich eines systematischen Vergleichs von γ H2A.X und pATM liegen in der Literatur nicht vor und sind somit für die Arbeitsgruppe „Prädiktion“ des Labors für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie, in welcher die vorliegende Arbeit entstand, ein wichtiger Ausgangspunkt im Rahmen Entwicklung eines klinisch anwendbaren Nachweises der individuellen Strahlenempfindlichkeit.

Neben der Identifizierung des optimalen reparatur-assoziierten Proteins für den Foci-Assay besteht weiterer Klärungsbedarf bezüglich der Methode, mit welcher der Fluoreszenznachweis erfolgen kann: Letzteres ist generell durch mikroskopische Auszählung der einzelnen Foci möglich, kann aber auch mit Hilfe der Flusszytometrie durchgeführt werden. Eine flusszytometrische Methode der Erfassung des Fluoreszenzsignals bietet den großen Vorteil der Automatisierung des Nachweisverfahrens, welche wiederum Voraussetzung für die erfolgreiche Implementierung des Konzepts der Individualisierung in der klinischen Praxis der Strahlentherapie ist.

Von grundlegender Bedeutung ist dabei jedoch der Nachweis, dass auch die typischerweise geringen Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit zwischen den Personen flusszytometrisch dargestellt werden können.

Vor diesem Hintergrund ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Ist die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen pATM im Zusammenhang mit dem Nachweis residueller Doppelstrangbrüche besser geeignet als der Einsatz des etablierten Antikörpers gegen γ H2A.X?
2. Können γ H2A.X- bzw. pATM-Foci als Surrogatmarker der individuellen Strahlenempfindlichkeit den etablierten Nachweis mittels letaler Chromosomenaberrationen ersetzen oder ergänzen?
3. Lassen sich interindividuelle Unterschiede der zellulären Strahlenempfindlichkeit auch durch flusszytometrischen Nachweis fluoreszenzmarkierter Reparaturproteine, hier γ H2A.X, darstellen?

2. EINLEITUNG

Jedes Jahr werden allein in Deutschland ca. 426.000 Krebserkrankungen neu diagnostiziert. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 68,5 und für Frauen bei 69,3 Jahren. Jährlich sterben etwa 216.000 Menschen an malignen Tumoren. Krebsleiden sind damit nach den Herz-Kreislauf-Krankheiten die zweithäufigste Todesursache bei Frauen und Männern in Deutschland. Dabei fallen bei Männern vor allem Lungenkrebs und bei Frauen Brustkrebs ins Gewicht. In höherem Alter dominiert bei Männern der Prostatakrebs und bei beiden Geschlechtern der Darmkrebs (Robert Koch-Institut, 2006). Des Weiteren wird angenommen, dass die Anzahl neuer Krebsfälle in den nächsten zehn Jahren wegen der wachsenden Anzahl älterer Menschen noch deutlich ansteigen wird. Dieses legen Berechnungen nahe, die auf der 10. Bevölkerungsvorausschätzung des Statistischen Bundesamtes und den vom Robert Koch-Institut geschätzten altersspezifischen Krebserkrankungsraten des Jahres 2000 beruhen. Danach würde sich bis 2020 unter anderem durch den demographischen Alterungsprozess die Zahl der jährlichen Krebsneuerkrankungen bei über 65-jährigen Männern um mindestens 50% und bei über 65-jährigen Frauen um mindestens 25% erhöhen. Denn Krebsleiden häufen sich ganz unabhängig von sonstigen Risikofaktoren im höheren Lebensalter. Aber es zeigen sich auch positive Entwicklungen: Insgesamt sind die Überlebenschancen bei Krebs heute besser als vor 20 Jahren. Vergleicht man den Zeitraum von 1985 bis 1988 mit den Jahren 1994 bis 1998, so zeigt sich, dass die 5-Jahres-Überlebensraten bei fast allen bösartigen Tumoren gestiegen sind (Robert Koch-Institut, 2006). Dieses ist zum einen den besseren Früherkennungsmethoden zu verdanken, zum anderen aber auch auf effektivere Therapieansätze zurückzuführen.

2.1. Radiotherapie in der Behandlung maligner Tumoren

Die Radiotherapie nimmt im onkologischen Therapiekonzept eine zentrale Position ein. Neben dem operativ-chirurgischen und dem systemisch-medikamentösen stellt sie einen wichtigen Behandlungsansatz dar, besonders wenn es um lokoregionale Tumorkontrolle geht. Wie auch die operative Behandlung ist die Radiotherapie eine lokalisierte Behandlungsmethode, die aber darüber hinaus großflächiger und -volumiger zur Be-

handlung von (Mikro-)metastasen oder Lymphabflußwegen eingesetzt werden kann und damit am Übergang zur Systemischen Therapie anzusiedeln ist. Mehr als die Hälfte aller erwachsenen Tumorpatienten, die geheilt werden konnten, haben dieses der Radiotherapie – allein oder in Kombination mit anderen Ansätzen eingesetzt – zu verdanken. Und bei mehr als zwei Drittel aller Patienten mit einer unheilbaren Krebserkrankung können durch palliative Bestrahlung eine Minderung der Symptomatik sowie eine Verbesserung der Lebensqualität zu erreichen versucht werden (Sauer und Fietkau, 2011). Auch gibt man der Radiotherapie gegenüber einer Operation den Vorzug, wenn bei gleichen Heilungsaussichten ein kosmetisch oder funktionell besseres Ergebnis erzielt werden kann (Sauer und Fietkau, 2011).

Die Radiotherapie ist somit ein effektiver Therapieansatz zur Behandlung verschiedenster Tumoren, allerdings limitieren assoziierte Schäden im benachbarten Normalgewebe – trotz großer Fortschritte in der Bestrahlungsplanung – in vielen Fällen die Höhe der einsetzbaren Dosis und verhindern auf diese Weise unter Umständen einen größtmöglichen Therapieerfolg (Azria und Magne, 2005, Fernet und Hall, 2004). Hinsichtlich dieser radiotherapie-assoziierten Normalgewebsreaktionen bestehen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten: Trotz absolut identischer Behandlungsmodalitäten scheinen einige Patienten die Therapie gut zu vertragen, wohingegen andere aufgrund zu starker Normalgewebsreaktionen die Behandlung reduzieren oder unterbrechen müssen (Burnet et al., 1996, Fernet und Hall, 2004). Aufgrund der Ergebnisse verschiedener Studien kann angenommen werden, dass die Variabilität in den Reaktionen zwischen den Patienten in erster Linie durch genetische Prädisposition bedingt ist. Dieses können Mutationen oder Genpolymorphismen in denjenigen Genen sein, die an der zellulären Reaktion auf ionisierende Strahlung beteiligt sind (Fernet und Hall, 2008, Rieger et al., 2004, Svensson et al., 2006). Es kann demnach angenommen werden, dass, falls durch einen prädiktiven Ansatz die Toleranz des Normalgewebes einer Person bestimmt werden kann, eine darauf aufbauende Individualisierung der Radiotherapie in der Tumorbehandlung strahlensensiblere Patienten, bei gleichem Behandlungserfolg, vor schweren Nebeneffekten bewahren, sowie bei resistenteren Patienten durch Anpassung der Bestrahlungsdosis eine verbesserte Tumorkontrolle erzielen könnte (Begg, 2006, Fernet und Hall, 2008, Withers, 1986).

2.2. Parameter der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit

Ionisierende Strahlung kann auf direkte oder indirekte Art die DNA einer Zelle schädigen. Im Falle direkter Strahlenwirkung erfolgt eine Energieübertragung unmittelbar auf das DNA-Molekül, dessen Bestandteile in Folge ionisiert oder angeregt werden können. Dieser Effekt dominiert bei Strahlungen mit hohem linearem Energietransfer (LET), z.B. bei schweren Ionen, Neutronen oder α -Teilchen. Bei der indirekten Schädigung entsteht durch die ionisierende Strahlung zunächst ein Radikal, welches dann über eine Radikalkettenreaktion wiederum andere Moleküle schädigt. Diese indirekte Strahlenwirkung ist der primäre Vorgang bei Strahlungen mit niedrigem LET. Zu diesen gehören die Röntgenstrahlung aus der Röntgenröhre sowie Gamma- und Elektronenstrahlung (Sauer, 2011).

Nach Powell und McMillan (1990) werden durch Bestrahlung neben Basenschäden, Einzelstrangbrüchen und „Crosslinks“ auch ca. 40 Doppelstrangbrüche pro 1 Gy und Zelle erzeugt. Von den strahlungsinduzierten Schäden stellen diese DNA-Doppelstrangbrüche auf biologischer Ebene das gravierendste Ereignis dar, da nicht oder fehlerhaft reparierte Doppelstrangbrüche zum Zelltod führen (Goedecke und Pfeiffer, 2008). Löbrich et al. (2010) konnten entsprechend nachweisen, dass die Strahlenempfindlichkeit eines Gewebes stark mit der Anzahl der residuellen, d.h. für die Zellen irreparablen, Doppelstrangbrüche zusammenhängt, nicht aber mit der Anzahl der initial entstehenden Doppelstrangbrüche.

Abbildung 1 zeigt ein Modell der Signalkaskade, welche in Reaktion auf einen Doppelstrangbruch ausgelöst wird. Zentrale Funktionen werden im Rahmen dieses Reparaturprozesses von der Proteinkinase ataxia telangiectasia mutated (ATM) sowie dem Histonprotein H2A.X übernommen.

Im Falle eines Doppelstrangbruches spielt zunächst der MRE11-RAD50-NBS1 (MRN)-Komplex eine wichtige Rolle. Dieser erkennt die geschädigte DNA und leitet ATM in die unmittelbare Nähe der Bruchenden. Damit die Kinase ATM ihre Funktion im Rahmen der Reparatur übernehmen kann, ist eine vorangehende Aktivierung notwendig. Angenommen wird, dass letztendlich Veränderungen in der Chromatinstruktur nach DNA-Schädigung eine Überführung in den aktiven Zustand bewirken, wobei die-

ses speziell nur bei Doppelstrangbrüchen geschieht (Helt et al., 2005, Ismail et al., 2005). Die Aktivierung von ATM beinhaltet zunächst eine Autophosphorylierung des Proteins an Serin1981-Resten. Nachfolgend dissoziiert das ATM-Di- oder Multimer in monomere Einheiten, welche die eigentliche enzymatische Aktivität besitzen (Bakkenist und Kastan, 2003). Phosphoryliertes, d. h. aktives, ATM (pATM) stellt eine Schlüsselkomponente des Reparaturprozesses dar. Die Kinase phosphoryliert am Ort des Doppelstrangbruches, wo sie zu einem Focus akkumuliert, ihrerseits verschiedene Substrate, unter anderem das Histonprotein H2A.X an Serin139-Resten. Zahlreiche phosphorylierte H2A.X-Proteine (γ H2A.X) akkumulieren an den Bruchenden ebenfalls zu einem Focus, zusammen mit weiteren an DNA-Reparatur und Chromatin-Remodelling beteiligten Proteinen und ermöglichen auf diese Weise eine Reparatur des DNA-Schadens (Rogakou et al., 1998).

Da pATM- und γ H2A.X-Foci an den Bruchenden verbleiben, falls die Zelle den Schaden nicht reparieren konnte, kann über die Erfassung dieser Proteine auf residuelle Doppelstrangbrüche bzw. letale Zellschäden geschlossen werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass beide Foci-Entitäten das Vorliegen eines Doppelstrangbruches anzeigen können. Mit Entwicklung spezifischer immunfluoreszenter Antikörper gegen pATM und γ H2A.X ist eine mikroskopische Erfassung der Foci und somit die direkte Betrachtung der zellulären Reparaturprozesse möglich geworden (vgl. u.a. Bonner et al., 2008, Tanaka et al., 2007a).

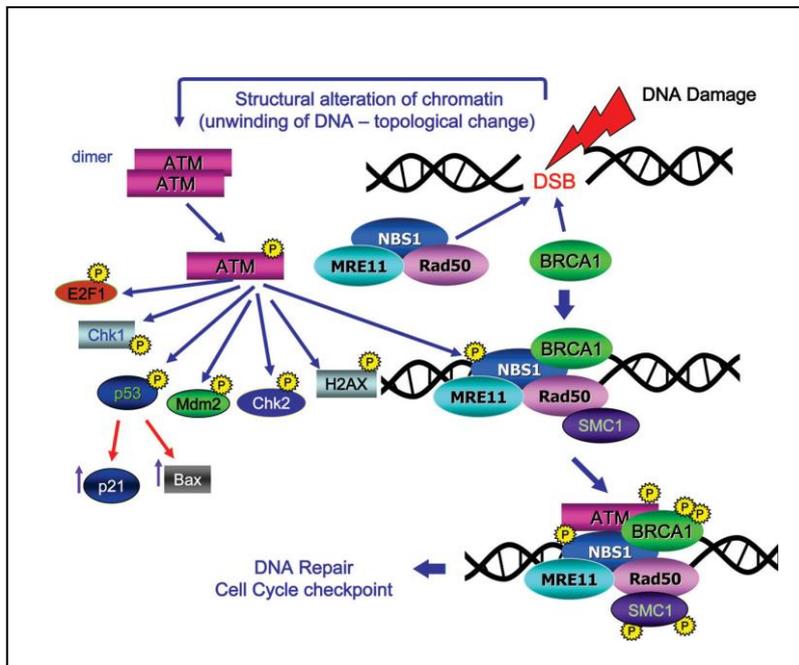


Abbildung 1: Signalkaskade der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (Tanaka et al., 2007a).

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen geschieht in Zellen in der G_0 -Phase ausschließlich mittels nichthomologem End-joining (NHEJ). Durchlaufen die Zellen den Zellzyklus, kann in der S- und G_2 -Phase zusätzlich homologe Rekombination (HR) zum Einsatz kommen.

Der Mechanismus des NHEJ ist allerdings aus zwei Gründen nicht unproblematisch. Zum einen können falsche Basensequenzen generiert werden. Der Vorgang ist somit potentiell mutagen (Pfeiffer et al., 2000). Zum anderen besteht das Risiko, dass bei unzureichender Stabilisierung der Bruchenden, diese abgebaut, fehlverknüpft oder als Chromosomenfragmente verbleiben können. Bei proliferierenden Zellen können in der auf die Bestrahlung folgenden Metaphase in Folge asymmetrischer Austauschvorgänge azentrische und dizentrische Chromosomenaberrationen entstehen, welche letale Ereignisse darstellen, da die Tochterzellen zu keiner weiteren Proliferation fähig sind (Weber und Wenz, 2006).

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ist eine Funktion der zellulären Reparaturkapazität. Im Fall einer zu hohen Anzahl residueller Doppelstrangbrüche folgt die zelluläre Inaktivierung – auch: Zelltod, welche sich allerdings je nach proliferativer Aktivität der Zelle in unterschiedlicher Weise äußern kann.

Bei differenzierten, nicht-proliferierenden Zellen äußert sich Inaktivierung in einem Verlust ihrer spezifischen Funktion. Die betroffenen Zellen befinden sich in der G₀-Phase und lösen sich nach Funktionsverlust durch Apoptose oder Nekrose auf. Zu diesem Zelltyp gehören Nerven- und Muskelzellen.

Für proliferierende bzw. klonogene Zellen, welche Kolonien bilden, ist eine Inaktivierung gleichbedeutend mit dem Verlust ihrer Teilungsfähigkeit und wird daher auch reproduktiver Zelltod genannt. Die Inaktivierung ist Folge letaler chromosomaler Aberrationen. Eine betroffene Zelle kann – trotz letaler Chromosomenaberrationen – weiterhin mikroskopisch sichtbar sein, sie kann Proteinbiosynthese betreiben und noch eine oder zwei Mitosen durchlaufen, bis sie nicht mehr zu weiteren Teilungen fähig und somit inaktiviert ist. Dieses, als reproduktiver Zelltod oder auch Mitosetod bezeichnete Phänomen, ist sowohl für Tumor-, als auch für die Mehrheit „normaler“ humaner Zellen nach Bestrahlung der vorherrschende Inaktivierungsmechanismus. Fibroblasten zeichnen sich in ihrer Reaktion auf Bestrahlung – neben dem Mitosetod – auch dadurch aus, dass es zur terminalen Differenzierung der Zellen kommen kann. In diesem Fall gehen die Zellen nicht nach dem Durchlaufen einiger Mitosen unter, sondern durchlaufen den normalen aber zeitlich vorgezogenen Differenzierungsprozess. Die ausdifferenzierten Funktionszellen entstehen bereits nach nur wenigen Teilungen bzw. Zellzyklen (Carlioni et al., 2001, Sauer, 2011).

Lymphozyten zeigen darüber hinaus nach Bestrahlung, neben der Inaktivierung durch den Mitosetod, auch die Inaktivierung durch Apoptose während der Interphase.

Dieser, als programmierter Zelltod bezeichnete, Prozess stellt ein Sicherungssystem der Zellen dar, durch welches geschädigte Zellen vor Eintritt in den Zellzyklus als solche erkannt und vernichtet werden. Die Apoptose ist ein aktiver Prozess nach irreparabler Zellschädigung und kann lichtmikroskopisch anhand typischer Zellveränderungen detektiert werden. Zu diesen apoptotischen Zellveränderungen gehören Schrumpfung der Zelle, Chromatinkondensation, Bläschenbildung in der Zellmembran und Abschnürung membranumgrenzter Vesikel, sogenannter „apoptotic bodies“, die Zellmembranbestandteile und DNA-Fragmente enthalten (Markova et al., 2011, Sauer, 2011).

Bezüglich Nachweis und Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit können folgende Endpunkte verwendet werden, deren Nachweismethoden im folgenden

Abschnitt detailliert dargestellt werden:

1. Zelluläre Inaktivierung: Der Verlust des klonogenen Überlebens von Zellen nach Bestrahlung bildet direkt deren radiogene Inaktivierung ab.
2. Strahleninduzierte letale Chromosomenaberrationen sind Ausdruck fehlender oder fehlerhafter DNA-Doppelstrangbruchreparatur.
3. Reparatur-assoziierte Proteine markieren die Prozesse der DNA-Doppelstrangbruchreparatur nach Bestrahlung.

2.3. Nachweismethoden der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ist anhand der unter 2.2 dargestellten Surrogatmarker mittels verschiedener Methoden nachweisbar.

2.3.1. Kolonietest

Kolonietests werden genutzt, um den Anteil überlebender bzw. klonogener Zellen nach Bestrahlung zu bestimmen und somit die Strahlenempfindlichkeit der Zellen abzubilden. Sie basieren auf der radiogenen Inaktivierung der Zellen, die zum Verlust der Proliferationsaktivität führt. Der Nutzen dieses Nachweisverfahrens wurde bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben (vgl. Puck und Marcus, 1956) und gilt bis heute als optimale Methode zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit (Pomp et al., 1996). Allerdings sind Kolonietests zum einen sehr zeitaufwändig, da die Zellen nach Bestrahlung für eine bis zwei Wochen kultiviert werden müssen, bevor ein Ergebnis sichtbar ist (Barber et al., 2000). Zum anderen ist ihr Einsatz auf proliferierende Zellen beschränkt und somit für viele Zellarten, beispielsweise Lymphozyten, welche nicht *in vitro* speziell zur Proliferation angeregt wurden, nicht geeignet (Oppitz et al., 2001). Für den Einsatz in klinischen Situationen sind Kolonietests somit ungeeignet (Barber et al., 2000).

2.3.2. Chromosomenaberrationen

Der sehr hohe Zeitbedarf des Kolonietests sowie seine Anwendungsbeschränkung auf etablierte klonogene Zelllinien können durch Nutzung des G_0/G_1 -Assays umgangen werden. Dieser ist in wenigen Tagen und sehr gut mittels Lymphozyten durchführbar (Barber et al., 2000). Lymphozyten bieten sich als Zellsystem an, da sie von der individuellen Person schnell und unkompliziert gewonnen und ebenso aufbereitet werden können. Der G_0/G_1 -Assay basiert auf Auszählung letaler chromosomaler Aberrationen bei in der Metaphase fixierten Zellen. Letale Chromosomenaberrationen gelten als wichtiger Surrogatmarker der zellulären Strahlenempfindlichkeit. Ihr Ausmaß konnte bereits mehrfach mit dem Risiko strahleninduzierter Nebenwirkungen im klinischen Kontext assoziiert werden (vgl. u.a. Barber et al., 2000, Borgmann et al., 2008, Borgmann et al., 2002, Hoeller et al., 2003). Voraussetzung – und ein Nachteil – dieses Verfahrens ist allerdings die Stimulation der Zellen zum Eintritt in den Zellzyklus mittels Phytohaemagglutinin A (PHA) (vgl. u.a. Hoeller et al., 2003, Leonard et al., 2005). Da bislang nicht ausreichend untersucht wurde, in wieweit sich PHA auf die DNA-Reparaturfähigkeiten von Lymphozyten auswirkt, sollten Ergebnisse aufgrund möglicher Artefakte vorsichtig interpretiert werden. So konnten Carloni et al. (2001) zeigen, dass die Gabe von PHA – und somit der proliferative Status der Lymphozyten – ihr Überleben nach Bestrahlung beeinflusst. Sie fanden deutlich weniger Apoptose bei Lymphozyten, wenn diese nach Bestrahlung zum Eintritt in den Zellzyklus stimuliert wurden. Weiterführende Untersuchungen wären an dieser Stelle wünschenswert. Darüber hinaus bestehen aber wesentliche Nachteile des G_0/G_1 -Assays in seinem immer noch relativ hohen Personal- und Zeitaufwand. Auch ist bislang keine Automatisierung des Verfahrens möglich. Der Einsatz im klinischen Kontext ist vor diesem Hintergrund wenig praktikabel.

2.3.3. Reparatur-assoziierte Proteine

Eine Alternative zum G_0/G_1 -Assay, die keine Stimulation der Zellen zum Eintritt in den Zellzyklus voraussetzt, ist durch den Nachweis akkumulierter reparatur-assoziiierter Proteine am residuellen Doppelstrangbruch gegeben. Es werden in diesem Fall direkt einzelne Schädigungen bzw. Reparaturereignisse nachgewiesen. Die residuellen Akku-

mulationen gelten dabei als Surrogatmarker der individuellen Strahlenempfindlichkeit (Rogakou et al., 1998, Rube et al., 2008). Etabliert ist dieser sogenannte „Foci-Nachweis“ in erster Linie für die Proteine γ H2A.X und 53BP1, kann aber auch mittels pATM durchgeführt werden.

Wie für γ H2A.X kann auch bei pATM eine Akkumulation am Doppelstrangbruch nachgewiesen werden, welche bestehen bleibt, sofern der Schaden nicht repariert werden konnte. pATM ist, wie oben dargestellt, ein Schlüsselprotein der Reparaturkaskade und für die Phosphorylierung von H2A.X verantwortlich (Rube et al., 2011, Tanaka et al., 2007a). Da angenommen werden kann, dass ein Parameter zelluläre Reaktionen auf DNA-Schädigung umso besser abbildet, je früher er in die Reaktionskaskade eingreift, stellt sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, ob pATM zur Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit besser geeignet ist als γ H2A.X.

Entwicklung und kommerzieller Vertrieb immunfluoreszenter γ H2A.X- und pATM-Antikörper ermöglichten die Detektion der residuellen Doppelstrangbrüche, indem die Proteinakkumulationen als Foci sichtbar gemacht werden. Jeder Focus entspricht dabei einem einzelnen Doppelstrangbruch und kann mikroskopisch ausgezählt werden. Auch ist die zeitsparende flusszytometrische Messung der γ H2A.X- und pATM-Signale möglich (vgl. u.a. Bartkova et al., 2005, Huang et al., 2005, Kurose et al., 2006, Rogakou et al., 1998, Sedelnikova et al., 2002, Tanaka et al., 2007a).

Die (mikroskopische) Auszählung der Foci hat mehrere Vorteile. Ein Vorteil besteht darin, dass die Reparaturvorgänge in den Zellen direkt abgebildet werden können. Der G₀/G₁-Assay ermöglicht hingegen nur die Betrachtung des prozessierten Ergebnisses des DNA-Schadens. Zusätzlich können mittels Foci-Nachweis die Reparaturleistungen der Zellen im zeitlichen Verlauf, als Reparaturkinetik, dargestellt werden (vgl. u.a. Banáth et al., 2010, Mahrhofer et al., 2006).

Des Weiteren zeichnet sich dieses Nachweisverfahren durch ein hohes Auflösungsvermögen aus. In Abhängigkeit von der Anzahl endogener bzw. spontan entstehender Foci in der untersuchten Zellentität, ist sein Einsatz bereits nach Dosen im mGy-Bereich beispielsweise für Lymphozyten oder Fibroblasten möglich, da die Anzahl strahlungsinduzierter zusätzlicher Foci gegenüber dem „Hintergrund“ spontaner Foci abgrenzbar ist. Der G₀/G₁-Assay ist demgegenüber erst ab einer Dosis von 0.5 Gy differenzierungsfä-

hig. Da die Strahlenempfindlichkeit mit der – eher geringen – Anzahl residueller Doppelstrangbrüche zusammenhängt, ist die überlegene Sensitivität des Foci-Nachweises von großer Relevanz (Löbrich et al., 2010).

Der Foci-Nachweis besitzt darüber hinaus von den in diesem Abschnitt dargestellten Verfahren das größte Automatisierungspotential. Um einen Einsatz im klinischen Alltag möglich zu machen, muss ein Verfahren eine Einschätzung der individuellen Strahlenempfindlichkeit mit geringem Zeit- und Personalaufwand ermöglichen. Im Rahmen der mikroskopischen Foci-Zählung wurden bereits vielversprechende Versuche einer Automatisierung unternommen (vgl. u.a. Barber et al., 2007, Lavaf et al., 2009). Sie haben sich allerdings bislang nicht gegenüber der manuellen Auszählung durchsetzen bzw. diese ersetzen können. Die flusszytometrische Erfassung der Foci-Signale bietet ebenfalls gute Möglichkeiten einer automatisierten Durchführung bzw. kommt standardmäßig bereits mit deutlich weniger zeitlichen und personellen Ressourcen aus als das mikroskopische Verfahren. Allerdings wird ihr Einsatz bislang von ihrer gegenüber dem mikroskopischen Verfahren geringeren Sensitivität begrenzt. Auch ist noch nicht ausreichend untersucht, inwiefern die Ergebnisse von der Tatsache beeinflusst werden, dass die Gesamt-Fluoreszenzintensität einer Zelle – und nicht nur einzelne Foci-Signale – erfasst wird (vgl. u.a. Horn et al., 2011, MacPhail et al., 2003, Mognato et al., 2009, Tanaka et al., 2007a).

Aus dem Dargestellten wird einerseits deutlich, dass mit dem Foci-Nachweis ein potentes Verfahren zur Darstellung strahlungsinduzierter DNA-Doppelstrangbrüche zur Verfügung steht, andererseits aber noch weiterer Klärungsbedarf bezüglich Zielprotein und Automatisierung der Durchführung besteht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Beschreibung der untersuchten Probanden

In die Untersuchung wurden 21 Personen eingeschlossen. Einschlusskriterien waren: ein Mindestalter von 18 Jahren sowie das Fehlen relevanter Vorerkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen. Ebenfalls sollte bislang keine der Personen eine Radiotherapie erhalten haben.

Nach Zustimmung der zuständigen Ethikkommission und eingeholtem Einverständnis – entsprechend einem „informed consent“ – der Personen wurde von Dezember 2010 bis April 2011 bei jedem Probanden eine periphere venöse Blutentnahme durchgeführt. Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei 36 Jahren mit einem Range von 21 bis 63 Jahren, 62% von ihnen waren weiblich, 38% männlich.

Für alle 21 Personen erfolgte die Bestimmung ihrer Strahlensensibilität mittels Fluoreszenzmikroskopie. Für 16 der Probanden wurden Chromosomenaberrationen mittels G₀/G₁-Assay untersucht. Das Durchschnittsalter dieser Stichprobe betrug 36 Jahre, mit einem Range von 21 bis 63 Jahren, 63% waren weiblich, 37% männlich.

Bei 7 Personen wurde zusätzlich eine durchflusszytometrische Untersuchung der Strahlensensibilität vorgenommen. Das Durchschnittsalter dieser Stichprobe betrug 31 Jahre, mit einem Range von 27 bis 36 Jahren, 57% waren weiblich, 43% männlich.

3.2. Gewinnung und Aufbereitung der Lymphozyten

Vollblut gesunder Menschen enthält ca. 4.000-10.000 Leukozyten pro Mikroliter. Einen Anteil von 20-40% nehmen dabei die Lymphozyten (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen) ein.

Zur Gewinnung der Lymphozyten wurden von jeder Person 15 ml peripheres venöses Blut in heparinisierte Monovetten entnommen. Hiervon wurden 5 ml für die Metaphasentechnik und die restlichen 10 ml für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Für die Untersuchung mittels Flusszytometrie erfolgte eine gesonderte Entnahme von jeweils 10 ml Blut.

Zur Bestimmung der Chromosomenaberrationen erfolgte die Bestrahlung der Proben als Vollblut. Dazu wurde das entnommene Blut direkt im Anschluss in 25 cm² Zellkul-

turflaschen überführt. Die Proben zur mikroskopischen und flusszytometrischen Untersuchung wurden zur Isolierung der Lymphozyten weiter aufbereitet: Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte nach dem Ficoll-Gradienten-Prinzip, einer Dichtegradienten-Zentrifugation. Es wurden direkt nach der Entnahme jeweils 5 ml Blut und 5 ml im Wasserbad auf 37°C angewärmtes Natriumchlorid (NaCl, 0.9%) in einem 15 ml Spitzboden-Röhrchen vermischt. Von dem verdünnten Blut wurden erneut jeweils 5 ml vorsichtig über die gleiche Menge an ebenfalls angewärmtem Ficoll-Paque in Spitzboden-Röhrchen geschichtet. Diese wurden dann für 30 Minuten bei 437 G zentrifugiert (bei Raumtemperatur, ohne Bremse um die Schichtung nicht zu zerstören). Dabei bildete sich eine weißliche Zellsuspensionsschicht zwischen den Phasen, welche periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) enthält. Den Hauptteil der PBMC machen Lymphozyten (sowie in geringerem Maße Monozyten) aus. Diese sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/ Thrombozyten) und Ficoll-Paque an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen. Im Anschluss erfolgte die Entnahme dieser Zwischenschicht mittels 3 ml-Transfer-Pipette. Die Zellsuspension wurde auf drei (Mikroskopie) bzw. vier (Flusszytometrie) neue Spitzboden-Röhrchen verteilt und mit jeweils 10 ml im Wasserbad auf 37°C angewärmtem Roswell-Park-Memorial-Institute (RPMI-)Medium vermischt. Das Medium war mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 5% L-Glutamin versetzt. Nach mehrmaligem Waschen der Lymphozyten erfolgte die Resuspension in 5 ml Medium und die Überführung in 25 cm² Zellkulturflaschen, in welchen die Zellen im Anschluss bestrahlt wurden.

3.3. Bestrahlung und Dosimetrie

Die Bestrahlung erfolgte mit einer 200 kV Röntgenröhre bei einem Röhrenstrom von 20 mA und einer Spannung von 200 kV. Als Zusatzfilter wurde ein 0.5 mm starker Kupfer-Filter angebracht. Zur Eichung der Röntgenröhre wurde ein Duplexdosimeter verwendet, welches mit einer Strontium-Radium-Ionisationskammer kalibriert wurde. Alle durchgeführten Bestrahlungen wurden mit einer Dosisrate von 2 Gy pro Minute bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.4. Angewandte Methoden zur Messung von DNA-Strangbrüchen und DNA-Reparatur

3.4.1. γ H2A.X-und pATM-Immunfluoreszenzassay

Einen der frühesten Schritte in der zellulären Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche nach ionisierender Bestrahlung stellt die Phosphorylierung des Histonproteins H2A.X, einer Isoform des Histons H2A, am Serinrest 139 dar. Diese Phosphorylierung ist entscheidend für die Rekrutierung der DNA-Reparatur-Maschinerie zu dieser Stelle des Bruchs und somit Voraussetzung für eine spätere mögliche Reparatur des Schadens. Mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen diese phosphorylierte Form des Histonproteins können die Stellen der Doppelstrangbrüche markiert und später in Fluoreszenzmikroskop detektiert und ausgezählt werden. Hierdurch kann auf die Reparaturfähigkeit der Zellen nach Bestrahlung geschlossen werden. Es wird davon ausgegangen, dass sich mit dieser Methode selektiv DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen lassen (Rothkamm et al., 2003). Ebenfalls an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung beteiligt ist, wie bereits erwähnt wurde, das Protein ATM. Seine Aktivierung durch Autophosphorylierung wird vermutlich durch einen an den Doppelstrangbruch gebundenen Komplex aus den Proteinen MRE11, Rad50 und NBS1 initiiert und es trägt im aktivierten Zustand wiederum zur Phosphorylierung von H2A.X bei. In einer Zelle, welche radiogene Doppelstrangbrüche repariert, können diese phosphorylierten Proteine (pATM) ebenfalls mit spezifischen, fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert und als leuchtende Foci registriert werden.

Indem in dieser Studie den bestrahlten Zellen 24 Stunden Reparaturzeit gegeben wurde, werden später speziell nur diejenigen Doppelstrangbrüche markiert, welche erkannt und durch den Reparaturmechanismus gewissermaßen markiert wurden, aber nicht mehr repariert werden konnten. Diese sogenannten „residuellen Doppelstrangbrüche“ dienen der Einschätzung der individuellen Strahlensensibilität der Probanden.

3.4.1.1. Erstellung der Präparate und Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Zur Erzeugung der DNA-Schäden wurden die drei Proben jedes Probanden mit 0, 4 und 6 Gy bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Dosisrate von 2 Gy/min bei

Raumtemperatur. Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Lymphozyten im Medium für einen Tag im Brutschrank (5% Kohlenstoffdioxid (CO₂)) verwahrt. Nachfolgend wurde die Suspension erneut in Spitzboden-Röhrchen überführt und es erfolgte nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 280 G und Raumtemperatur die Ersetzung des Mediums durch 4 ml PBS (phosphate buffered saline; pH-Wert: 7.2). Mittels eines Zellzählers wurde die Zellzahl bestimmt und auf eine Konzentration von 10⁵ Zellen pro 200µl Probe eingestellt. Aus jeder der drei Proben jedes Probanden wurden zwei Mal jeweils 200 µl Zellsuspension mittels einer Cytospin-Zentrifuge auf zuvor beschriftete Objektträger aufgebracht. Direkt im Anschluss – und somit insgesamt ca. 24 Stunden nach Bestrahlung – erfolgte die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern mit 2%igem Formaldehyd. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellmembranen für fünf Minuten mit 0.1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Dieses ist notwendig, da eine Fixierung mit Formaldehyd nicht die Durchlässigkeit der Zellmembran für Antikörper und Farbstoffe erhöht, sodass eine zusätzliche Behandlung mit nichtionischen Detergenzien wie Triton X-100 notwendig wird, um die Anfärbung der DNA-Doppelstrangbrüche mittels Fluoreszenzfarbstoff-Antikörpern zu ermöglichen. Im Anschluss an die Permeabilisierung wurden die Objektträger erneut gewaschen und dann zunächst für eine Stunde in eine „Blockierungslösung“ mit 10% bovinem Serum-Albumin (BSA) in PBS gelegt, bevor die Antikörperlösung aufgetragen werden konnte. Da bei der Verwendung von Antikörpern falsch-positive Ergebnisse durch unspezifische Bindung sowohl eines Primär- als auch eines Sekundärantikörpers oder durch Kreuzreaktivität erzeugt werden können, ist es erforderlich, unspezifische Bindungsstellen zunächst mit einem unspezifisch bindenden Protein, wie z. B. BSA, abzusättigen und sie auf diese Weise zu blockieren. Im Anschluss an die Blockierung wurden die Objektträger in eine Inkubationskammer gelegt und die Bereiche, in denen sich die Zellen befanden mit jeweils 50 µl Antikörper-Lösung bedeckt. Diese enthielt sowohl den gegen γ H2A.X als auch einen gegen pATM gerichteten Primär-Antikörper. In der dunklen Inkubationskammer wurden die bedeckten Objektträger zunächst zwei Stunden bei Raumtemperatur, im Anschluss über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Objektträger nach dreimaligem Waschen erneut in die Inkubationskammer gelegt und die zweiten Antikörper aufgetragen. Hierbei handelte es sich um fluoreszenzmarkierte Sekundär-Antikörper, welche gegen die Primär-Antikörper gerichtet

waren. Nach einer Einwirkzeit von einer Stunde in der Feuchtkammer folgte ein abschließendes dreimaliges Waschen und im Anschluss die Abdeckung mittels Deckglas, wobei zuvor auf jeden Objektträger 15 µl Vectashield-Mounting Medium zum Schutz der Fluorochrome aufgetragen worden war. Das Mounting Medium war zusätzlich mit 0.1% 4'-6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) versetzt, welches der Anfärbung der Lymphozytenkerne diente. Die „Kerngegenfärbung“ mit DAPI wurde zur Identifikation der einzelnen Zellen unter dem Mikroskop genutzt. DAPI ist ein Farbstoff zur Anfärbung von DNA, der sich sowohl spezifisch an Adenin/Thymin-Basenpaare bindet als auch in Guanin/Cytosin-Basenpaare interkaliert. Die Deckgläser wurden zum Schluss mittels Nagellack versiegelt.

3.4.1.2. Mikroskopische Auswertung der Präparate

Die mit den Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorescein Isothiocyanat, FITC: grün fluoreszierend, gekoppelt an Anti-pATM-Antikörper sowie Alexa 594: rot fluoreszierend, gekoppelt an Anti- γ H2A.X-Antikörper) gefärbten Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop unter der Verwendung einer Öl-Immersion bei einer 1000-fachen Vergrößerung ausgewertet. Pro Dosiswert wurden zwei Objektträger hergestellt, wovon einer ausgezählt wurde und der andere zur Reserve diente. Ausgewertet wurden demnach drei Objektträger pro Proband. Von jedem Objektträger wurden die Foci von 100 Zellen sowohl für markiertes γ H2A.X als auch pATM gezählt. Nach der Zählung wurden die mittleren Anzahlen der Foci pro Zelle und Dosiswert sowie die Standardabweichungen bestimmt. Die weitere statistische Auswertung erfolgte in GraphPad Prism 4. Zusammenhänge zwischen jeweils zwei Variablen wurden, sofern nicht anders angegeben, mittels Produkt-Moment-Korrelation und Linearer Regression berechnet.

3.4.2. G₀/G₁-Assay

Für die vorliegende Studie waren ausschließlich Chromosomenaberrationen von Interesse, die für das Absterben der Zellen nach Bestrahlung verantwortlich sind. Die strahleninduzierten Chromosomenaberrationen wurden mit der Metaphasen-Technik ebenfalls an Lymphozyten des peripheren venösen Blutes untersucht. Diese Methode ermöglicht die Darstellung von Chromosomen, deren Gesamtbild als Karyogramm bezeichnet

wird.

3.4.2.1. *Bestrahlung und Stimulierung der Lymphozyten*

Zunächst wurden Parallelkulturen in 25 cm² Zellkulturflaschen mit jeweils 1 ml Vollblut für die unbestrahlte Kontrolle sowie für die mit 3 Gy und 6 Gy bestrahlten Kulturen angelegt.

Danach erfolgte die Verdünnung des Blutes in RPMI-Medium im Verhältnis 1:10 (1 ml Vollblut und 9 ml RPMI). Das RPMI war ebenfalls mit 10% FCS und 5% L-Glutamin versetzt. Anschließend wurden die Blutkulturen mit 3 Gy und 6 Gy bestrahlt bzw. für die Kontrolle unbestrahlt belassen.

Zur Stimulierung der Lymphozyten aus der G₀-Phase in den Zellzyklus wurden die Kulturen anschließend mit 2.5% Phytohaemagglutinin A versetzt. Im Anschluss daran wurden die Blutkulturen bei 37°C für 72 Stunden in einem 5% CO₂-Brutschrank inkubiert.

Eine optimale Pufferung während dieser Inkubationszeit gewährleisteten die in den Blutkulturen vorhandenen Erythrozyten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde den Blutkulturen zur Fixierung der Lymphozyten in der Metaphase 1 µl/ml Colcemid, also 10 µl je Probe, zugegeben. Colcemid ist der Handelsname von Colchicin. Diese Substanz wirkt als Spindelfasergift und ist ein Alkaloid der Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale*) und der Afrikanischen Ruhmeskrone (*Glorisa superba*). Während der Metaphase der Mitose ordnen sich die Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle an. In der Anaphase setzen die Fasern des Spindelapparates an den sich trennenden Chromosomen an und ziehen diese zu den beiden entgegengesetzten Polen der Zelle. Dadurch wird eine gleichmäßige Aufteilung der beiden Schwesterchromatiden eines Chromosoms auf die Tochterzellen erreicht. Die Zugabe von Colchicin bewirkt, dass die Zellen in der Metaphase angehalten werden, indem die Trennung der beiden Schwesterchromatiden verhindert wird, sodass die Chromosomen in der Äquatorialebene arretiert werden. Nur in diesem Zustand können die Chromosomenschäden mikroskopisch untersucht werden.

Nach der Zugabe von Colcemid wurden die Blutkulturen für 4-6 Stunden bei 37°C inkubiert. Dies war notwendig, um eine höhere Anzahl an Lymphozyten, welche sich in

der Metaphase befinden, zu erhalten. Nach der Inkubationszeit bei 37°C wurde das Blut in 15 ml-Spitzboden-Röhrchen überführt und bei 280 G für fünf Minuten bei 20°C zentrifugiert und anschließend der Überstand bis auf ca. 1 ml über dem Sediment mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

3.4.2.2. *Hypotonische Behandlung und Fixierung*

Die Reste von Serum und Medium mussten zunächst aus den sedimentierten Blutkulturen entfernt werden. Dazu wurden die Proben mit PBS gewaschen, indem tropfenweise 10 ml PBS auf die sich auf dem Schüttler befindenden sedimentierten Proben gegeben wurde und anschließend eine Zentrifugation bei 280 G für die Dauer von fünf Minuten bei 20°C erfolgte. Der Überstand wurde entfernt. Um die Metaphasezellen in ein hypotonisches Milieu zu überführen, erfolgte ebenfalls auf dem Schüttler die tropfenweise Zugabe von 10 ml Kaliumchlorid (KCl, 0.56%ig, 0.0075 M). Die hypotonische Behandlung mit KCl führte dazu, dass die Lymphozyten Wasser aufnahmen und somit größer wurden. Im Anschluss daran fand ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 280 G für fünf Minuten statt. Der Überstand wurde verworfen. Um die Zellen zu fixieren und zu konservieren, wurde nun Carnoy's Fixativ (Methanol, Chloroform, Essigsäure im Verhältnis 6:3:1) tropfenweise den Zellen hinzu gegeben. Die Zellsuspension wurde auf dem Schüttler verwirbelt, um zu verhindern, dass sich die Zellen auf dem Boden der Spitzboden-Röhrchen absetzen oder dass sie bei der Fixierung verklumpten. Es folgte eine erneute Zentrifugation. Mit dem Entfernen des Überstands konnten die wässrigen Bestandteile weitestgehend beseitigt und eine optimale Konservierung der Zellen ermöglicht werden. Der oben beschriebene Fixierungsschritt wurde auf dem Schüttler wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand bis auf ca. 2 ml über dem Sediment abgesaugt. Die so aufbereiteten Zellen konnten nun kurzfristig im Kühlschrank oder bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.

Um die Qualität der Präparate zu verbessern, wurde zunächst die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählers bestimmt und dementsprechend das notwendige Volumen errechnet, um eine einheitliche Konzentration von 10^6 Zellen/ml pro Probe zu erhalten. Dazu mussten die Zellsuspensionen zuerst für fünf Minuten bei 280 G zentrifugiert werden. Hiernach wurde der Überstand bis auf ca. 1.5 ml über dem Sediment entfernt, Carnoy's Fixativ hinzugegeben und die Suspension anschließend auf dem Schüttler vermischt. Nun konn-

ten die Zellen entweder direkt auf die Objektträger aufgetropft oder bei -20°C eingefroren werden.

3.4.2.3. *Anfertigung der Präparate und Färbung mit Giemsa*

Für die Herstellung der Chromosomenpräparate wurde ein Objektträger mit einem dünnen Wasserfilm (*Aqua destillata*) vollständig überzogen. Nachdem die Zellen auf dem Schüttler in der Suspension gut verteilt wurden, erfolgte das Pipettieren von $30\ \mu\text{l}$ Zellsuspension in zwei Schüben auf die beiden Hälften des Objektträgers. Der Wasserfilm wurde von dem in Carnoy's enthaltenen Alkohol verdrängt und die Zellen wurden - vom Wasser getragen - auf dem Objektträger flächig verteilt. Durch den Alkohol kamen dann die hypotonisch vergrößerten Zellen zum Platzen, sodass die darin enthaltenen Chromosomen auf diese Art und Weise voneinander auf dem Objektträger hinreichend gut verteilt wurden. Die Objektträger wurden 20 Minuten an der Luft getrocknet.

Zur Färbung der Chromosomen wurden die Objektträger für 8-10 Minuten in einem Küvettenständer mit 6 ml Giemsa-Farbstoff (2%ig in 150 ml PBS) gegeben. Der überschüssige Giemsa-Farbstoff wurde durch mehrere kurze Waschschrte (mittels *Aqua destillata*) entfernt. Danach wurden die Objektträger unter dem Abzug für mehrere Stunden vollständig getrocknet. Anschließend wurde auf die Objektträger ein Tropfen Kunstharz (Entellan, eine Lösung von Polymeren in Xylol) gegeben und das Präparat mit einem Deckgläschen versehen. Die erhaltenen Präparate wurden bei Raumtemperatur gelagert und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Der Farbstoff Giemsa lagert sich spezifisch an den Chromosomen an, sodass sie im Lichtmikroskop violett erscheinen.

3.4.2.4. *Mikroskopische Auswertung der Chromosomenaberrationen*

Die mit Giemsa-Lösung gefärbten Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop unter der Verwendung einer Öl-Immersion bei einer 1000fachen Vergrößerung ausgewertet. Die Auswertung erfolgte computergestützt, d.h. das Bild der lichtmikroskopisch eingestellten Metaphasen wurde über eine Charge-Coupled Device (CCD-)Kamera auf den Bildschirm des Computers übertragen und über eine spezielle Bildauswertungssoftware

verarbeitet. Dies ermöglichte eine sichere und vor allem schnellere Zählung der Chromosomen. Pro Dosiswert wurden zwei Objektträger hergestellt (für die 0 Gy-Kontrolle nur ein Objektträger). Hieraus ergaben sich fünf Präparate für jeden Probanden. Pro Objektträger wurden 25 Metaphasen ausgezählt. Damit ergab sich eine Gesamtzahl von 50 Metaphasen pro Dosispunkt bei 3 und 6 Gy sowie 25 Metaphasen für den Kontrollwert. Bei der Zählung wurde die Anzahl aller Chromosomen-Fragmente und dizentrischen Chromosomen pro Zelle bestimmt. Durch Subtraktion der Zahl der Chromosomen-Fragmente unbestrahlter Lymphozyten von der Anzahl der Chromosomen-Fragmente in bestrahlten Zellen konnte die Anzahl strahleninduzierter Deletionen bestimmt werden. Die strahleninduzierten Deletionen sind das Resultat von interstitiellen und terminalen Deletionen. Sie können mittels einheitlicher Giemsa-Färbung nicht voneinander unterschieden werden und werden im Folgenden als Deletionen bezeichnet. Pro Dosiswert wurde der Mittelwert der Deletionen ermittelt und die Standardabweichung berechnet. Zusammenhänge zwischen jeweils zwei Variablen wurden, sofern nicht anders angegeben, mittels Produkt-Moment-Korrelation und Linearer Regression berechnet.

3.4.3. Flusszytometrische Auswertung der γ H2A.X-Signale

Als weitere Methode des Nachweises residueller DNA-Doppelstrangbrüche über das phosphorylierte Histon H2A.X kam im Rahmen dieser Studie eine durchflusszytometrische Untersuchung zum Einsatz. Ziel war es, die auf diesem Wege ermittelten Strahlensensibilitäten der Personen mit den durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelten Werten zu vergleichen. Der Begriff „FACS“ steht in diesem Zusammenhang für „Fluorescence Activated Cell Sorting“. Obwohl „FACS“ ursprünglich ein Markenname der Firma Becton Dickinson (BD) war, wird es heute oft als Synonym für die Durchflusszytometrie genutzt.

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, welches zur quantitativen Bestimmung von zum Beispiel bestimmten Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen genutzt werden kann. Die Basis ist zunächst, wie bei der Fluoreszenzmikroskopie, eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern gegen den relevanten Zellbestandteil. Nach der Vorbehandlung mit diesen Antikörpern passieren die in Suspension vorliegenden Zellen, in diesem Fall Lymphozyten,

einzelnen einen fokussierten Laserstrahl. Dabei werden unter anderem die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses wird quantifiziert und dient, da es sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle verhält, als Maß für die Menge des Antigens pro Zelle, gegen welches der Antikörper gerichtet war (in diesem Fall das Histon γ H2A.X). Die Zellen streuen aber auch einen Teil des Lichts, welches ebenfalls mittels der Detektoren (Photomultiplier genannt) nachgewiesen wird. Dieses Streulicht wird vom Fluoreszenzlicht separat detektiert. Über die Quantifizierung von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht können zusätzlich Informationen über die Zellen erhoben werden. So ist das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Hieraus lässt sich auf die Zellgröße schließen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideways Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel und wird von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst. Es lässt auf die Komplexität der Zelle schließen. In der vorliegenden Studie wurden FSC und SSC dazu verwendet, zu kontrollieren, dass nur einzeln liegende Zellen ausgewertet sowie Messwerte von Zelltrümmern ausgeschlossen wurden.

3.4.3.1. Vorbereitung und Anfärbung der Zellen

Nach Isolation der Lymphozyten, wie oben beschrieben, erfolgte die Bestrahlung der Proben jedes Probanden mit 0, 4, 6 und 8 Gy. Bestrahlt wurde ebenfalls mit einer Dosisrate von 2 Gy/min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Lymphozyten wie im Falle der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung im Medium für einen Tag im Brutschrank (5% CO₂) verwahrt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Suspension erneut in Spitzboden-Röhrchen überführt und es erfolgte der Ersatz des Mediums durch 2 ml PBS (nach Zentrifugation, fünf Minuten, 280 G, Raumtemperatur). Nach erneutem Zentrifugieren (fünf Minuten, 280 G, Raumtemperatur) und Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in Fixierungslösung (im FACS-Kit enthalten) resuspendiert. Die Fixierung wurde somit ebenfalls 24 Stunden nach Bestrahlung durchgeführt. Es folgte zweimaliges Waschen mit anschließender Resuspension in einer Lösung aus 0.2% Triton X-100 in PBS zur Permeabilisierung der Zellmembran. Zur Permeabilisierungslösung wurde direkt im Anschluss der bereits gebrauchsfertig vorliegende und mit einem Fluorochrom

(FITC) verbundene Antikörper gegeben. Die Inkubation erfolgte in Dunkelheit auf Eis für 20 Minuten. Eine Belichtung der Proben wurde ab jetzt weitestgehend vermieden. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben zwei Mal mit 0.1% Tween 20 in PBS gewaschen und abschließend in 0.5 ml PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

3.4.3.2. *Durchflusszytometrische Messung*

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit einem FACSCanto der Firma Becton/Dickinson, welches über zwei Laser mit 488 nm und 633 nm Wellenlänge verfügt. Es wurden sowohl das vom Fluorochrom (FITC) emittierte Fluoreszenzlicht, welches mit der Menge an phosphoryliertem H2A.X korreliert, als auch die Werte des FSC und SSC registriert und mit Hilfe der Software „FACSDiva“ ausgewertet. Pro Dosiswert wurden 50.000 Zellen registriert. (Bei einigen wenigen Proben musste diese Anzahl allerdings reduziert werden, da zu wenige Zellen in der Probe vorlagen. Es wurden aber immer mindestens 10.000 Zellen ausgewertet). Das Gating erfolgte anhand der Auftragung von SSC-A (logarithmisch) versus FSC-A (linear), wobei „A“ jeweils für das Integral des Signals, d.h. die Fläche unter der Kurve („Area“), steht. Bei der Darstellung zeigte sich in jeder Probe eine gut abgrenzbare Zellpopulation, welche jeweils auch den Hauptteil der Fälle enthielt. Diese bildete die Grundlage der weiteren Auswertung. Bestimmt wurde der Median des FITC-A der ausgewählten Population in „FACSDiva“. Dieser diente als Endpunkt einer Messung, da er robuster als das arithmetische Mittel gegenüber Ausreißern und Extremwerten ist. Die weitere Analyse und Darstellung wurde ebenfalls in GraphPad Prism 4 vorgenommen. Zusammenhänge zwischen jeweils zwei Variablen wurden, sofern nicht anders angegeben, mittels Produkt-Moment-Korrelation und Linearer Regression berechnet.

3.5. Materialien

Chemikalien, Puffer und Lösungen

DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole, AppliChem
BSA	Bovine serum albumin Fraktion V, PAA GE Healthcare Endkonzentration: 10%ig in PBS
Carnoy's Fixativ	Methanol (CH ₃ OH, J:T. Baker) Chloroform (CHCl ₃ , Merck) und Essigsäure (CH ₃ COOH, Merck Millipore) im Verhältnis 6:3:1
Colcemid	Demecolcin 1 µl/ml, Sigma-Aldrich
FCS	Fetal calf serum, Biochrom AG
Ficoll Paque™	Ficoll-Paque™ ² Plus, Amersham GE Healthcare
Formaldehyde solution mind. 37%	Merck Millipore Endkonzentration: 2%ig in PBS
Giemsa-Lösung	Sigma-Aldrich Endkonzentration 2% Giemsa in PBS
Glutamin	Gibco® L-Glutamin 200 mM, Life Techno- logies
KCl	0.56%ig, 0.0075 M, Merck Millipore
Medium	Gibco® RPMI 1640, ohne L-Glutamin, mit 2 g NaHCO ₃ /l, Life Technologies
Mounting Medium	Vectashield® H-1000, Mounting Medium for fluorescence, Vector Laboratories Inc.
NaCl 0.9%	Braun

² Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden Markenzeichen nur in der Materialauflistung und nicht im Text aufgeführt.

PBS	Phosphate buffered saline, pH 7.2 8 g Natriumchlorid (J.T.Baker) 0.2 g Kaliumchlorid (Merck Millipore) 1.15 g Natriumhydrogenphosphat (Merck Millipore) 0.2 g Kaliumhydrogenphosphat (Merck Millipore) gelöst in 1 Liter <i>Aqua destillata</i>
Penicillin/Streptomycin	10.000 units/ml, Gibco [®] Life Technologies
Phythaemagglutinin A	Gibco [®] Life Technologies
Triton [®] X-100	Serva Endkonzentration: 0.1%ig in PBS (mikroskopische Auswertung), 0.2%ig in PBS (zytometrische Auswertung)
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich
Antikörper	
Alexa Fluor [®] 594 goat anti-mouse IgG, Sekundär-Antikörper, rot	Invitrogen Life Technologies Endkonzentration in PBS mit 1% BSA und 0.5% Tween [®] 20: 1:600
Anti-rabbit Ig, fluorescein linked whole antibody from donkey, Sekundär-Antikörper, grün	Amersham GE Healthcare Endkonzentration in PBS mit 1% BSA und 0.5% Tween [®] 20: 1:100
Monoclonal Antibody, mouse, IgG Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) clone JBW301	Upstate Millipore Endkonzentration in PBS mit 1% BSA und 0,5% Tween [®] 20: 1:100
Monoclonal Antibody, rabbit, IgG ATM Phospho (pS1981), clone EP1890Y	Epitomics Endkonzentration in PBS mit 1% BSA und 0,5% Tween [®] 20: 1:100
γ H2A.X-FACS-Kit genutzt wurden: Anti-phospho-H2A.X (Ser139) FITC conjugate und Fixation solution (37% formaldehyde, containing 10-15% methanol)	H2A.X Phosphorylation Assay Kit (Flow Cytometry) Upstate Millipore
Geräte und Software	
Brutschrank (5% CO ₂)	Automatic CO ₂ Incubator Model 160, ICN Flow

CCD-Kamera	CFI/1 FMCC, Kappa Messtechnik
Bildauswertungssoftware, computergestützt	AxioVision Rel. 4.7.2 und 4.8.1, Carl Zeiss Imaging Solutions
FACS™	FACSCanto™, 2-laser, 6-color (4-2), Becton/Dickinson
FACS™ Auswertungssoftware	FACSDiva™ Version 6.1.2, Becton/Dickinson,
Inkubationskammer	Sarstedt
Lichtmikroskop	Axioplan 2 imaging, Carl Zeiss
Lichtmikroskop	Axio Observer Z 1, Carl Zeiss
Röntgenröhre 0.5 mm starker Kupfer-Filter Duplexdosimeter (PTW)	RT200, C. H. F. Müller/Phillips (Röhrenstrom: 20 mA, Spannung: 200 kV)
Schüttler	KM-2, Edmund Bühler
Statistik-Software	GraphPad Prism 4, GraphPad Software, Statcon
Steril-Bench	HERAsafe®, Zyto-Sicherheitswerkbank K1.2, Heraeus® Instruments
Vortex	Reax top, Heidolph
Waage	AE 160, METTLER TOLEDO EMB 1200-1, Kern
Zellzähler (Coulter Counter)	Z2™ COULTER COUNTER® Cell and Particle Counter, Beckman Coulter Inc.
Zentrifuge	Megafuge® 1.0 R, Heraeus® Sepatech Labofuge® 400 R FunctionLine, Heraeus® Instruments
Zytozentrifugator	Shandon Cytospin® 4 Zytozentrifuge, Thermo Electron Corporation
Sonstige Labor-Materialien	
Butterflies mit Adapter	Safety-Multifly®, Sarstedt

Deckgläser	Stärke No. 1, Größe: 24 x 32 mm, Marienfeld
Desinfektionsmittel für die Haut	Cutasept F [®] , Bode
FACS-Röhrchen	Reagenz-/Zentrifugenröhren mit rundem Boden, 5 ml, Sarstedt
heparinisierte Monovetten [®]	S-Monovette [®] AH, 5.5 ml, Sarstedt
Immersions-Öl	Merck Millipore
Kunstharz	Entellan [®] , Merck Millipore
Nagellack	Colour & go nailpolish, essence
Objektträger	Mit Mattstreifen, Größe: 76 x 26 mm, Stärke: 1 mm, Karl Hecht
Pipetten, 5 ml, 10 ml	BD Falcon [™] , Becton/Dickinson Labware
Pipetten, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf Reference
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettierhilfe	accu-jet [®] Pro, Brand
Reagiergefäß	1,5 ml, Sarstedt
Spitzboden-Röhrchen	Cellstar [®] Tubes 15 ml, Polypropylen, konischer Boden, mit Schraubverschluss, Greiner Bio-One
Stauschlauch	
Transfer-Pipetten	BD Falcon [™] Transfer Pipets, 3 ml, Becton/Dickinson Labware
Wattetupfer	Pur-Zellin [®] , Hartmann
Zellkulturflaschen	Gewebekulturflaschen mit PE Schnellverschluss-Schraubkappe, 50 cm ² , Sarstedt

4. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob pATM-Foci im Vergleich zu den etablierten γ H2A.X-Foci besser zum Nachweis residueller Doppelstrangbrüche geeignet sind. Des Weiteren wurde die Güte des Nachweises strahleninduzierter Doppelstrangbrüche mittels γ H2A.X- und pATM-Foci in Gegenüberstellung mit Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung verglichen. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob der flusszytometrische Nachweis fluoreszenzmarkierter reparaturassoziiertes Proteine mittels kommerziell erwerbbarer „FACS-Kits“ eine – Zeit und Arbeitsaufwand sparende – Alternative zur mikroskopischen Erfassung der γ H2A.X-Foci darstellt. Es sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der numerischen Auswertung fluoreszenzmarkierter Foci und einer flusszytometrischen Quantifizierung des Fluoreszenzsignals besteht.

Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten des peripheren Blutes von bis zu 21 Probanden durchgeführt.

4.1. Immunhistochemischer Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels der reparatur-assoziierten Proteine γ H2A.X und pATM

Für die mikroskopische Auswertung wurden die Lymphozyten aus dem Vollblut isoliert und bestrahlt (bzw. als Kontrolle unbestrahlt gelassen). Nach insgesamt 24 Stunden Reparaturzeit wurden die residuellen DNA-Doppelstrangbrüche mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern angefärbt. Diese akkumulieren in den Zellen zu sogenannten Foci, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden konnten. Pro Dosispunkt und Anfärbung wurden 100 Zellen jedes Probanden gewertet. Die nachfolgende Auswertung der Daten wurde mit GraphPad Prism vorgenommen.

Abbildung 2 zeigt exemplarisch das mikroskopische Bild von Lymphozyten eines Probanden. Die Kernfärbung mittels DAPI ermöglicht Identifizierung der einzelnen Zellen, welche unbestrahlt nur vereinzelt residuelle Doppelstrangbrüche aufweisen und entsprechend keine oder nur geringe unspezifische (Hintergrund-)Anfärbung zeigen (Panel A). Nach einer Gesamtdosis von 6 Gy werden residuelle Doppelstrangbrüche als γ H2A.X-Foci (Panel B) bzw. als pATM-Foci (Panel C) dargestellt.

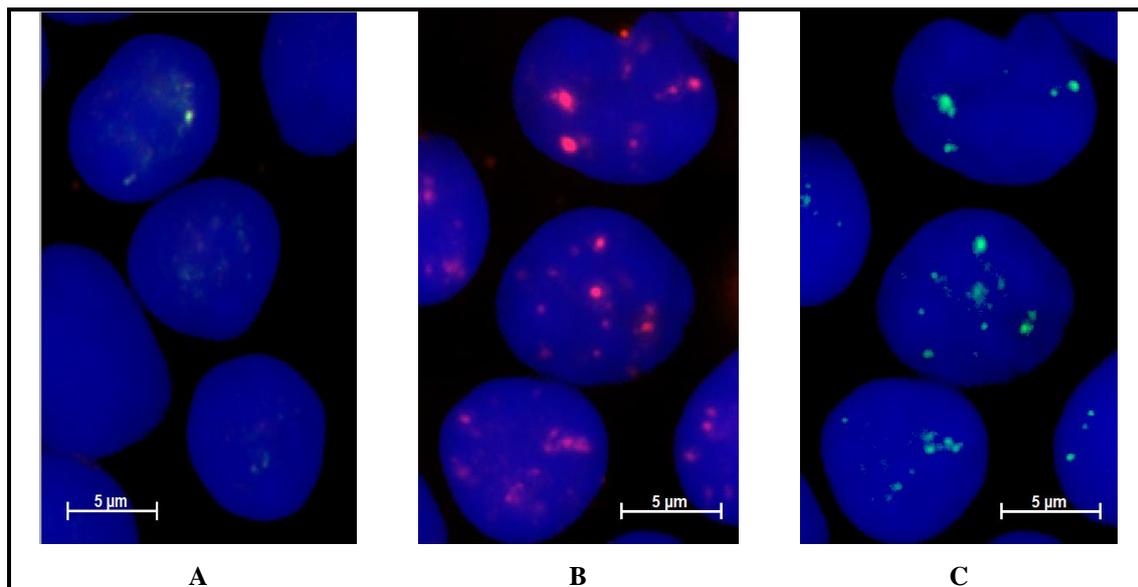


Abbildung 2: A Unbestrahlte Lymphozyten. Kein Nachweis residueller DNA-Doppelstrangbrüche mittels γ H2A.X- oder pATM. B, C 24 h nach einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy werden residuelle DNA-Doppelstrangbrüche durch Akkumulation der fluoreszenzmarkierten γ H2A.X-(rot) bzw. pATM- (grün) Antikörper. als Foci detektiert.

4.2. Nachweis reparatur-assoziiertes Proteins in unbestrahlten Lymphozyten

Zum Nachweis der sogenannten „spontanen Foci“ in unbestrahlten Zellen wurden Kontrollproben mitgeführt, welche im gesamten experimentellen Prozedere eine identische Handhabung erfuhren, aber keine Bestrahlung erhielten. Es wurden ebenfalls pro Proband die γ H2A.X- bzw. pATM-Foci in 100 Lymphozyten ausgezählt und die Ergebnisse mit GraphPad Prism ausgewertet.

Nach Aufbereitung der Zellen und Auszählung der Foci können die Daten in Form von Häufigkeitsverteilungen (Histogrammen) dargestellt werden.

Abbildung 3 zeigt exemplarisch für drei Probanden die Häufigkeitsverteilung spontaner γ H2A.X- (Panel A, C, E) bzw. pATM-Foci (Panel B, D, F). Es bestehen deutliche Unterschiede besonders in der Anzahl spontaner γ H2A.X-Foci zwischen den Probanden, aber auch in der Anzahl spontaner γ H2A.X- und pATM-Foci eines individuellen Probanden. Während die Probanden A und B mit 0.04 bzw. 0.57 relativ wenig spontane γ H2A.X-Foci aufweisen, werden bei Proband C im Mittel 1.76 spontane γ H2A.X-Foci nachgewiesen. Die Unterschiede in der Anzahl spontaner pATM-Foci sind mit individuellen Mittelwerten von 0.01, 0.15 und 0.14 weniger stark ausgeprägt.

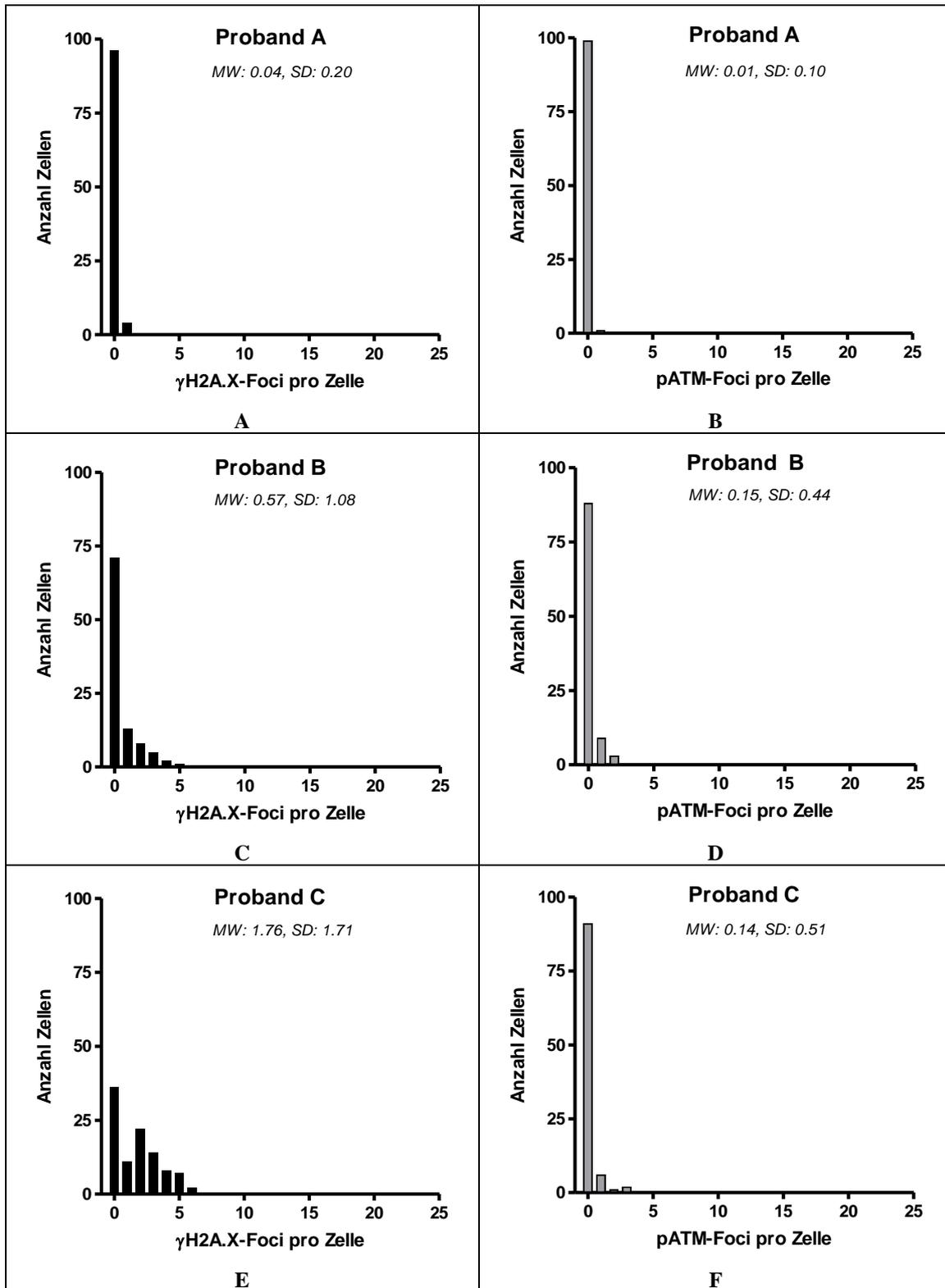


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilungen spontaner γ H2A.X- und pATM-Foci (exemplarisch für jeweils einen Probanden mit kaum (A, B), wenig (C, D) und relativ vielen (E, F) spontanen Foci).

Die individuellen Unterschiede bezüglich spontaner γ H2A.X- bzw. pATM-Foci aller 21 Probanden sind in **Abbildung 4** dargestellt. Aus **Abbildung 4** wird deutlich, dass die Verteilung der Werte für γ H2A.X weiter rechts bei höheren Werten liegt als für pATM. Es gibt über dreimal mehr Probanden ohne spontane pATM-Foci als ohne spontane γ H2A.X-Foci. In Bezug auf pATM zeigen alle bis auf einen der Probanden 0 bis 0.2 spontane Foci, wohingegen zwei Drittel dieser Personen im Mittel 0.4 bis 0.9 γ H2A.X-Foci aufweisen und ein Proband sogar einen Wert von 1.8 spontanen γ H2A.X-Foci erreicht. Dieses bedeutet auch, dass unter 10% der Probanden keine und die Mehrzahl 0.4 bis 0.9 spontane γ H2A.X-Foci aufweist, wohingegen bei über 30% der untersuchten Probanden keine spontanen pATM-Foci nachgewiesen werden können. Der Range der Werte beträgt für γ H2A.X 0.02 bis 1.76. Für pATM ergibt sich ein Range von 0.00 bis 0.32.

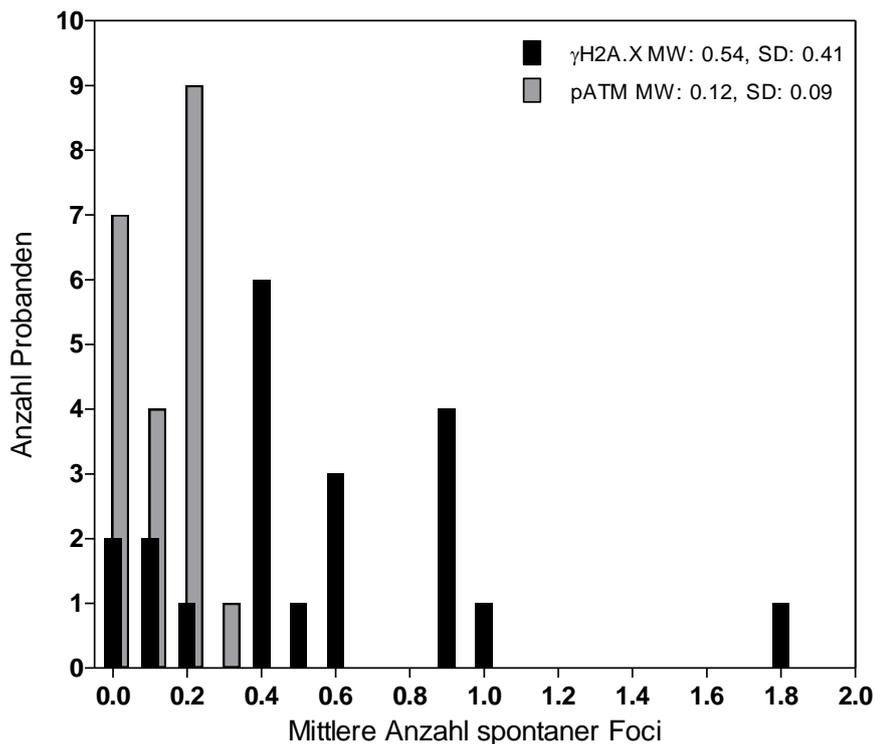


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung der mittleren Anzahlen spontaner γ H2A.X- (dunkle Balken) und pATM-Foci (helle Balken) aller 21 Probanden.

Die Unterschiede bezüglich spontaner γ H2A.X- und pATM-Foci sind in **Abbildung 5** zusammengefasst. Die Verteilung der pATM-Foci weist sowohl einen niedrigeren

Mittelwert (MW = 0.12³) als auch eine geringere Variationsbreite (Standardabweichung (SD) = 0.09; Variationskoeffizient (CV) = 71,5%) auf als die der γ H2A.X-Foci mit einem Mittelwert von 0.54⁴ und einer Standardabweichung von 0.41 bei einem Variationskoeffizienten von 75.9%. Die Mittelwerte beider Verteilungen wurden mittels t-Test überprüft. Es konnte ein signifikanter Unterschied mit einem $p \leq .001$ nachgewiesen werden.

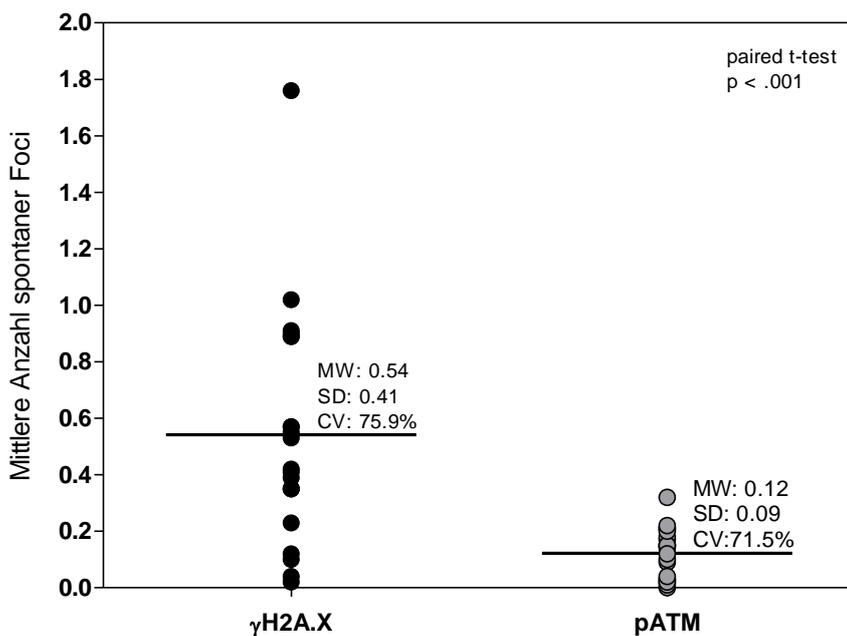


Abbildung 5: Mittlere Anzahl und Variationsbreite spontaner γ H2A.X- und pATM-Foci der Probanden.

In **Abbildung 6** wird die Anzahl spontaner γ H2A.X-Foci eines jeden Probanden der korrespondierenden Anzahl spontaner pATM-Foci gegenübergestellt, um zu überprüfen, ob ein genereller Zusammenhang zwischen beiden Parametern besteht. Im Fall eines positiven Zusammenhangs würde eine Person sowohl wenig spontane γ H2A.X-Foci als auch eine niedrige Anzahl spontaner pATM-Foci aufweisen und entsprechend viele γ H2A.X-Foci mit ebenfalls hohen Werten an pATM-Foci desselben Probanden assoziiert sein. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass zwischen den spontanen γ H2A.X-

³ Mittelwert: 0.1219, Standardabweichung: 0.0872

⁴ Mittelwert: 0.5414, Standardabweichung: 0.4111

und pATM-Foci der einzelnen Probanden kein statistisch signifikanter linearer Zusammenhang (Lineare Regression: $r^2 = .13$, n. s.⁵, dieses entspricht einer Korrelation von $r = .37$, n. s.) festgestellt werden kann.

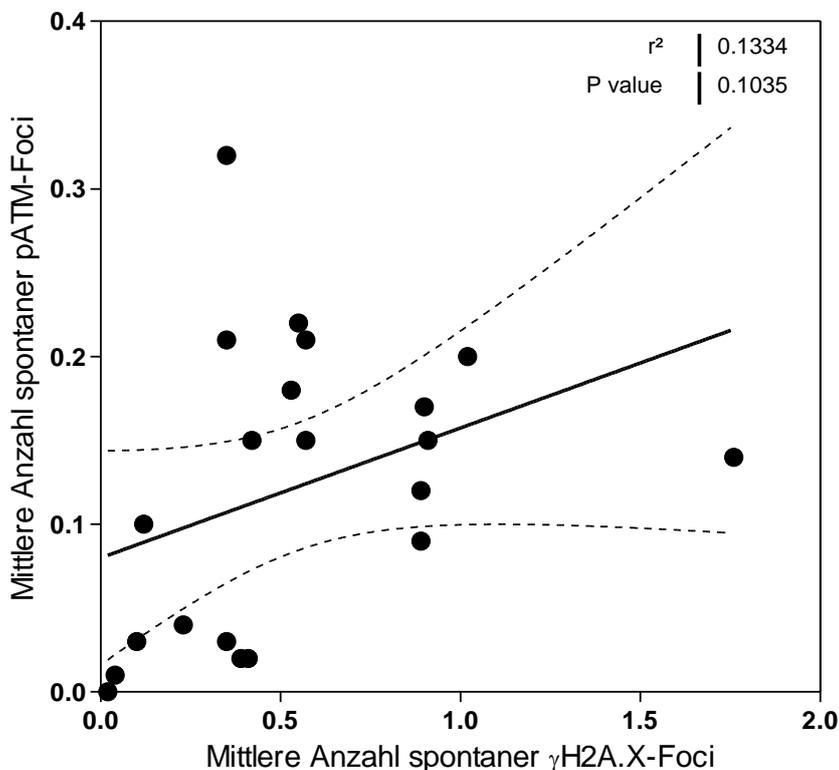


Abbildung 6: Zusammenhang spontaner γ H2A.X- mit pATM-Foci der Probanden (Lin. Regression \pm 95% CI).

In **Abbildung 7** sind die Ergebnisse der Überprüfung dargestellt, inwieweit das Alter der Probanden mit der individuellen Anzahl spontaner γ H2A.X- und pATM-Foci zusammenhängt. Der Zusammenhang wird mittels Linearer Regression bzw. Korrelation untersucht. Im Falle eines nachgewiesenen Zusammenhangs kann angenommen werden, dass ein Teil der Variabilität in der Anzahl spontaner Foci auf die Unterschiede im Alter der Probanden zurückgeführt werden kann.

Für γ H2A.X ergibt sich ein Regressionskoeffizient von $r^2 = .38$ ($p = .003$) bzw. eine Korrelation in Höhe von $r = .62$ ($p = .003$). Diese zeigt einen deutlichen Zusammenhang beider Parameter an. Die Anzahl spontaner γ H2A.X-Foci nimmt mit steigendem Alter

⁵ n. s.: kein statistisch signifikanter Zusammenhang, entspricht einem $p > .05$

der Probanden zu. Im Falle von pATM ergibt sich ein Regressionskoeffizient von $r^2 = .02$ (n. s.) bzw. eine Korrelation von $r = .14$ (n. s.). Die Anzahl spontaner pATM-Foci variiert somit unabhängig von dem Alter der Probanden.

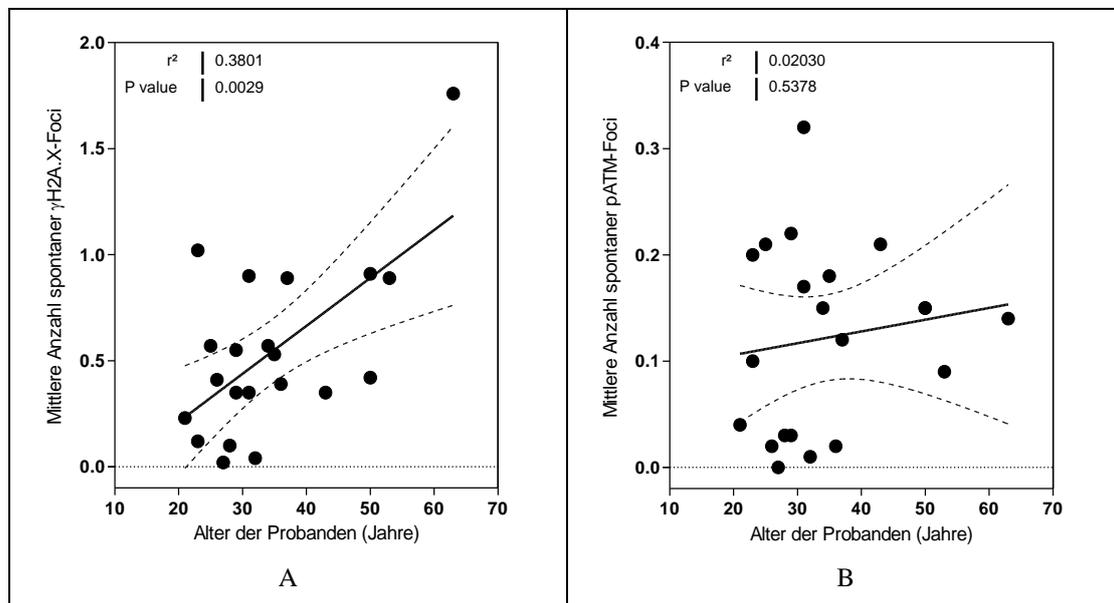


Abbildung 7: Zusammenhang spontaner γ H2A.X-Foci (A) und pATM-Foci (B) mit dem Alter der Probanden (Lin. Regression \pm 95% CI).

Um einen Einfluss der individuell variierenden Anzahl spontaner Foci auf die Ergebnisse der residuellen Foci nach Bestrahlung auszuschließen, wurden diese jeweils um den individuell erfassten 0 Gy Wert korrigiert. Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich somit auf die zusätzlichen strahleninduzierten Foci.

4.3. Nachweis reparatur-assoziiertes Proteins in bestrahlten Lymphozyten

Für alle 21 Probanden wurden die residuellen Doppelstrangbrüche nach Gesamtdosen von 4 Gy bzw. 6 Gy bestimmt. Diese Dosen wurden gewählt, da sie gemäß bisheriger Ergebnisse der Arbeitsgruppe „Prädiktion“ besonders gut zur Quantifizierung der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit geeignet sind. Generell wird angenommen, dass die Unterschiede zwischen Personen umso ausgeprägter sind, je höher die applizierte Gesamtdosis ist. Diese wird jedoch durch die räumliche Auflösung begrenzt, da mit der Dosis die Anzahl an residuellen Foci zunimmt und die Auszählung

sehr hoher Foci-Anzahlen durch die relativ geringe Größe der Lymphozyten erschwert wird. Erfahrungsgemäß stellt eine Dosis von 6 Gy ein Optimum dar, reicht diese Dosis doch aus, um individuelle Unterschiede darzustellen.

Nachfolgend werden Verteilungseigenschaften, Dosis-Effekt-Zusammenhänge, Konsistenz der Ergebnisse und Zusammenhänge beider Foci-Entitäten nach Bestrahlung dargestellt.

Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Histogramme für γ H2A.X-Foci (links) bzw. pATM-Foci (rechts) nach Bestrahlung mit Gesamtdosen von 4 Gy (Panel A und B) und 6 Gy (Panel C und D).

Abbildung 8 verdeutlicht zum einen die Zunahme der Anzahl residueller Foci mit steigender Dosis: Nach Bestrahlung mit 4 Gy bzw. 6 Gy wurden im Falle dieses Probanden im Mittel 6.32 (SD = 1.90) bzw. 9.77 (SD = 2.51) γ H2A.X-Foci nachgewiesen. Die mittlere Anzahl pATM-Foci erhöht sich von 4.89 (SD = 1.38) auf 7.33 (SD = 1.58). Zum anderen kann anhand der Darstellung die Verteilungsfunktion der Foci pro Zelle beurteilt werden.

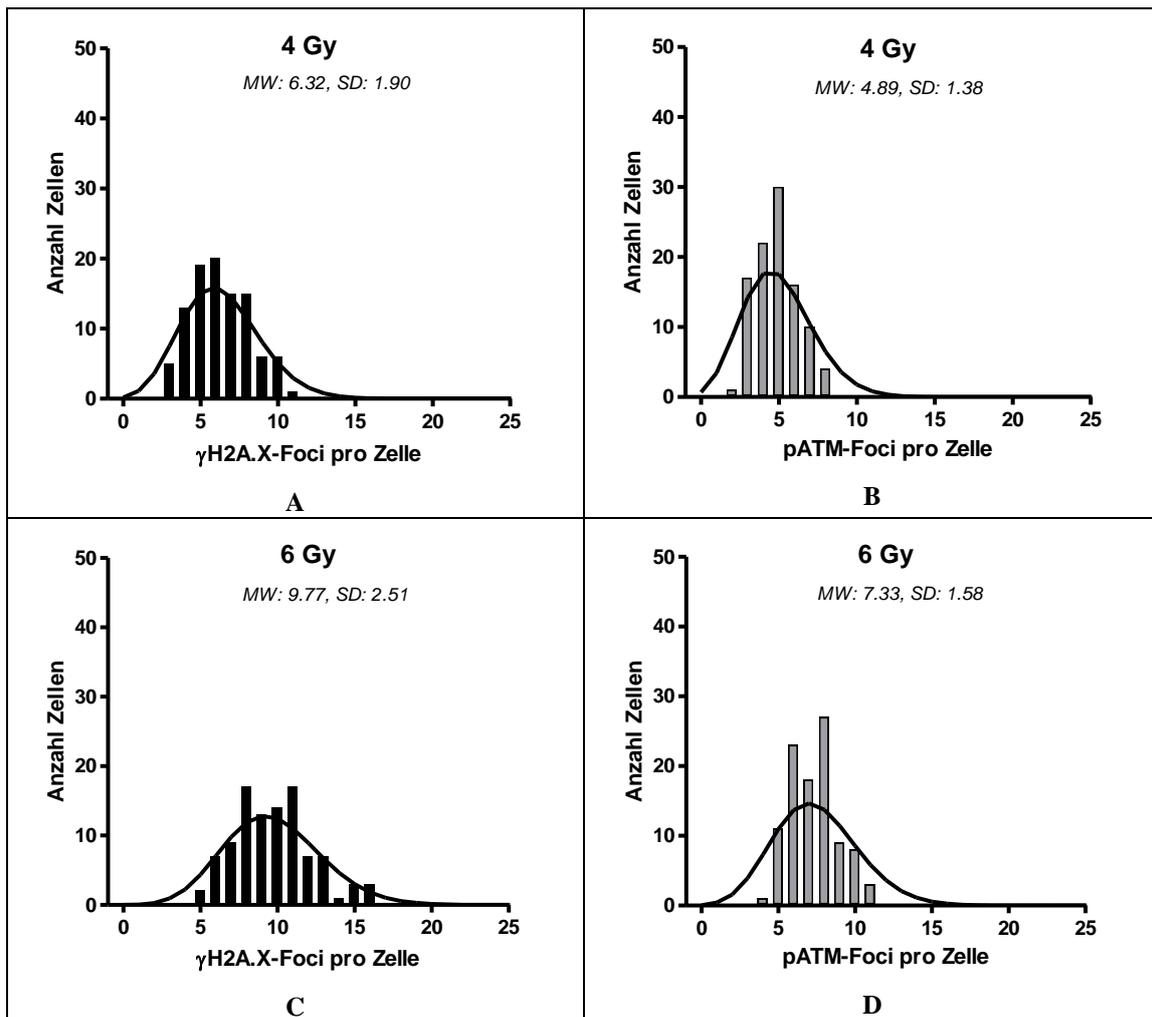


Abbildung 8: Exemplarisch für einen Probanden: Verteilungen der Foci von jeweils 100 ausgezählten Zellen nach 4 Gy (A, B) und 6 Gy (C, D). Linke Spalte (A, C): Auszählung für γ H2A.X, rechte Spalte (B, D): Auszählung für pATM.

Da die Verteilung der Foci pro Zelle nach Bestrahlung der Treffertheorie folgend mit Hilfe der Poissonverteilung beschrieben werden kann, wurde in alle Histogramme in

Abbildung 8 als durchgezogene Linie die, mit Hilfe einer Poissonstatistik berechnete, Verteilungskurve eingefügt. Diese dokumentiert, dass die ermittelten Verteilungen der Anzahlen an Foci pro Lymphozyt den nach der Treffertheorie zu erwartenden Verteilungskurven gut entsprechen. Da sich eine Poisson-Verteilung mit steigendem Erwartungswert (in diesem Fall: Anzahl der Foci bzw. Doppelstrangbrüche pro Zelle) an eine Normalverteilung annähert und in allen Fällen eine nahezu vollständige Übereinstimmung von Erwartungswert (auch: Mittelwert) der jeweiligen Poisson-Verteilung und

dem arithmetischen Mittel der in den Versuchen gefundenen Verteilung vorliegt, wurde bereits in den vorangehenden Auswertungen und wird auch im Folgenden der arithmetische Mittelwert der Verteilung verwendet und aus Gründen der besseren Lesbarkeit als „Mittelwert“ bezeichnet.

Die vollständigen Ergebnisse aller untersuchten Probanden sind als Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- bzw. pATM-Foci jeweils nach 0 Gy, 4 Gy und 6 Gy im Anhang dieser Arbeit zusammenfassend dargestellt.

4.3.1. Dosis-Effekt-Zusammenhänge

Wie unter 4.3 dargestellt, nimmt die Anzahl residueller Foci mit steigender Bestrahlungsdosis zu. Nachfolgend wird der Dosis-Effekt-Zusammenhang – insbesondere seine Linearität und mögliche Sättigungseffekte – untersucht.

Abbildung 9 zeigt die für alle 21 Probanden bestimmten Mittelwerte der Anzahl residueller Foci nach 4 Gy bzw. 6 Gy. Sowohl für γ H2A.X als auch für pATM kann eine lineare Zunahme der Foci-Anzahlen mit steigender Dosis nachgewiesen werden. In beiden Fällen liefert die Lineare Regression ein r^2 von .96 ($p < .001$). Der Korrelationskoeffizient beträgt entsprechend $r = .98$ ($p < 001$). Die Dosis-Effekt-Kurven beider Foci-Entitäten bis zu einer Dosis von 6 Gy unterscheiden sich somit nur bezüglich der erreichten Maximalwerte, nicht hingegen in der Stärke des Zusammenhangs.

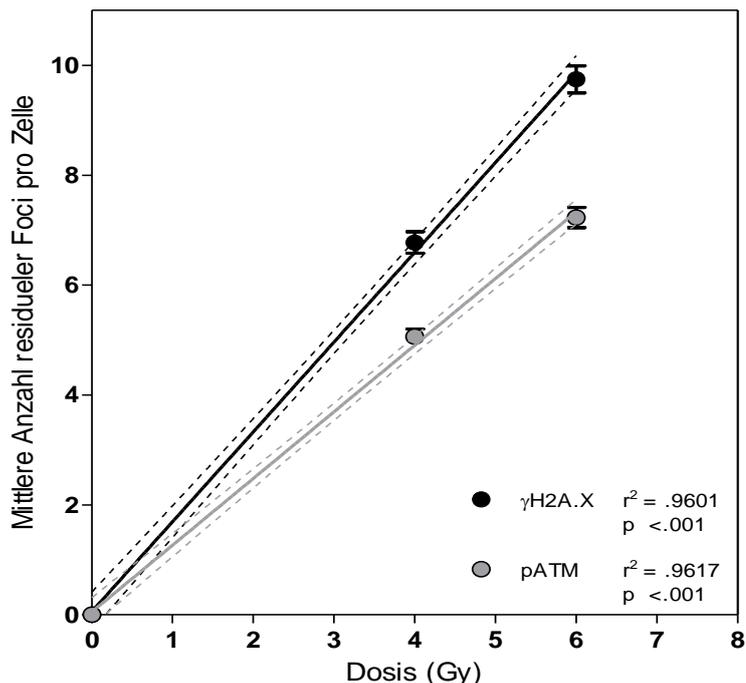


Abbildung 9: Dosis-Effekt-Kurven der γ H2A.X- und pATM-Foci nach Bestrahlung bis 6 Gy (Mittelwert aller Probanden \pm SE; Lin. Regression \pm 95% CI).

In Ergänzung zur Bestimmung der residuellen Foci nach 4 bzw. 6 Gy wurde für zwei Probanden ein erweiterter Dosisbereich bis 10 Gy untersucht, um zu überprüfen, ob der Foci-Nachweis ab einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy bereits einen Sättigungseffekt aufweist, also eine Abflachung der Dosis-Effekt-Kurve beobachtet werden kann oder ob der lineare Anstieg auch bei hohen Dosen/hohen Foci-Anzahlen pro Zelle beibehalten wird. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 10** und **Abbildung 11** dargestellt. Für γ H2A.X kann ein linearer Anstieg der Foci-Anzahl mit steigender Dosis bis 10 Gy beobachtet werden, während bei pATM-Foci in beiden Fällen eine Erhöhung der Dosis von 8 auf 10 Gy mit einer geringeren Zunahme an residuellen pATM-Foci verbunden ist. Obwohl der Kurvenverlauf noch gut durch eine Lineare Regression beschrieben werden kann, zeigt sich doch, dass die Dosis-Effekt-Kurve im Fall von pATM gegenüber γ H2A.X zunehmend flacher verläuft.

Somit findet sich, im Gegensatz zu Gesamtdosen bis 6 Gy, ein linearer Anstieg über den gesamten Dosisbereich bis 10 Gy nur bei γ H2A.X. Für pATM kann eine Abflachung des Kurvenverlaufs im Bereich der höchsten Dosen bei insgesamt niedrigeren Werten nachgewiesen werden.

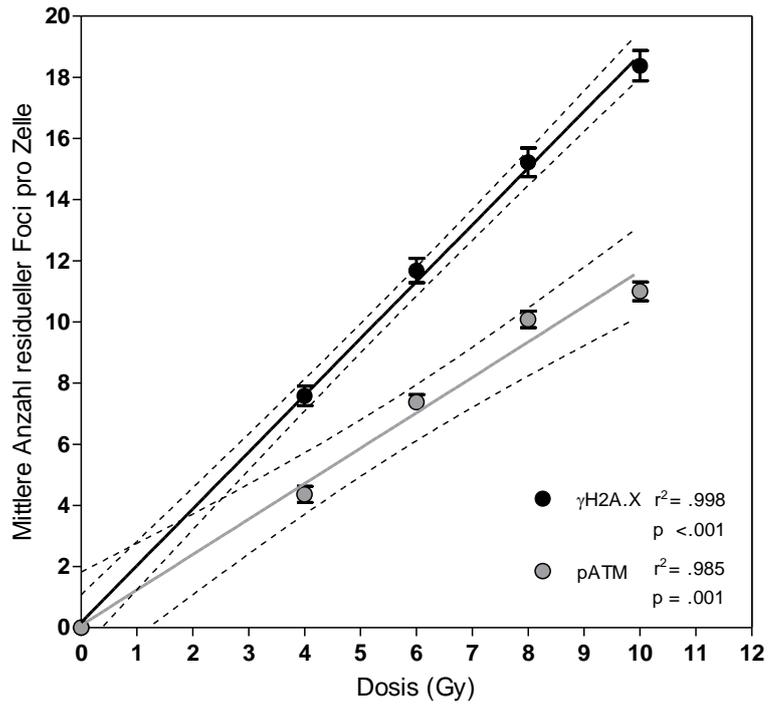


Abbildung 10: Dosis-Effekt-Kurven der γ H2A.X- und pATM-Foci nach Bestrahlung bis 10 Gy (Mittelwert \pm SE; Lin. Regression \pm 95% CI; Proband 5).

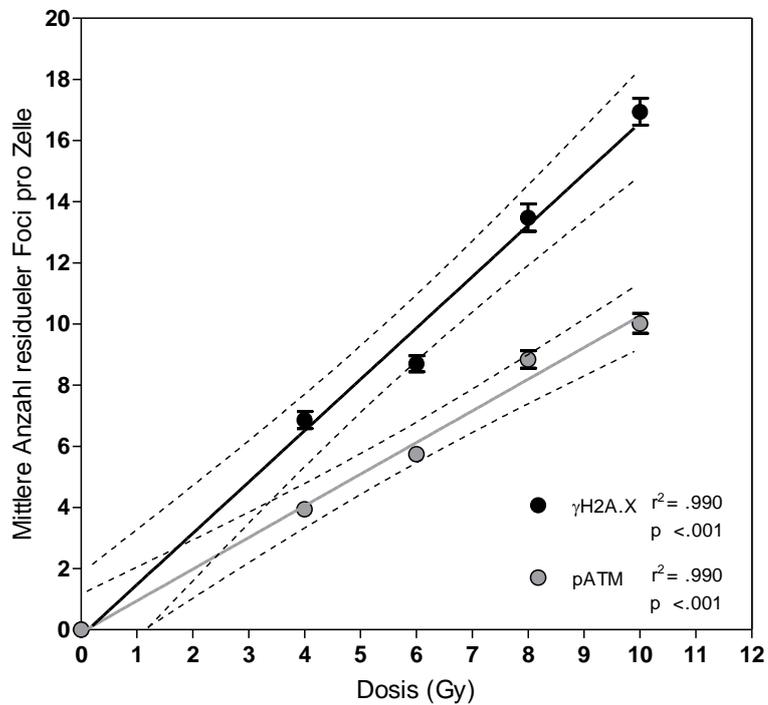


Abbildung 11: Dosis-Effekt-Kurven der γ H2A.X- und pATM-Foci nach Bestrahlung bis 10 Gy (Mittelwert \pm SE; Lin. Regression \pm 95% CI; Proband 15).

4.3.2. Konsistenz der Ergebnisse nach 4 und 6 Gy

Zur Überprüfung des Zusammenhangs zwischen den jeweiligen individuellen Werten der Probanden, wie sie nach 4 und 6 Gy bestimmt wurden, d. h. zur Konsistenzprüfung über verschiedene Dosisstufen, hat sich der Vergleich der Ergebnisse innerhalb eines reparatur-assoziierten Proteins bewährt.

Generell ist zu fordern, dass bestehende interindividuelle Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit mit der jeweiligen Messmethode unabhängig von der applizierten Gesamtdosis abgebildet werden können. Dies lässt sich überprüfen und graphisch darstellen, in dem die individuellen Werte des verwendeten Parameters, z.B. die Anzahl residueller Foci, für zwei deutlich unterschiedliche Gesamtdosen korreliert werden. Dies wird in **Abbildung 12** für residuelle γ H2A.X-Foci und in **Abbildung 13** für pATM-Foci dargestellt. Unter der Voraussetzung, dass residuelle γ H2A.X- bzw. pATM-Foci die zelluläre individuelle Strahlenempfindlichkeit charakterisieren, sollte ein genereller Zusammenhang der Foci nach 4 und 6 Gy nachzuweisen sein. Dieses findet eindeutige Bestätigung: Die berechnete Lineare Regression liefert für γ H2A.X ein r^2 von .30 ($p = .011$), dieses entspricht einer Korrelation von $r = .54$ ($p = .011$). Für pATM zeigt sich in der Korrelation mit einem r von .67 ($p < .001$) ein noch größerer Zusammenhang zwischen den Werten. Das Ergebnis der Linearen Regression liegt für pATM ebenfalls entsprechend höher mit einem r^2 von .45 ($p < .001$).

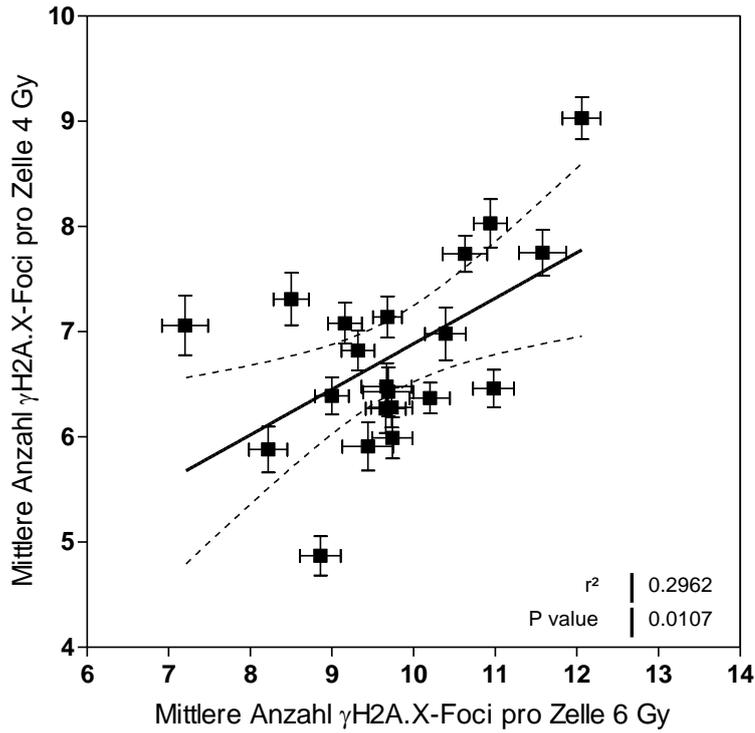


Abbildung 12: Zusammenhang der mittleren γ H2A.X-Foci-Anzahlen nach 4 und 6 Gy (Mittelwert \pm SE; Lin. Regression \pm 95% CI).

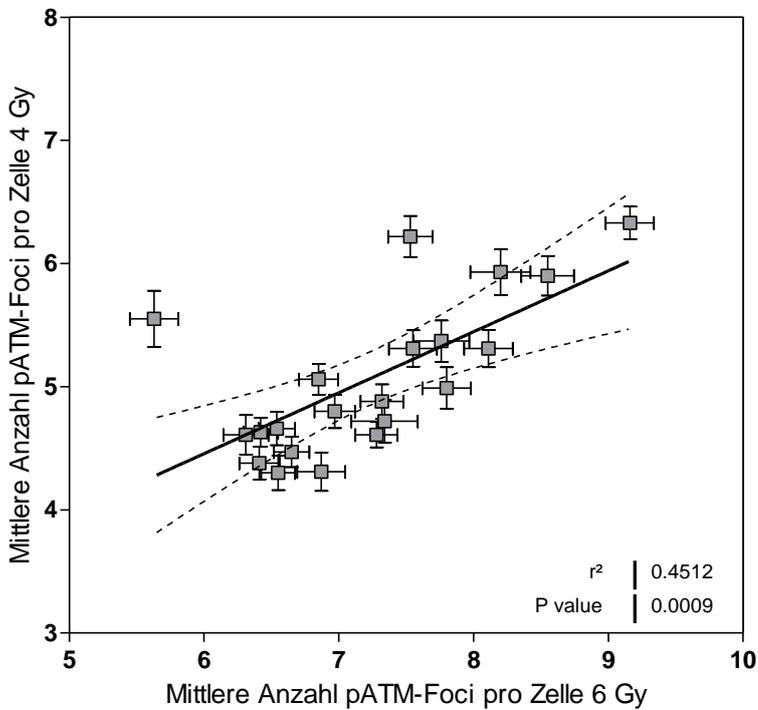


Abbildung 13: Zusammenhang der mittleren pATM-Foci-Anzahlen nach 4 und 6 Gy (Mittelwert \pm SE; Lin. Regression \pm 95% CI).

4.3.3. Assoziation von γ H2A.X und pATM-Foci

Da in den vorangegangenen Abschnitten beide reparatur-assoziierten Proteine jeweils getrennt hinsichtlich ihrer Verteilungseigenschaften, Dosis-Effekt-Kurven und Konsistenzanalysen dargestellt und somit nur indirekt verglichen wurden, soll nachfolgend ein direkter Vergleich hinsichtlich Höhe und Variabilität der individuellen Mittelwerte erfolgen sowie der Zusammenhang beider Foci-Entitäten überprüft werden.

Zum Vergleich der Mittelwerte sind die individuellen Unterschiede bezüglich γ H2A.X- bzw. pATM-Foci aller 21 Probanden in **Abbildung 14** nach einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy sowie in **Abbildung 15** nach 6 Gy dargestellt. Bereits in **Abbildung 14** ist für eine Dosis von 4 Gy deutlich zu erkennen, dass die Verteilung für γ H2A.X weiter rechts bei höheren Werten liegt als für pATM. Noch deutlicher wird diese Beobachtung nach einer Dosis von 6 Gy. Der Überschneidungsbereich beider Foci-Entitäten ist noch geringer geworden. Die jeweiligen Werte liegen für 4 Gy in einem Range von 4.87 bis 9.03 (γ H2A.X) sowie von 4.30 bis 6.33 (pATM). Für 6 Gy beträgt der Range 7.20 bis 12.06 (γ H2A.X) sowie 5.63 bis 9.16 (pATM).

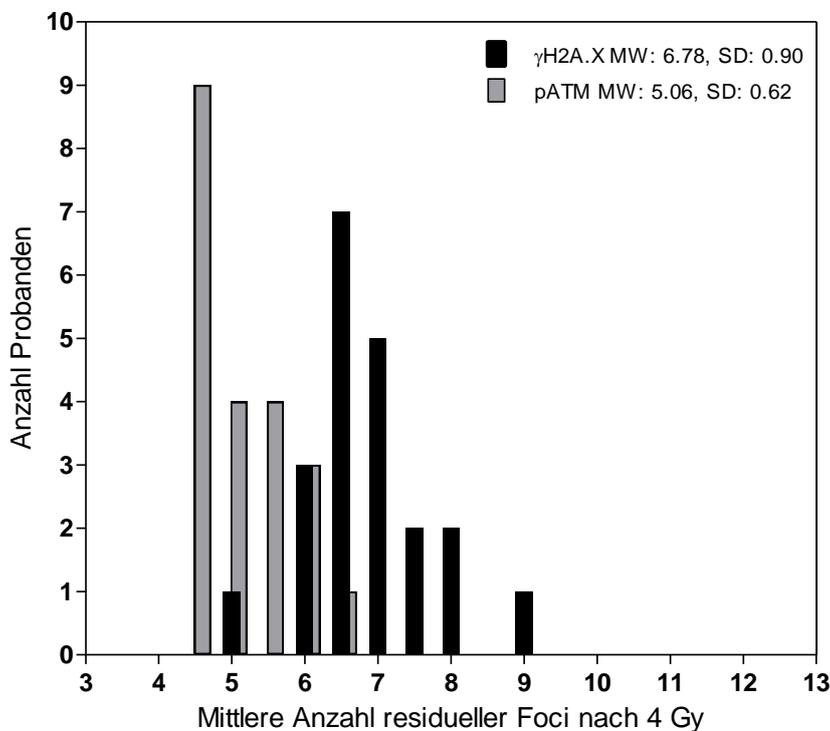


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der mittleren Anzahlen γ H2A.X- (dunkle Balken) und pATM-Foci (helle Balken) nach Bestrahlung mit 4 Gy für alle 21 Probanden.

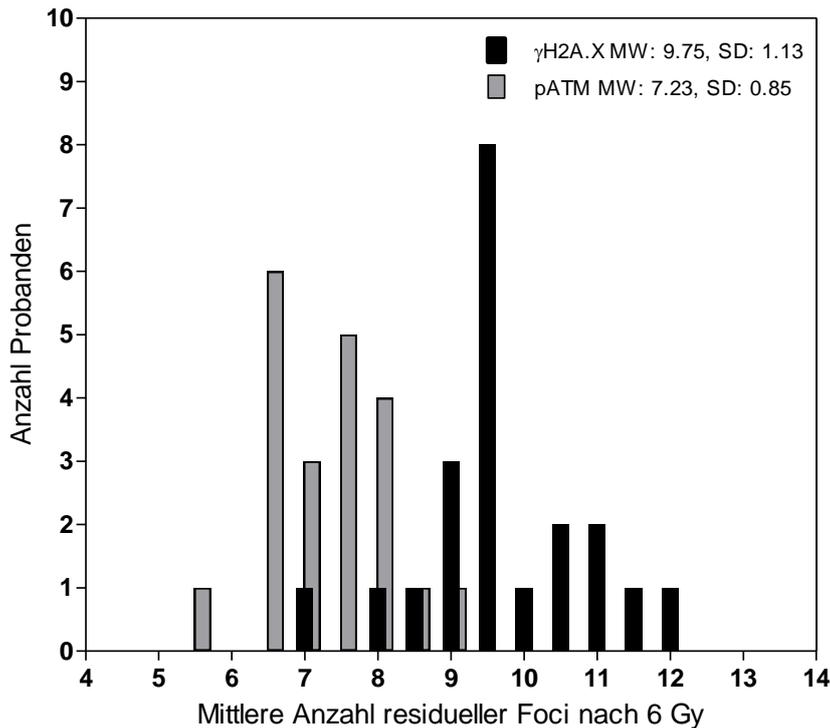


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der mittleren Anzahlen γ H2A.X- (dunkle Balken) und pATM-Foci (helle Balken) nach Bestrahlung mit 6 Gy für alle 21 Probanden.

Die in **Abbildung 14** bzw. **Abbildung 15** dargestellten Ergebnisse werden in **Abbildung 16** bzw. **Abbildung 17** noch einmal vergleichend hinsichtlich der mittleren Anzahl der γ H2A.X- und pATM-Foci und ihrer Variationsbreite, getrennt für Dosen von 4 Gy und 6 Gy, dargestellt. Nach der Bestrahlungsdosis von 4 Gy ergaben sich im Mittel 6.78 (SD = 0.90) γ H2A.X- sowie 5.06 (SD = 0.62) pATM-Foci, nach 6 Gy im Mittel 9.75 (SD = 1.13) γ H2A.X- sowie 7.24 (SD = 0.85) pATM-Foci. Im Vergleich dieser Mittelwerte je Dosisstufe mittels t-Test konnten statistisch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (in beiden Fällen $p \leq .001$)

Die Variationskoeffizienten CV betragen für 4 Gy 13.2 (γ H2A.X) und 12.3 (pATM) und für 6 Gy 11.6 (γ H2A.X) und 11.7 (pATM).

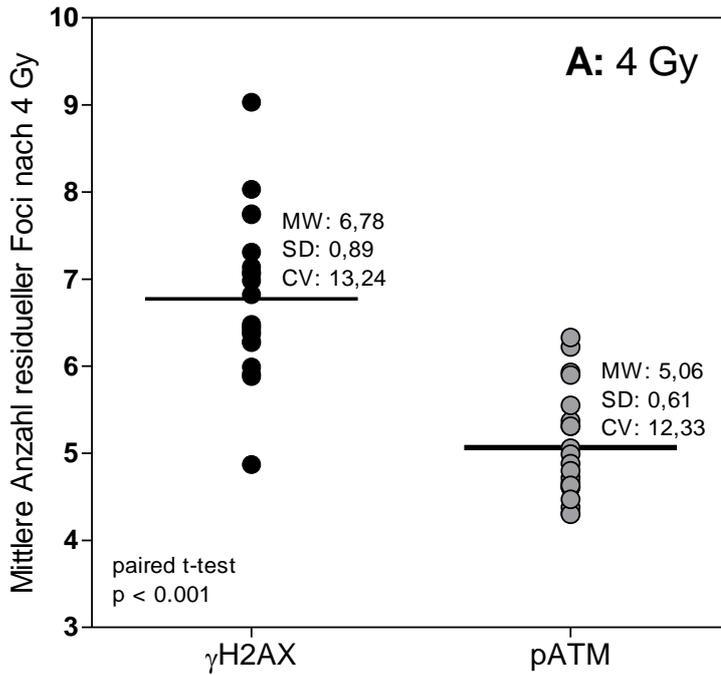


Abbildung 16: Mittlere Anzahl und Variationsbreite residueller γ H2A.X- und pATM-Foci aller Probanden nach einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy (Mittelwertsvergleich: t-Test).

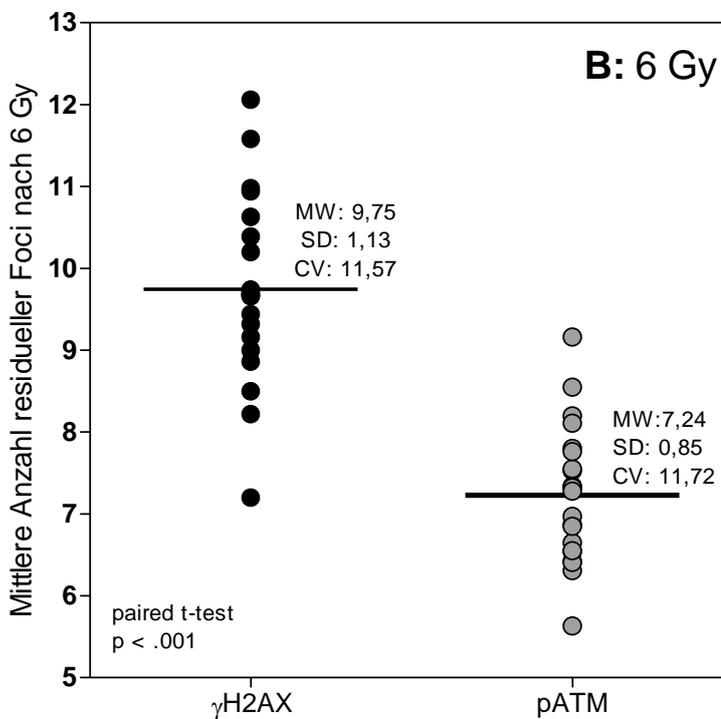


Abbildung 17: Mittlere Anzahl und Variationsbreite residueller γ H2A.X- und pATM-Foci aller Probanden nach einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy (Mittelwertsvergleich: t-Test).

Nachfolgend wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl γ H2A.X- und pATM-Foci jeweils getrennt für die beiden untersuchten Dosisstufen von 4 und 6 Gy bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 18** und **Abbildung 19** dargestellt, wobei jeweils für alle 21 Probanden für 4 Gy (**Abbildung 18**) bzw. 6 Gy (**Abbildung 19**) die Mittelwerte der residuellen γ H2A.X- und pATM-Foci gegeneinander aufgetragen wurden. In beiden Fällen erfolgte eine Überprüfung des Fits der Daten mittels Linearer Regression. Die Regressionskoeffizienten betragen $r^2 = .45$ und $.46$ (in beiden Fällen $p \leq .001$) für residuelle Foci nach 4 Gy bzw. 6 Gy. Als zugehörige Korrelationskoeffizienten ergeben sich $r = .67$ für 4 Gy sowie $r = .68$ nach 6 Gy (in beiden Fällen $p \leq .001$). Es konnte demnach ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Foci-Entitäten auf beiden Dosisstufen nachgewiesen werden. Zusätzlich zur Linearen Regression (durchgezogene Linie) ist in beiden Abbildungen die Winkelhalbierende dargestellt (gestrichelte Linie), welche die Lage der Datenpunkte bei einer 1:1 Relation markiert. Die generelle Beobachtung, dass in allen Fällen mehr γ H2A.X- als pATM-Foci nachgewiesen wurden, spiegelt sich auch in dieser Abbildung wider, insofern die Datenpunkte unter der Winkelhalbierenden liegen.

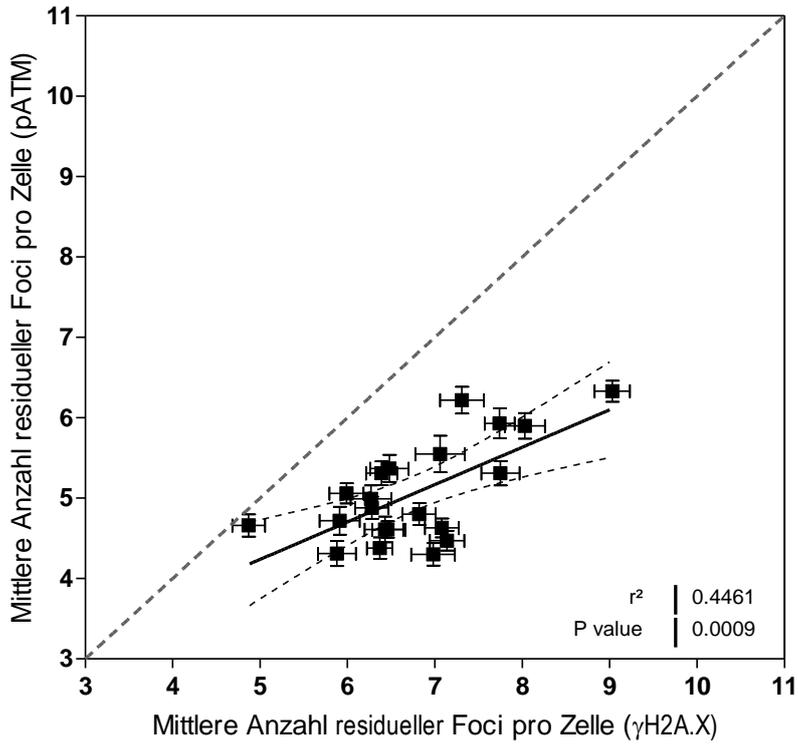


Abbildung 18: Zusammenhang der mittleren Anzahlen residueller γ H2A.X- und pATM-Foci nach Bestrahlung mit 4 Gy (Mittelwert \pm SE; Lin. Regression \pm 95% CI).

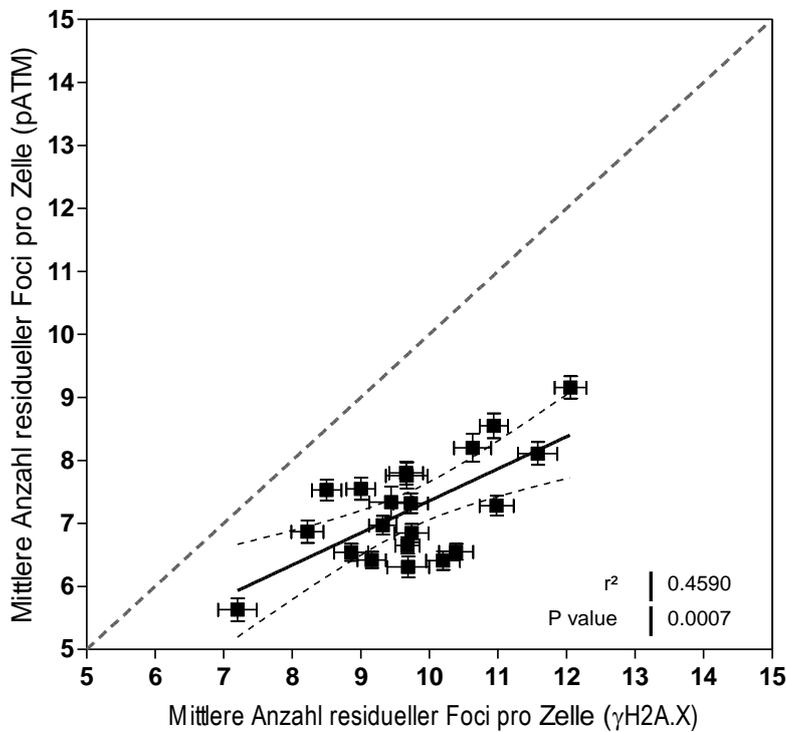


Abbildung 19: Zusammenhang der mittleren Anzahlen residueller γ H2A.X- und pATM-Foci nach Bestrahlung mit 6 Gy (Mittelwert \pm SE; Lin. Regression \pm 95% CI).

Zur ergänzenden Visualisierung des Zusammenhangs residueller γ H2A.X- und pATM-Foci auf individueller Ebene, werden die Probanden in eine Rangordnung gebracht, die ihrer angenommenen Strahlenempfindlichkeit entspricht, wobei die zelluläre Strahlenempfindlichkeit als umso ausgeprägter anzusehen ist, je mehr residuelle Foci im Mittel nach einer bestimmten Bestrahlungsdosis in den Lymphozyten nachgewiesen werden.

Die Rangordnungen sind für die Gesamtdosen von 4 Gy und 6 Gy in den folgenden vier Abbildung zusammengefasst, wobei jeweils die Ergebnisse bezüglich des γ H2A.X- bzw. pATM-Nachweises getrennt dargestellt werden, unter Beibehaltung der Rangfolge, die sich anhand der γ H2A.X Ergebnisse ergibt. Anhand der Ähnlichkeit der Rangreihen kann somit der Zusammenhang der individuellen Werte verdeutlicht werden.

Abbildung 20 zeigt die mittlere Anzahl residueller γ H2A.X-Foci eines jeden Probanden nach Bestrahlung mit 4 Gy. Die Probanden wurden in eine Reihenfolge gebracht, die ihrer von links nach rechts zunehmenden Strahlensensibilität entspricht, wenn die individuellen Foci-Anzahlen als Parameter zur Einschätzung zugrunde gelegt werden. Analog zu **Abbildung 20** zeigt **Abbildung 21** die Mittelwerte residueller pATM-Foci ebenfalls nach Bestrahlung mit 4 Gy. Die Reihenfolge der Probanden wurde dabei zur besseren Vergleichbarkeit aus **Abbildung 20** übernommen.

Die Rangfolgen, welche sich je nach zum Nachweis verwendeten reparaturassoziierten Protein unterscheiden, korrelieren zu $r = .51$ ($p = .018$, Spearman-Rangkorrelation). Somit ist festzustellen, dass ein Proband, der sich durch eine hohe Anzahl an residuellen γ H2A.X-Foci auszeichnet, auch signifikant mehr residuelle pATM-Foci aufweist.

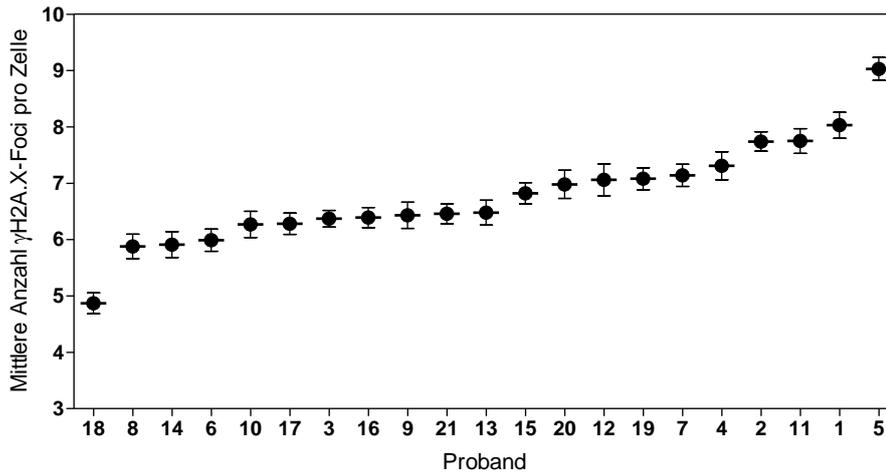


Abbildung 20: Mittlere Anzahl residueller γ H2A.X-Foci nach Bestrahlung mit 4 Gy (Mittelwert \pm SE).

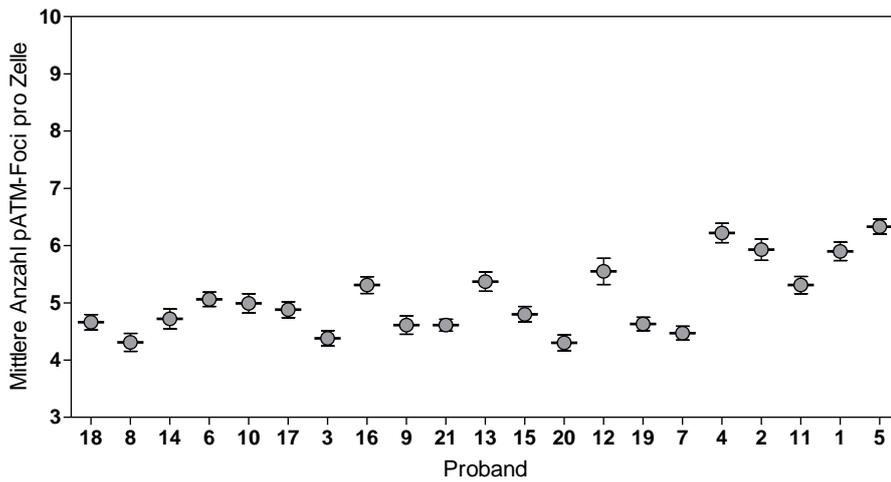


Abbildung 21: Mittlere Anzahl residueller pATM-Foci nach Bestrahlung mit 4 Gy (Mittelwert \pm SE).

Vergleichbares gilt für die Ergebnisse nach Bestrahlung mit 6 Gy. Diese sind in **Abbildung 22** und **Abbildung 23** dargestellt. Ein Vergleich der Rangordnungen der Probanden nach 6 Gy Bestrahlungsdosis ergibt bei einer Korrelation von $r = .43$ einen tendenziell signifikanten⁶ Zusammenhang der Rangfolgen ($p = .053$, Spearman-Rangkorrelation).

⁶ Tendenziell signifikant: $.05 < p < .10$

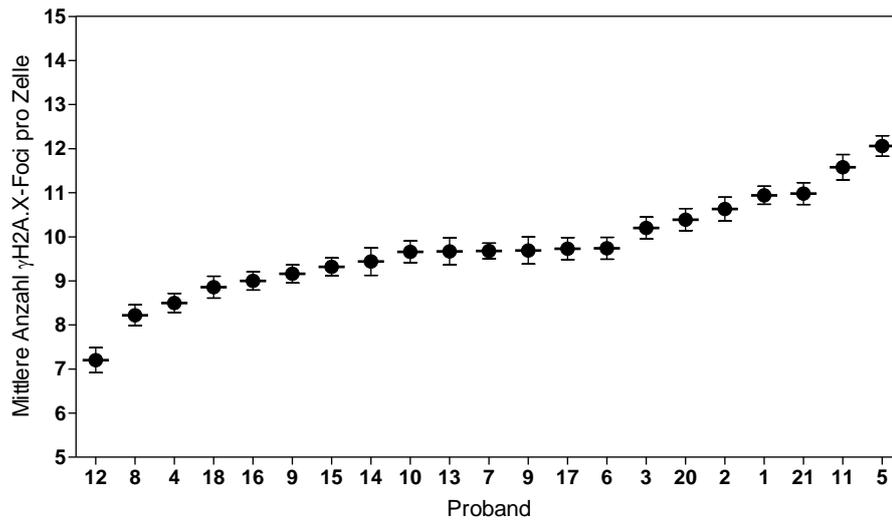


Abbildung 22: Mittlere Anzahl residueller γ H2A.X-Foci nach Bestrahlung mit 6 Gy (Mittelwert \pm SE).

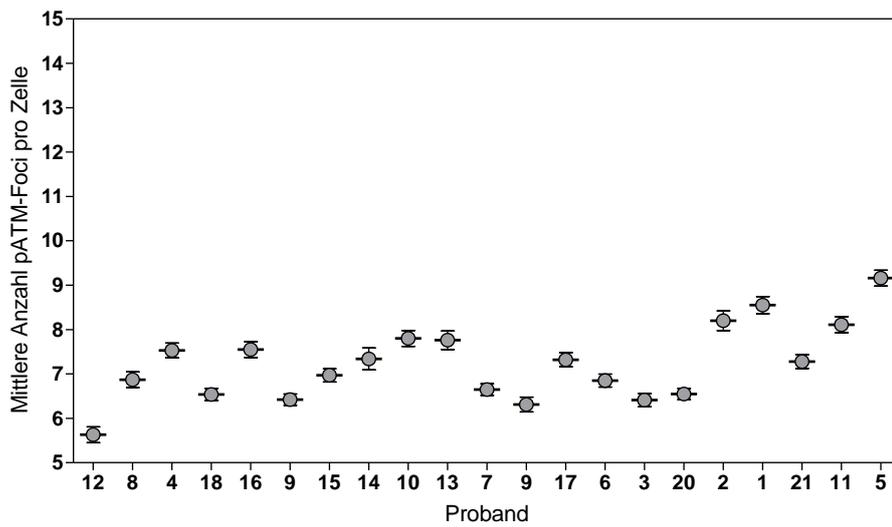


Abbildung 23: Mittlere Anzahl residueller pATM-Foci nach Bestrahlung mit 6 Gy (Mittelwert \pm SE).

4.4. Bestimmung der individuellen Strahlensensibilität mittels Chromosomenaberrationen

Als weiteres im Rahmen dieser Arbeit eingesetztes Nachweisverfahren der individuellen zellulären Strahlensensibilität wurden mittels Metaphasentechnik strahleninduzierte letale Chromosomenaberrationen nachgewiesen (G_0/G_1 -Assay). Nach Bestrahlung der Proben von 16 der 21 Probanden mit 3 und 6 Gy wurden die Lymphozyten aus der G_0 -Phase zum Eintritt in den Zellzyklus stimuliert, für 72 Stunden inkubiert und anschließend in der Metaphase fixiert. In diesem Zustand können Chromosomenschäden nach Anfärbung der Chromosomen mikroskopisch untersucht werden. Aus den hinsichtlich Dosis und Proband verblindeten Proben wurden Chromosomenfragmente von 50 Metaphasen pro Spender und Dosispunkt (bzw. 25 Metaphasen der unbestrahlten Proben) ausgezählt.

Nach Auszählung der Chromosomenaberrationen erfolgte die weitere Auswertung der Daten mittels GraphPad Prism. Die Ergebnisse wurden mit den Resultaten der Fluoreszenzmikroskopie der Personen verglichen.

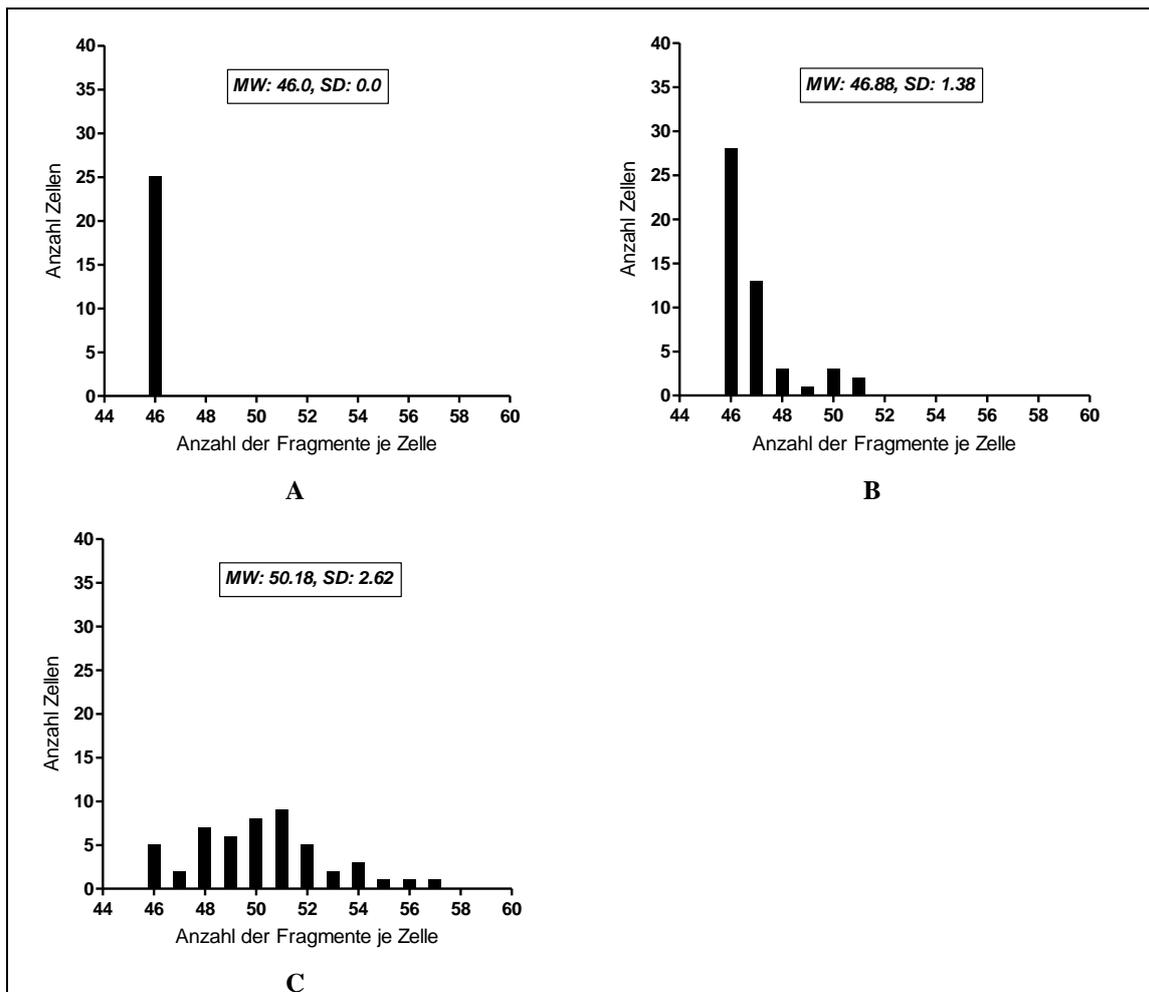


Abbildung 24: Verteilung der Chromosomenfragmente in den ausgezählten Zellen nach 0 (A), 3 (B) und 6 Gy (C) Bestrahlungsdosis (exemplarisch für Proband 17).

Abbildung 24 zeigt exemplarisch die Häufigkeitsverteilungen der Chromosomenfragmente für einen der Probanden in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. In den unbestrahlten Proben lagen in allen Zellen 46 Chromosomenfragmente pro ausgewerteter Metaphase vor. Dieses entspricht dem diploiden Chromosomensatz humaner Lymphozyten. Mit zunehmender Gesamtdosis ist eine Rechtsverschiebung der Verteilung der Chromosomenfragmente, hin zu höheren Werten, zu beobachten. Auch nimmt die Breite der Verteilungen zu. Die Mittelwerte lagen im Falle dieses Probanden für 3 Gy bei 46,9 (SD = 1,38) Chromosomenfragmenten pro Zelle sowie für 6 Gy bei 50,2 (SD = 2,62).

Für die nachfolgenden Auswertungen wurden jeweils die 0 Gy-Werte von den Fragmentanzahlen nach 3 und 6 Gy abgezogen. Die resultierenden Werte werden im Weiteren

ren als „zusätzliche Fragmente“ bezeichnet. Die **Abbildung 25** und **Abbildung 26** zeigen die Häufigkeitsverteilungen zusätzlicher Fragmente aller Probanden nach Bestrahlung mit 3 Gy bzw. 6 Gy.

Die Probanden weisen nach Bestrahlung mit 3 Gy im Mittel 1.0 zusätzliche Fragmente mit einer Standardabweichung von 0.29 bzw. einem Variationskoeffizienten von 27.9% auf (siehe **Abbildung 25**). Nach Bestrahlung mit 6 Gy ergeben sich im Mittel 3.8 Fragmente mit einer Standardabweichung von 0.48 bzw. einem Variationskoeffizienten von 12.7% (siehe **Abbildung 26**).

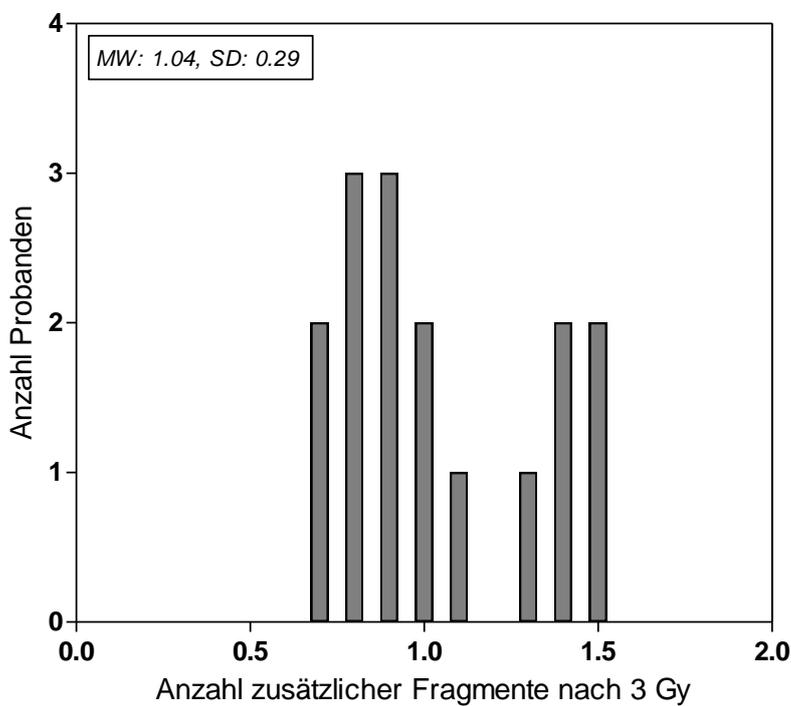


Abbildung 25: Häufigkeitsverteilungen der zusätzlichen Chromosomenfragmente nach 3 Gy Bestrahlungsdosis.

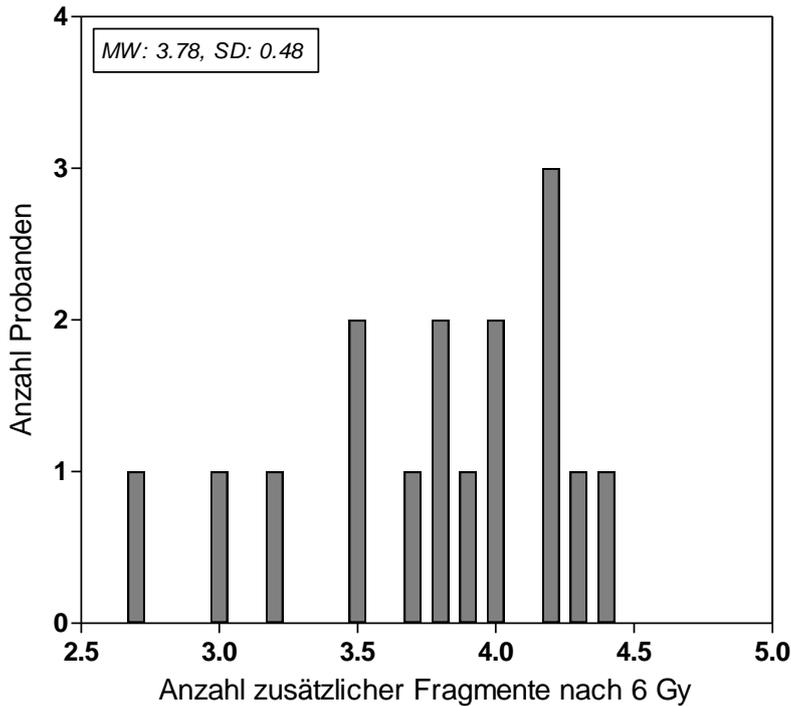


Abbildung 26: Häufigkeitsverteilungen der zusätzlichen Chromosomenfragmente nach 6 Gy Bestrahlungsdosis.

Analog zu den Ergebnissen residueller Foci wurde auch für letale Chromosomenaberrationen überprüft, ob mit Hilfe dieses Endpunkts individuelle Unterschiede unabhängig von der Dosis dargestellt werden können. Dazu wurde in **Abbildung 27** die Anzahl zusätzlicher Fragmente nach 3 Gy in Abhängigkeit der Anzahl zusätzlicher Fragmente nach 6 Gy aufgetragen.

Die berechnete Korrelation der Werte nach 3 und 6 Gy Bestrahlungsdosis ergibt ein r von .45 ($p = .079$, tendenziell signifikant). Die berechnete Lineare Regression für die Daten liefert ein r^2 von .20 ($p = .079$, tendenziell signifikant).

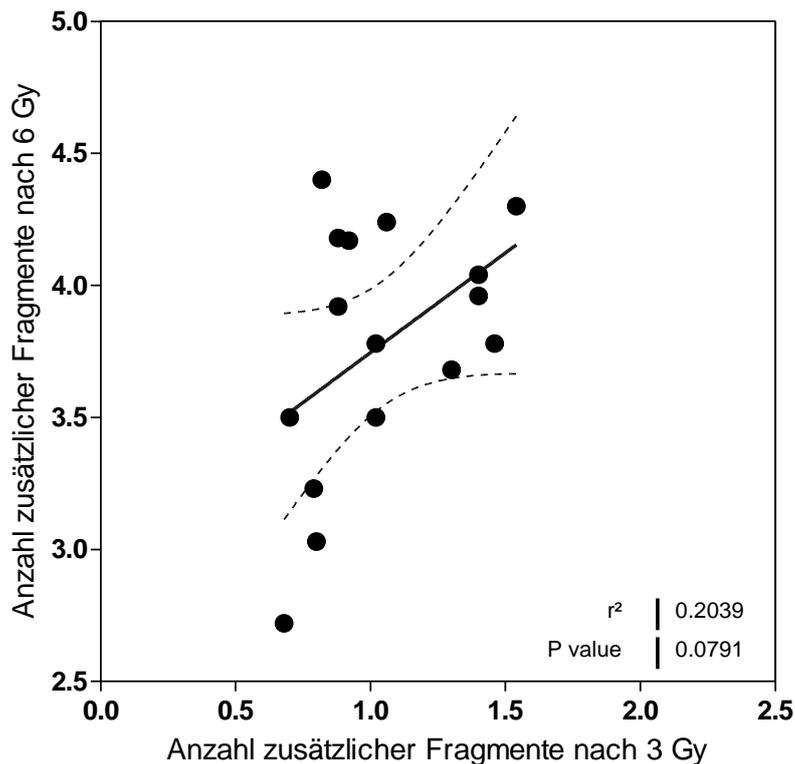


Abbildung 27: Zusammenhang der zusätzlichen Chromosomenfragmente nach 3 und 6 Gy Bestrahlungsdosis (Lin. Regression \pm 95% CI).

Abschließend wurden die individuellen Anzahlen residueller γ H2A.X- und pATM-Foci jedes Probanden nach 6 Gy Bestrahlungsdosis den korrespondierenden Werten zusätzlicher chromosomaler Fragmente nach 6 Gy gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 28** und **Abbildung 29** dargestellt. Im Falle der γ H2A.X-Foci ergab die berechnete Lineare Regression ein r^2 von .02 (n. s.), die Höhe der entsprechenden Korrelation lag bei $r = .15$ (n. s.). Für pATM-Foci ergaben sich aus der Regression ein r^2 von .03 sowie ein Korrelationskoeffizient von $-.17$ (n. s.). Es kann demnach im vorliegenden Fall ebenfalls nur von einem sehr geringen Zusammenhang zwischen den auf diese verschiedenen Weisen bestimmten Charakterisierungen der individuellen Strahlensensibilität ausgegangen werden.

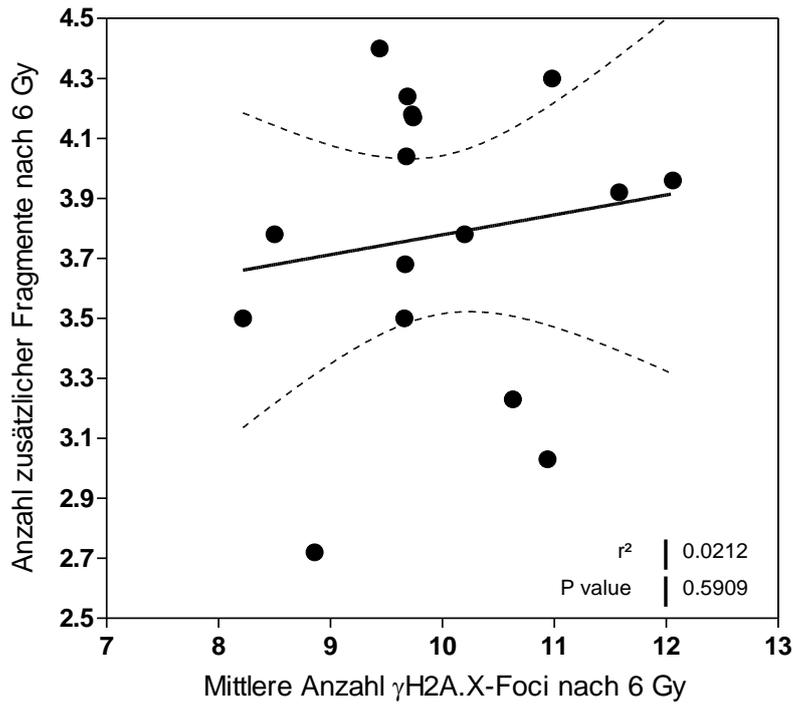


Abbildung 28: Zusammenhang residueller γ H2A.X-Foci mit zusätzlichen Chromosomenfragmenten nach 6 Gy (Lin. Regression \pm 95% CI).

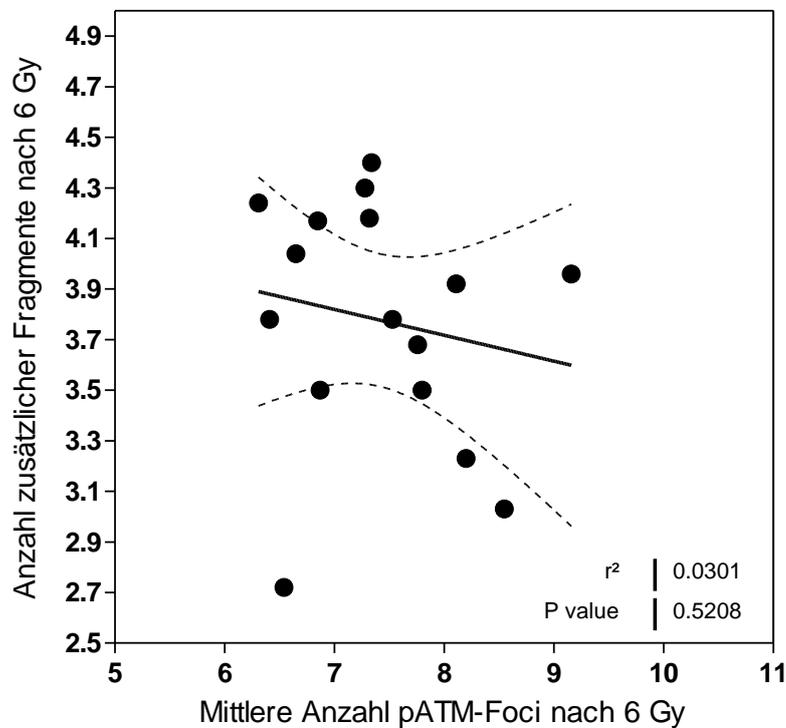


Abbildung 29: Zusammenhang residueller pATM-Foci mit zusätzlichen Chromosomenfragmenten nach 6 Gy (Lin. Regression \pm 95% CI).

4.5. Flusszytometrischer Nachweis des γ H2A.X-Signals

Für 7 der 21 Probanden wurde ergänzend der flusszytometrische Nachweis des γ H2A.X-Signals als Maß der Anzahl residueller Doppelstrangbrüche durchgeführt und überprüft, inwieweit diese Ergebnisse äquivalent zu den Befunden der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung sind. Die Aufbereitung der Lymphozyten geschah dabei analog zur mikroskopischen Auswertung. Als Bestrahlungsdosen wurden 4, 6 und 8 Gy gewählt und zur Detektion der DNA-Schäden die Anfärbung mit einem für die Flusszytometrie geeigneten, fluoreszenzgekoppelten Antikörper gegen γ H2A.X vorgenommen. Nach Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten der Proben im FACSCanto wurden die Messergebnisse mit dem Programm „FACSDiva“ und weiterführend mit GraphPad Prism ausgewertet.

Nachdem durch sogenanntes „gaten“ Zelltrümmer und zusammenhängende Zellen – sogenannte Dubletten – von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden, dienten die Mediane der Fluoreszenzintensitäten als Maß für die Menge an gebundenem γ H2A.X und somit als Korrelat für die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche, die im Mittel in den Zellen der Proben vorlagen. **Abbildung 30** zeigt die Dosis-Effekt-Kurven, die anhand der Mittelwerte der medianen Intensitäten der Proben jedes Probanden erstellt wurden. Abgezogen wurde zuvor die basale Fluoreszenz der jeweiligen Kontrollprobe, um die Vergleichbarkeit zwischen den Probanden sowie zur Foci-Zählung zu erhöhen. Für jede Dosisstufe wurden – mit Ausnahme eines Probanden, für den nur ein Messwert vorliegt – zwischen einer und sechs Messwiederholungen durchgeführt. Des Weiteren wurde für jeden Probanden mittels Linearer Regression überprüft, ob sich ein linearer Anstieg der Intensität mit zunehmender Dosis nachweisen lässt.

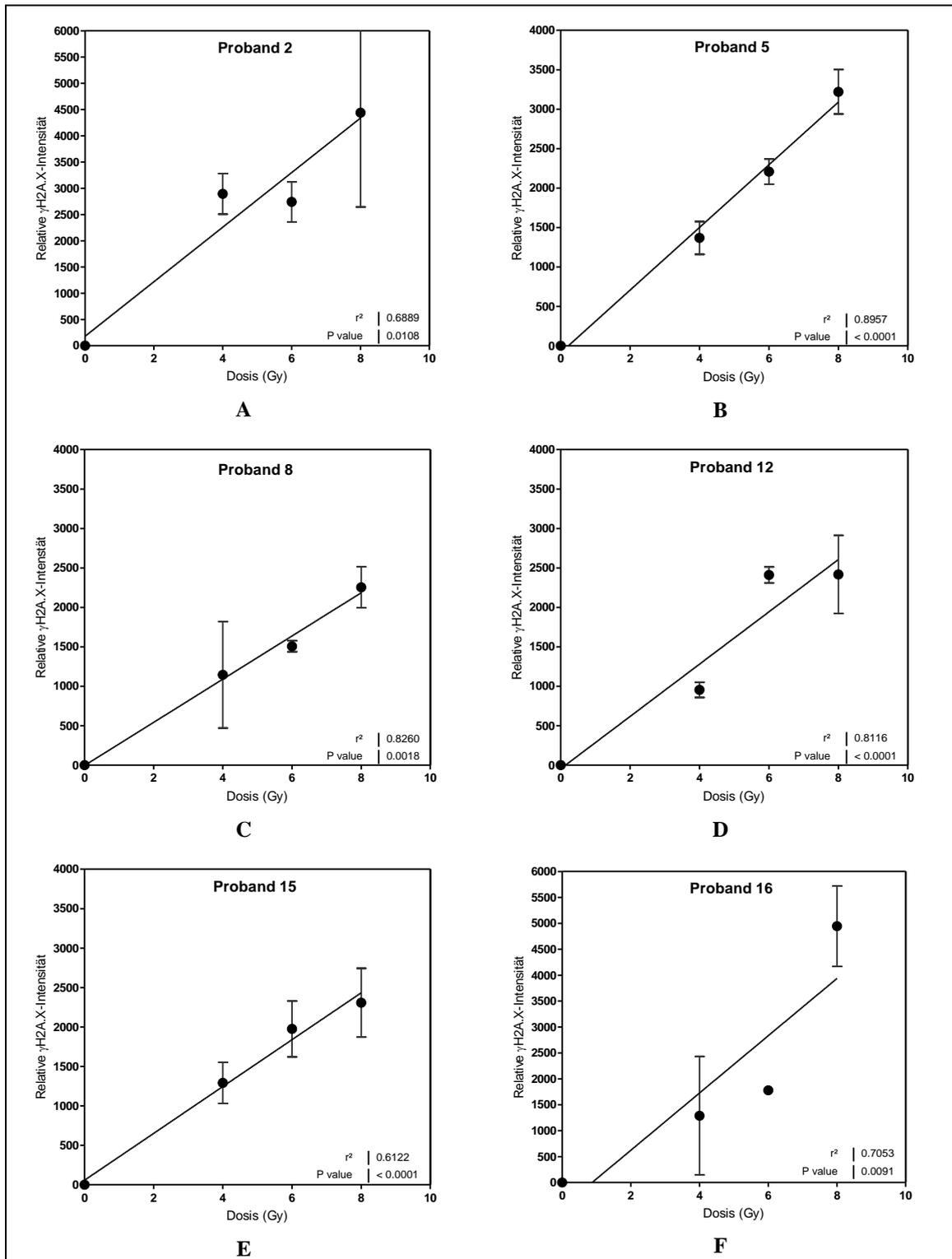


Abbildung 30: Zunahme der γ H2A.X-Fluoreszenzintensitäten mit der Dosis im flusszytometrischen Nachweis (Mittelwert der Messwiederholungen \pm SE; Lin. Regression).

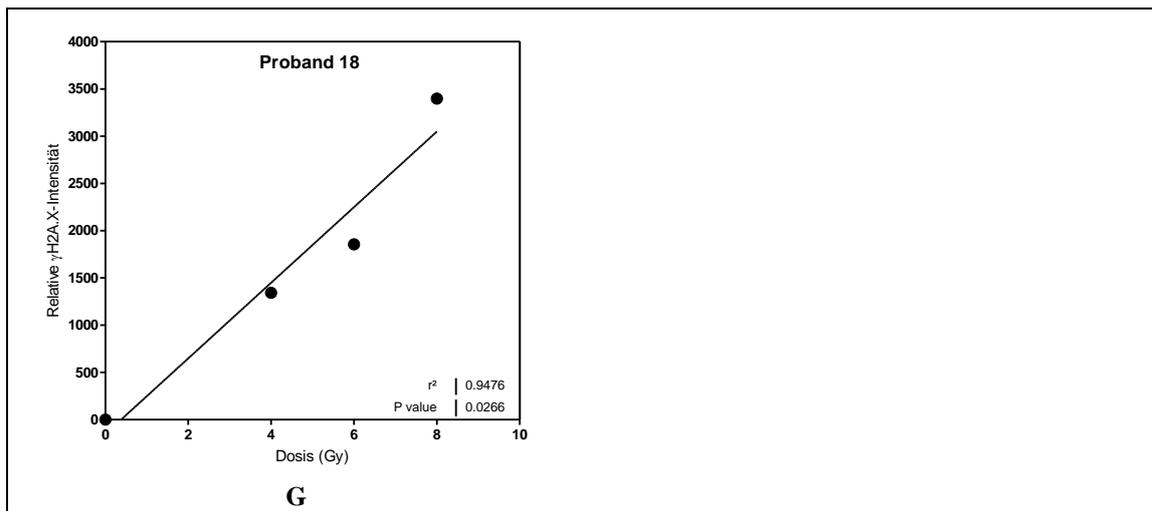


Abbildung 30 (Fortsetzung): Zunahme der γ H2A.X-Fluoreszenzintensitäten mit der Dosis im flusszytometrischen Nachweis (Mittelwert der Messwiederholungen \pm SE; Lin. Regression).

Aus **Abbildung 30** wird ersichtlich, dass die Intensitäten für die einzelnen Dosispunkte innerhalb eines Probanden teilweise ausgeprägt zwischen den Messwiederholungen variieren (für Proband 18 liegt nur eine verwertbare Messung vor); trotzdem können in allen Fällen deutliche Dosis-Effekt-Beziehungen nachgewiesen werden. Für die Intensitäten und die verschiedenen Bestrahlungsdosen ergeben sich nach Berechnung Linearer Regressionen Zusammenhänge zwischen $r^2 = .61$ und $r^2 = .95$. Die entsprechenden Korrelationen liegen zwischen $r = .890$ und $r = .996^7$.

Abbildung 31 zeigt die Variation der medianen γ H2A.X-Intensitäten zwischen und innerhalb der Probanden nach Bestrahlung mit 6 Gy, die in bis zu sechs Einzelmessungen je Proband bestimmt wurden. Die Bestrahlungsdosis von 6 Gy wurde gewählt, um einen Vergleich mit der mikroskopischen Auswertung durchführen zu können. Die gemessenen Intensitäten variieren innerhalb der einzelnen Probanden mit einem jeweiligen Variationskoeffizienten von 5.1%, 6.6% bzw. 19.6% für zwei Messwiederholungen, 7.3% für drei Wiederholungen, 16.1% für fünf Wiederholungen sowie 44.1% im Fall der Durchführung von sechs Messwiederholungen. Die Variation zwischen den Probanden entspricht mit einem Mittelwert von 2068.7 und einer Standardabweichung von 416.59 einem Variationskoeffizienten von 18.6%.

⁷ Es wurden drei Nachkommastellen angegeben um rundungsbedingte Korrelation zu 1.0 zu vermeiden.

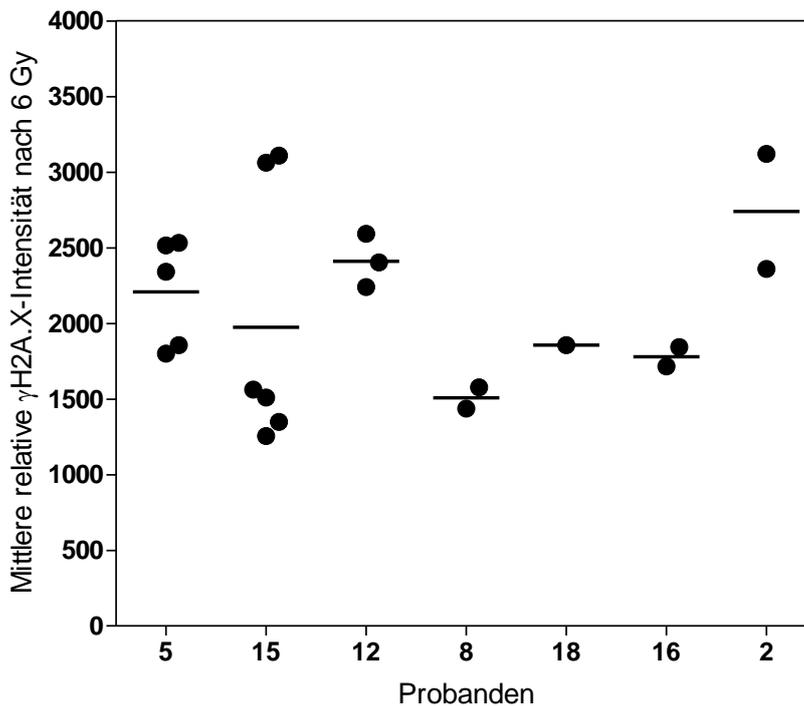


Abbildung 31: Variation der medianen γ H2A.X-Intensität zwischen und innerhalb der Probanden nach einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy (die eingezogenen horizontalen Linien markieren den jeweiligen Mittelwert der Mediane je Proband).

In **Abbildung 32** und **Abbildung 33** wird die flusszytometrisch bestimmte γ H2A.X-Intensität eines Probanden seiner mittleren Foci-Anzahl (γ H2A.X in **Abbildung 32**, pATM in **Abbildung 33**) für eine Bestrahlungsdosis von 6 Gy gegenübergestellt. Mittels Linearer Regression bzw. Korrelation wird der Zusammenhang von flusszytometrischem Nachweis mit beiden Foci-Entitäten überprüft. Um die methodenbedingte teilweise starke Variation der einzelnen Messwerte je Dosisstufe und Proband, welche einen Zusammenhang mit den Foci-Daten gegebenenfalls verdecken könnte, zu umgehen, wurde für die nachfolgenden Darstellungen auf flusszytometrischer Seite die mittels Linearer Regression aus den flusszytometrisch ermittelten Werten des jeweiligen Probanden vorhergesagte γ H2A.X-Intensität zu 6 Gy Bestrahlungsdosis verwendet.

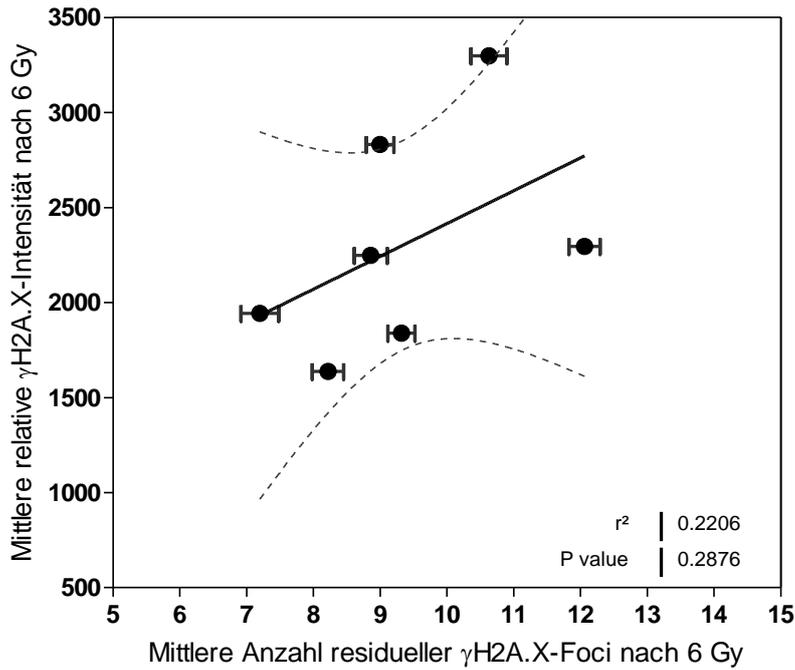


Abbildung 32: Zusammenhang der gemessenen Intensitäten mit den mittleren Anzahlen residueller γ H2A.X-Foci nach Bestrahlung mit 6 Gy (Flusszytometrie: Mittelwert der Messwiederholungen \pm SE, Fluoreszenzmikroskopie: Mittelwert \pm SE; Lin. Regression \pm 95% CI).

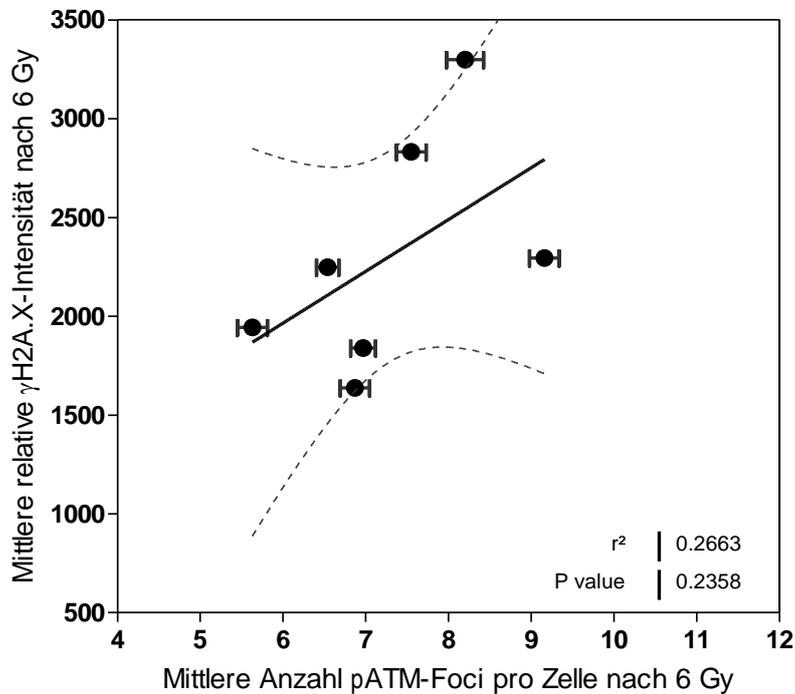


Abbildung 33: Zusammenhang der gemessenen Intensitäten mit den mittleren Anzahlen residueller pATM-Foci nach Bestrahlung mit 6 Gy (Flusszytometrie: Mittelwert der Messwiederholungen \pm SE, Fluoreszenzmikroskopie: Mittelwert \pm SE; Lin. Regression \pm 95% CI).

Es zeigt sich zwischen den flusszytometrisch bestimmten Intensitäten der Proben und den mikroskopisch ausgezählten γ H2A.X-Foci für eine Bestrahlungsdosis von 6 Gy ein Zusammenhang mit einem r^2 von .22 (n. s.). Die berechnete Korrelation ergibt ein r von .47 (n. s.). Für pATM ergibt sich aus der Linearen Regression ein Zusammenhang mit einem r^2 von .27 (n. s.). Dieses entspricht in der Korrelation einem r von .52 (n. s.).

5. DISKUSSION

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit, das heißt die Sensitivität von Zellen gegenüber ionisierender Strahlung, findet Ausdruck in der Inaktivierung der betroffenen Zellen. Diese wird maßgeblich durch nicht-reparierte Doppelstrangbrüche in der DNA bedingt. Daher gelten diese residuellen Doppelstrangbrüche als Surrogatmarker der zellulären Strahlenempfindlichkeit und können als sogenannte „Foci“ unter Verwendung geeigneter Antikörper gegen reparatur-assoziierte Proteine nachgewiesen werden. Dabei sind diejenigen Proteine, die unmittelbar an der Erkennung und Prozessierung von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind, generell geeigneter als solche, die später in die Signalkasade der Doppelstrang-Reparatur eingreifen.

Der Nachweis erfolgt durch Fluoreszenzmarkierung der Antikörper und Auszählung der Foci im Fluoreszenzmikroskop. Diese Auszählung gewährleistet die Erfassung einzelner Doppelstrangbrüche, ist aber für den klinischen Einsatz, zum Beispiel im Screening von Strahlentherapiepatienten zur prätherapeutischen Ermittlung der zellulären Strahlenempfindlichkeit, zu zeitaufwändig. Eine Automatisierung der Auswertung und somit die Reduktion von Zeit- und Arbeitsaufwand, sind daher wünschenswert, und wären mit Hilfe der Flusszytometrie realisierbar. Generell ist eine Quantifizierung des Fluoreszenzsignals mittels Flusszytometrie möglich und in der Literatur beschrieben, jedoch war diese Methode bislang nicht im Labor der Arbeitsgruppe „Prädiktion“ des Labors für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie etabliert.

Als vergleichsweise etabliert gilt der Nachweis des phosphorylierten H2A.X (γ H2A.X), welches durch die phosphorylierte Form des ATM-Proteins (pATM) aktiviert wird. Da pATM in der Signalkaskade vor γ H2A.X agiert, ist dieses möglicherweise spezifischer und als Surrogatmarker dem γ H2A.X überlegen. Mit der kommerziellen Verfügbarkeit hochqualitativer Antikörper gegen pATM besteht die Möglichkeit, dieses zum Nachweis residueller Doppelstrangbrüche einzusetzen. Voraussetzung dafür ist die Implementierung der Methode an geeigneten Zellsystemen und der Abgleich der Ergebnisse mit bewährten Methoden zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit, wie zum Beispiel der quantitative Nachweis letaler Chromosomenaberrationen mittels G₀/G₁-Assay.

Lymphozyten sind insofern als optimales Zellsystem für die vorliegende Untersu-

chung anzusehen, da sie zum einen nachweislich die intrinsische Strahlenempfindlichkeit eines Individuums abbilden (Rübe et al., 2008). Zum anderen ist mit dem G₀/G₁-Assay eine bewährte Methode zur Bestimmung der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit etabliert, welche auf dem Nachweis strahleninduzierter letaler Chromosomenaberrationen beruht (Borgmann et al., 2002). Darüber hinaus können Lymphozyten relativ einfach gewonnen werden. Ihre Aufarbeitung ist mit vergleichsweise geringem Aufwand verbunden und es ist keine Kultivierung und somit vorausgehende Selektion von aus Biopsien gewonnenen Zellen notwendig.

Vor diesem Hintergrund ergaben sich folgende Fragestellungen der vorliegenden Arbeit:

1. Ist die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen pATM im Zusammenhang mit dem Nachweis residueller Doppelstrangbrüche besser geeignet als der Einsatz des etablierten Antikörpers gegen γ H2A.X?
2. Können γ H2A.X- bzw. pATM- Foci als Surrogatmarker der individuellen Strahlenempfindlichkeit den etablierten Nachweis mittels letaler Chromosomenaberrationen ersetzen oder ergänzen?
3. Lassen sich interindividuelle Unterschiede der zellulären Strahlenempfindlichkeit auch durch flusszytometrischen Nachweis fluoreszenzmarkierter Reparaturproteine, hier γ H2A.X, darstellen?

Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten des peripheren Bluts von gesunden Probanden durchgeführt. Für den Vergleich des Nachweises der γ H2A.X- bzw. pATM-Foci wurde ein Kollektiv von 21 Probanden untersucht. Für die Verifikation der Ergebnisse mittels letaler Chromosomenaberrationen standen 16 Probanden zur Verfügung. Die Implementierung des flusszytometrischen Nachweises erfolgte an den Lymphozyten von 7 Probanden. Bei der Auswahl der Probanden wurde darauf geachtet Personen auszuwählen, die anhand des Nachweises mittels Foci-Auszählung möglichst ausgeprägte Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit aufwiesen.

5.1. Immunhistochemischer Nachweis und mikroskopische Darstellung

residueller γ H2A.X- und pATM-Foci

Wie in **Abbildung 2** dargestellt, konnten mit den verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen γ H2A.X bzw. pATM residuelle Foci eindeutig nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Kernfärbung mittels DAPI gewährleistete die Identifizierung der einzelnen Lymphozyten und ihre Abgrenzung gegeneinander, auch wenn diese keine oder nur sehr wenige Foci aufwiesen, wie es in den Kontrollproben der Fall war. Lymphozyten, welche morphologische Anzeichen einer Apoptose, wie z.B. Kerndeformationen, aufwiesen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. In den ausgewerteten Zellen konnten die einzelnen Foci in der Regel gut gegeneinander abgegrenzt und somit relativ einfach ausgezählt werden. Allerdings schienen pATM-Foci im Vergleich zu γ H2A.X tendenziell kleiner zu sein. Auch war die unspezifische Hintergrundanfärbung stärker ausgeprägt, was die Auszählung der pATM-Foci etwas erschwerte. Generell waren pATM- mit γ H2A.X-Foci kolokalisiert, in der Umkehrung war allerdings nicht jeder γ H2A.X-Focus auch mit einem pATM-Focus assoziiert (siehe **Abbildung 2**).

Im Folgenden sollen die Ergebnisse unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur bewertet werden:

5.2. Nachweis reparatur-assoziiertes Proteins in unbestrahlten Lymphozyten

Wie in **Abbildung 3** exemplarisch sowie in **Abbildung 4** und **Abbildung 5** zusammenfassend dargestellt, bestanden mit einer Standardabweichung von 0.41 deutliche Unterschiede in der Anzahl spontaner γ H2A.X-Foci zwischen den Probanden. Für pATM fielen diese interindividuellen Unterschiede deutlich geringer aus (Standardabweichung: 0.09). Des Weiteren lagen im Mittel 0.54 γ H2A.X Foci vor, wohingegen nur eine mittlere Anzahl von 0.12 pATM Foci nachgewiesen werden konnte. Die Überprüfung dieser Mittelwertunterschiede mittels t-Test ergab einen deutlich signifikanten Unterschied ($p \leq .001$, vgl. **Abbildung 5**). Des Weiteren bestand zwischen beiden Foci-Entitäten kein bedeutsamer Zusammenhang, was durch die geringe, nicht signifikante Korrelation beider Parameter in **Abbildung 6** verdeutlicht wird. Um zu überprüfen, ob das Alter, als probandenseitiger Faktor, Einfluss auf die individuelle Anzahl spontaner

Foci hat, wurden, wie in **Abbildung 7** dargestellt, die entsprechenden Zusammenhänge mittels Linearer Regression bzw. Korrelation untersucht. Für γ H2A.X ergab sich mit einem r^2 von .38 ($p = .003$) ein deutlicher Zusammenhang. Die Anzahl spontaner γ H2A.X-Foci nahm mit steigendem Alter eines Probanden zu. Für pATM konnte kein derartiger Zusammenhang nachgewiesen werden ($r^2 = .02$, n. s.).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass spontane pATM- im Gegensatz zu γ H2A.X-Akkumulationen in Lymphozyten nicht nur seltenere Ereignisse sondern auch physiologisch unterschiedliche Prozesse abbilden und zum Nachweis strahleninduzierter DBS besser geeignet sind, da sie unabhängig von Charakteristika der Probanden erscheinen. Dieses Ergebnis wurde nach Kenntnis der Autorin bislang in der Literatur nicht beschrieben.

Während für unbestrahlte Lymphozyten die Kolokalisation spontaner γ H2A.X- mit spontanen 53BP1-Foci vielfach bestätigt wurde (vgl. u.a. Chua et al., 2011, de Feraudy et al., 2010, Guirouilh-Barbat et al., 2008), ist die Kolokalisation von γ H2A.X mit pATM nur vereinzelt und widersprüchlich dokumentiert. So konnten Rube et al. (2011) eine Kolokalisation beider Foci-Entitäten nachweisen, wobei dieses sich ausschließlich auf CD34-positive hämatopoietische Progenitor- bzw. Stammzellen bezieht. Mognato et al. (2009) berichten, dass unbestrahlte humane Lymphozyten mehr γ H2A.X als pATM-Foci aufweisen. Für Fibroblasten wird eine Kolokalisation für Zellen in Konfluenz beschrieben (Grudzenski et al., 2010), während für exponentiell wachsende Fibroblasten wiederum ein Überschuss an γ H2A.X Foci dokumentiert wurde (Suzuki et al., 2006).

Unter Berücksichtigung der von Cleaver (2011) und Revet et al. (2011) angeführten Argumente, nach denen γ H2A.X-Foci nicht ausschließlich mit DNA-Doppelstrangbrüchen assoziiert sind, sondern im Laufe physiologischer Prozesse wie Nukleotid-Exzissions-Reparatur, Replikationsarrest und Apoptose auftreten, sind die Ergebnisse dahingehend zu interpretieren, dass γ H2A.X im Gegensatz zu pATM in Lymphozyten zusätzliche Signale liefern, die mit physiologischen Prozessen dieser Zellen assoziiert sind. Darüber hinaus könnten, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die ausgeprägten Unterschiede zwischen den Foci-Entitäten bzw. individuellen Unterschiede in der Anzahl spontaner γ H2A.X-Foci auch mit dem Altersunterschied der Probanden erklärt werden. Hinweise darauf gibt die Untersuchung von Rube et al. (2011), die nachwies, dass mit dem Alter die Anzahl der

γ H2A.X-Foci in hämatopoietischen Progenitor- bzw. Stammzellen zunimmt. Indem für γ H2A.X auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass ein deutlicher Zusammenhang mit dem Alter der Probanden besteht, Vergleichbares aber nicht für pATM nachgewiesen wurde, wird die oben bereits dargestellte Schlussfolgerung, dass pATM-Foci spezifischer DNA-Schäden nachweisen, bestätigt.

5.3. Nachweis reparatur-assoziiertes Proteine in bestrahlten Lymphozyten

Die fortbestehenden Akkumulationen von reparatur-assoziierten Proteinen 24 Stunden nach Bestrahlung werden nicht-reparierten, d.h. residuellen Doppelstrangbrüchen zugeordnet, da zu diesem Zeitpunkt die Reparaturprozesse so gut wie vollständig abgeschlossen sind (Dikomey et al., 2003, Dikomey et al., 2000, Löbrich et al., 2010).

Um einen möglichst sicheren experimentellen Nachweis residueller Doppelstrangbrüche zu garantieren, wird an die verwendete Methode des mikroskopischen Foci-Nachweises eine Reihe von Anforderungen gestellt, die im Folgenden diskutiert werden.

5.3.1. Die Häufigkeiten residueller Foci pro Zelle folgen einer Poisson-Verteilung

Auch wenn zahlreiche Studien belegen, dass residuelle Foci nicht-reparierte DNA-Schäden darstellen und somit als Surrogatmarker der zellulären Strahlenempfindlichkeit anzusehen sind, ist es notwendig, die Qualität der experimentellen Bestimmung dieses Endpunktes durch Überprüfung grundsätzlicher Annahmen zu verifizieren. In diesem Zusammenhang gilt es zu überprüfen, inwieweit die Häufigkeiten residueller Foci pro Zellkern – basierend auf der Treffertheorie – einer Poisson-Verteilung folgen (vgl. u.a. Edwards et al., 1979, Rothkamm und Löbrich, 2003). Alle Ergebnisse der Auszählung residueller Foci wurden daher als Häufigkeitsverteilungen dargestellt (siehe Anhang 9.2) und die Daten mit denjenigen verglichen, die nach der Poisson-Verteilung zu erwarten wären. Es zeigte sich, dass die gefundenen Ergebnisse den Verteilungserwartungen gut entsprachen (vgl. auch **Abbildung 8**). Da sich eine Poisson-Verteilung mit steigendem Erwartungswert (in diesem Fall: Anzahl der Foci bzw. Doppelstrangbrüche pro Zelle) an eine Normalverteilung annähert, in allen hier untersuchten Fällen eine nahezu vollständige Übereinstimmung von Erwartungswert der jeweiligen Poisson-Verteilung und dem arithmetischen Mittel der ermittelten Verteilung vorlag und unter diesen Bedingun-

gen eine Verwendung des arithmetischen Mittelwerts in der Literatur üblich ist (vgl. u.a. Borgmann et al., 2007), wurde auch in der vorliegenden Arbeit der arithmetische Mittelwert der Foci pro Zellkern als Parameter verwendet.

5.3.2. Die Anzahl residueller Foci nimmt mit steigender Dosis zu

Neben der charakteristischen Häufigkeitsverteilung residueller Foci ist generell deren Zunahme mit steigender Dosis zu erwarten.

Wie in **Abbildung 9** dargestellt, zeigte sich im hauptsächlich untersuchten Dosisbereich bis 6 Gy für alle Probanden sowie für beide untersuchten Proteine ein linearer Anstieg der Foci-Anzahl mit steigender Bestrahlungsdosis. Die Lineare Regression ergab sowohl für γ H2A.X als auch für pATM ein r^2 von .96 (p in beiden Fällen $<.001$) Zusätzlich wurde für zwei der Probanden ein erweiterter Dosisbereich bis 10 Gy untersucht. **Abbildung 10** und **Abbildung 11** demonstrieren auch in diesem höheren Dosisbereich den klaren Zusammenhang zwischen Dosis und Foci-Anzahl. Und auch wenn diese Ergebnisse nur exemplarisch an zwei Probanden bis zu einer Dosis von 10 Gy erhoben wurden, kann die Beobachtung als genereller Zusammenhang bewertet werden. Ein linearer Zusammenhang zwischen Foci-Anzahl und Bestrahlungsdosis findet gleichsam in der Literatur allgemeine Bestätigung. So dokumentieren u.a. Beels et al. (2009), Beels et al. (2010), Golfier et al. (2009), Löbrich et al. (2005), MacPhail et al. (2003), Redon et al. (2010), Roch-Lefèvre et al. (2010), Zwicker et al. (2011) sowie Lavaf et al. (2009) für verschiedene Zellentitäten die Linearität der Dosis-Effekt Beziehung sowohl für initiale als auch residuelle γ H2A.X-Foci. Auch für pATM konnte ein vergleichbares Ergebnis gefunden werden (Lavaf et al., 2009). Allerdings wird die Ermittlung großer Foci-Anzahlen nach hohen Dosen als problematisch diskutiert, da sich einzelne Foci möglicherweise überlappen und nicht mehr getrennt als einzelne Ereignisse gezählt werden können (Roch-Lefèvre et al., 2010, Rothkamm und Horn, 2009). Rothkamm und Horn (2009) geben hier als Richtwert an, dass ab einer Anzahl von 50 Foci pro Lymphozyt keine zuverlässige Zählung mehr möglich ist: Die Überlagerung einzelner Foci führt zu einer Unterschätzung der Werte und somit einer Abflachung der Dosis-Effekt-Kurve im Bereich hoher Dosen. Die in **Abbildung 10** und **Abbildung 11** dargestellten Dosis-Effekt-Kurven residueller pATM-Foci lassen für beide untersuchten Probanden eine Abflachung im Dosisbereich von mehr als 8 Gy erkennen. Dieses kann aber nicht

mit einer Überlagerung zu vieler, nicht mehr einzeln zählbarer Foci erklärt werden, da auch nach Dosen von 8 Gy bzw. 10 Gy die residuellen Foci als klar abgrenzbare Ereignisse erkennbar waren, wie generell in **Abbildung 2** dokumentiert. Des Weiteren liegen die Ergebnisse mit Werten von im Mittel 10.0 bzw. 11.0 Foci pro Zelle weit unter der von Rothkamm und Horn (2009) kommunizierten Maximalanzahl von 50 zählbaren Foci. Wesentlich gegen eine Unterschätzung durch Überlagerung spricht auch der Vergleich mit γ H2A.X. Dort steigt die Dosis-Effekt-Kurve auch im Intervall von 8 Gy auf 10 Gy mit Maximalwerten von 19.0 γ H2A.X-Foci linear an. Da es keine Veranlassung gibt anzunehmen, dass nach Bestrahlung mit 10 Gy im Mittel 11.0 pATM-Foci weniger gut voneinander abzugrenzen sind als 19.0 γ H2A.X-Foci, kann die Abflachung der Dosis-Effekt-Kurve nicht auf eine daher stammende Unterschätzung der Werte nach 10 Gy zurückgeführt werden.

In der Literatur liegen nur vereinzelt Daten bezüglich der Dosis-Effekt-Beziehung von residuellen pATM-Foci vor. So berichten Lavaf et al. (2009) einen linearen Anstieg initialer sowie residueller Foci im Dosisbereich bis 4 Gy, doch beziehen sich diese Ergebnisse auf Tumorzellen in Kultur. Für humane Lymphozyten liegen keine entsprechenden Ergebnisse vor, somit erlangen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit besondere Bedeutung.

Ob es sich bei der hier beobachteten Abflachung der Dosis-Effekt-Beziehungen um einen Zufallsbefund handelt oder ob dies Ausdruck eines biologisch-physiologischen Prozesses ist, lässt sich nicht abschließend beurteilen. Eine Abflachung der Dosis-Effekt-Kurven im Bereich höherer Dosen für reparatur-assoziierte γ H2A.X bzw. 53BP1 Foci wird von Markova et al. (2011) für humane Lymphozyten berichtet, die umso ausgeprägter war, je länger das Zeitintervall nach Bestrahlung andauerte, wobei Zeitintervalle von bis zu vier Wochen ausgewertet wurden. Dieser biphasische Verlauf der Dosis-Effekt-Beziehung wird von den Autoren dahingehend interpretiert, dass nach Bestrahlung geschädigte Lymphozyten in Apoptose gehen und daher gerade nach längerem Zeitintervall nicht mehr erfasst werden konnten.

Nach Bestrahlung können Apoptose-assoziierte morphologische Veränderungen bei Lymphozyten – wie Kondensation des Chromatins und DNA-Fragmentierung – schon nach 12-24 Stunden beobachtet werden (Markova et al., 2011). Und auch wenn Zellen in späteren Apoptose-Stadien aufgrund ihrer typischen Morphologie in der vorliegenden

Arbeit von der mikroskopischen Auszählung ausgeschlossen wurden, muss berücksichtigt werden, dass die Identifizierung jener Zellen nicht vollständig erfolgen konnte, da die hier verwendete methodische Aufbereitung von Präparaten zur Auszählung von Lymphozyten auf Objektträgern, insbesondere die Permeabilisierung und Fixierung, nicht der optimalen Aufbereitung zur Identifizierung apoptotischer Zellen z.B. durch Doppelfärbung mit Acridin-Orange und Propidium-Iodid entspricht (Markova et al., 2011). So ist es zwar denkbar, dass Foci aus Zellen, die sich in früheren Apoptose-Stadien befinden, in der Auswertung Berücksichtigung finden. Dennoch legt der lineare Anstieg der Anzahl an γ H2A.X-Foci im gesamten untersuchten Dosisbereich nahe, dass keine apoptotische Inaktivierung der Lymphozyten vorlag. Auch wenn generell nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine hohe pATM-Expression einen Übergang in die Apoptose bewirkt, sind bislang keine Mechanismen bekannt, auf die diese Beobachtung zurückgeführt werden kann. Wahrscheinlicher ist, dass pATM- im Gegensatz zu γ H2A.X-Foci bei hohen Dosen verstärkt konfluieren, und somit die Anzahl an Foci ab- und dafür deren Größe zunimmt. So wurde von Yamauchi et al. (2008) für humane Fibroblasten nicht nur die Zunahme der Größe von pATM Foci, sondern auch die Dosisabhängigkeit dieses Prozesses dokumentiert. Dieses wurde auch für γ H2A.X beobachtet und von den Autoren als Abbild der fortschreitenden Reparatur gewertet. Unter der Annahme, dass Vergleichbares für humane Lymphozyten gilt, dort aber ausschließlich pATM-Foci und nicht γ H2A.X-Foci an Größe zunehmen, können die Ergebnisse dahingehend erklärt werden, dass im Dosisbereich bis 8 Gy die Anzahl an kleineren pATM-Foci linear mit der Dosis zunimmt, ab bestimmten höheren Dosen jedoch eher größere pATM-Foci vorliegen – diese dafür in geringerer Anzahl. Da in der vorliegenden Untersuchung die Größe der Foci nicht bewertet wurde, könnte diese Hypothese nur durch weitere experimentelle Bearbeitung überprüft werden.

5.3.3. *Individuelle Unterschiede in der Anzahl residueller Foci sind dosisunabhängig*

Generell ist zu fordern, dass individuelle Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit unabhängig von der applizierten Gesamtdosis bestehen. Die Eignung des zum Nachweis verwendeten Parameters, lässt sich anhand der Korrelation bzw. der Linearen Regression von Daten überprüfen, die bei den gleichen Probanden für unterschiedliche Gesamtdosen ermittelt wurden. Dieses dient der Untersuchung der intraindividuellen Stabilität der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Bestrahlungsdosen bzw. der Überprüfung der Konsistenz der Daten innerhalb eines Reparaturproteins. Ergebnisse für γ H2A.X- bzw. pATM-Foci nach 4 Gy und 6 Gy sind **Abbildung 12** und **Abbildung 13** zu entnehmen. Auch wenn in beiden Fällen eine statistisch signifikante Korrelation dargestellt werden konnte, ergeben sich deutliche Unterschiede für die beiden verwendeten Endpunkte: Die Ergebnisse für γ H2A.X streuen wesentlich stärker um die Regressionsgerade und kennzeichnen damit einen weniger engen Zusammenhang der Messwerte als dieses für pATM der Fall ist. Diesen Unterschied verdeutlichen auch die entsprechenden Regressionskoeffizienten mit einem r^2 von .30 für γ H2A.X und .45 für pATM.

Im Falle von pATM fielen allerdings zwei Wertepaare auf, die eindeutig außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls lagen. Auch wenn diese statistisch in ihrer jeweiligen univariaten Verteilung nicht als Ausreißer klassifiziert werden konnten, stellen sie jedoch im Fall der bivariaten Regressionsanalyse Ausreißer dar und ein Ausschluss dieser Werte von der Analyse wäre somit vertretbar. In diesem Fall würde sich ein Regressionskoeffizient von $r^2 = .83$ ergeben, welcher den vorher bereits deutlichen Zusammenhang der Messwerte noch angemessener beschreibt.

Als wichtiges Ergebnis dieser Auswertung ist somit festzuhalten, dass im Gegensatz zu pATM mittels γ H2A.X nur eine mittelgradige Assoziation der 4 Gy mit den 6 Gy Werten gezeigt werden konnte. Somit ist festzustellen, dass – zumindest im Dosisbereich bis 8 Gy – pATM-Foci zum Nachweis residueller Doppelstrangbrüche geeigneter sind als γ H2A.X-Foci. Diese Schlussfolgerung findet Bestätigung in den Arbeiten von Suzuki et al. (2006). Diese zeigen im Vergleich beider Reparaturproteine den Vorteil von pATM zum Nachweis residueller Doppelstrangbrüche in exponentiell wachsenden Fibroblasten. Rube et al. (2011) und Wilson et al. (2010) beschreiben beide Proteine als

gleichwertig, wobei dieses darauf zurückzuführen ist, dass Zellen mit geringer Proliferationsaktivität untersucht wurden.

Die vorliegende Arbeit kann den Vorteil von pATM gegenüber γ H2A.X im Nachweis residueller Doppelstrangbrüche hinsichtlich einer dosisunabhängigen Stabilität der Ergebnisse für Lymphozyten und somit für eine weitere bisher nicht untersuchte Zellentität bestätigen.

5.3.4. Assoziation von γ H2A.X und pATM-Foci

Die Assoziation der Ergebnisse für die jeweils im Foci-Nachweis verwendeten Proteine, wurde sowohl über einen direkten Vergleich der Mittelwerte als auch über den Nachweis eines Zusammenhangs mittels Linearer Regression bestimmt.

Wie in **Abbildung 14** bis **Abbildung 17** zusammenfassend dargestellt, wurden ausgeprägte Unterschiede in der mittleren Anzahl residueller Foci in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers nachgewiesen. In allen Fällen wurden bei vergleichbarer Variationsbreite der Einzelwerte deutlich mehr γ H2A.X- als pATM-Foci gezählt. Der Mittelwertsvergleich mittels t-Test ergab sowohl für eine Bestrahlungsdosis von 4 Gy als auch von 6 Gy signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Mittelwerten beider Foci-Entitäten (in beiden Fällen $p \leq .001$, vgl. **Abbildung 16** und **Abbildung 17**).

Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen beiden reparatur-assoziierten Proteinen getrennt für beide Dosisstufen bestimmt. Wie in **Abbildung 18** und **Abbildung 19** dargestellt, konnten mit $r^2 = .45$ (für 4 Gy) und $r^2 = .46$ (für 6 Gy) deutliche signifikante Zusammenhänge nachgewiesen werden (in beiden Fällen $p \leq .001$).

Aus den in **Abbildung 14** bis **Abbildung 19** sowie **Abbildung 20** bis **Abbildung 23** dargestellten Ergebnissen wird somit deutlich, dass nach einer bestimmten Bestrahlungsdosis individuell in jedem Fall mehr γ H2A.X- als pATM-Foci nachgewiesen werden konnten. Auf Ebene des einzelnen Probanden besteht allerdings auch ein großer Zusammenhang zwischen den bestimmten Werten, sodass angenommen werden kann, dass beide Foci-Entitäten entweder dieselben zellulären Prozesse in unterschiedlich präzisem Ausmaß abbilden oder neben einem gemeinsamen Anteil zusätzlich auch spezifische Vorgänge der zellulären Reaktion widerspiegeln.

Der Nachweis residueller Doppelstrangbrüche mittels pATM-Foci wurde erst mit der Verfügbarkeit hochqualitativer kommerziell verfügbarer Antikörper möglich. Die

Mehrheit der thematisch relevanten Publikationen bezieht sich daher zum einen auf die Verwendung von γ H2A.X, welches als erstes zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis residueller Doppelstrangbrüche eingesetzt wurde (vgl. u.a. Banáth und Olive, 2003, Pilch et al., 2003, Rogakou et al., 1998, Rothkamm et al., 2003). Zum anderen wird die Verwendung von 53BP1 in zahlreichen Studien behandelt. 53BP1 wird für proliferierende Zellen empfohlen, da es nicht, wie γ H2A.X, reparatur-unabhängige S-Phase-spezifische Signale nachweist (Anderson et al., 2001, de Feraudy et al., 2010). Wilson et al. (2010) konnten für Fibroblasten nach Bestrahlung mit sehr geringen Dosen von 0.05 Gy eine vollständige Kolo-kalisation von pATM- und γ H2A.X-Signalen nachweisen. Vergleichbares berichtet Rube et al. (2011) für CD34⁺- und CD34⁻- Stamm- bzw. Progenitorzellen. Unterschiede im Nachweis von residuellen Doppelstrangbrüchen mittels γ H2A.X und pATM berichten Suzuki et al. (2006) für exponentiell wachsende Fibroblasten, wobei die beobachteten zusätzlichen γ H2A.X nach Aussage der Autoren darauf zurückzuführen sind, dass die Phosphorylierung des H2A.X nicht nur durch ATM sondern auch durch Ataxia telangiectasia and RAD3 related (ATR) und DNA-dependant protein kinase (DNA-PK) vermittelt wird, und somit γ H2A.X-Signale nicht notwendigerweise Doppelstrangbrüche repräsentieren (Burma et al., 2001, Stiff et al., 2004, vgl. Suzuki et al., 2006, Wang et al., 2005, Ward und Chen, 2001). Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen auch Luther et al. (2008). Im Rahmen ihrer Arbeit erzeugten sie bei verschiedenen Zelllinien DNA-Schäden durch chemische Noxen in unterschiedlicher Konzentration. Im nachfolgenden Vergleich von γ H2A.X und pATM mittels Foci-Nachweis fanden sie pro Zellkern im Mittel sehr viel niedrigere Anzahlen an pATM- als an γ H2A.X-Foci. Tanaka et al. (2007a), (2007b) weisen darauf hin, dass die Interpretation des γ H2A.X-Signals in Zellen kritisch zu diskutieren ist, da H2A.X auch in Abwesenheit von DNA-Doppelstrangbrüchen phosphoryliert wird und somit die strahlungsinduzierten Zellschäden nicht in jedem Fall zuverlässig abgebildet werden können.

Auch die Arbeit von Fürweger et al. (2007) beschreibt Unterschiede für pATM und γ H2A.X im Nachweis von DNA-Schäden nach Bestrahlung, wobei nach hoch-LET-Bestrahlung eine Zunahme an pATM-Foci im Vergleich zu γ H2A.X beschrieben wird, was vor dem Hintergrund zu interpretieren ist, dass hoch-LET-Strahlung komplexere DNA-Schäden induziert. Die vermehrte Präsenz von pATM-Foci weist wiederum da-

rauf hin, dass diese die Reparaturprozesse realistischer abbilden als γ H2A.X, dessen Sensitivität im Nachweis von Reparaturprozessen von einigen Autoren aktuell sehr kritisch bewertet wird (Cleaver, 2011, Revet et al., 2011).

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass γ H2A.X im Nachweis residueller Doppelstrangbrüche zusätzliche Signale liefert, die nicht reparaturassoziiert sind. Wie schon für die Beobachtung spontaner Foci, können auch diese Ergebnisse mit apoptotischen Prozessen der Lymphozyten nach Bestrahlung erklärt werden. Somit müssen die Ergebnisse unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur dahingehend bewertet werden, dass pATM-Foci für den Nachweis residueller Doppelstrangbrüche in Lymphozyten besser geeignet sind als der bislang häufiger verwendete Nachweis von γ H2A.X.

5.4. Vergleich der Ergebnisse des Foci-Nachweises mit denen des Nachweises letaler Chromosomenaberrationen

Wie in **Abbildung 16** und **Abbildung 17** dargestellt, können sowohl für residuelle γ H2A.X- als auch für residuelle pATM-Foci deutliche individuelle Unterschiede zwischen den 21 untersuchten Probanden nachgewiesen werden. Als Maß der Variation kann der Variationskoeffizient der Verteilung verwendet werden. Dieser liegt unabhängig von Dosis und untersuchtem Protein im Foci-Nachweis zwischen 11.57 und 13.24, was bedeutet, dass die einzelnen Messwerte der pATM- bzw. γ H2A.X-Foci in vergleichbarem Umfang relativ zum jeweiligen Mittelwert ihrer Verteilung streuen. Werden hingegen die Standardabweichungen der vier Ergebnisse und somit die absoluten Verteilungsbreiten betrachtet, wird deutlich, dass diese generell nach 6 Gy Bestrahlungsdosis höher sind als nach 4 Gy. Da der Nachweis individueller Unterschiede umso eher möglich ist, je größer diese Unterschiede sind, hat sich die Verwendung möglichst hoher Testdosen bewährt, die aber im Falle von Lymphozyten nicht zu hoch sein sollten, da sonst in den relativen kleinen Zellen sehr viele Signale entstehen, die nicht mehr zuverlässig voneinander abgegrenzt werden können. Die in **Abbildung 16** und **Abbildung 17** dargestellten Ergebnisse belegen, dass die gewählten Testdosen von 4 Gy und – insbesondere – 6 Gy gut geeignet sind, individuelle Unterschiede in der Anzahl residueller Foci und somit in der Anzahl residueller Doppelstrangbrüche nachzuweisen. Die gute Eignung einer Dosis von 6 Gy stimmt mit Daten aus der Literatur und bestehenden

Erfahrungen der Arbeitsgruppe „Prädiktion“ überein (Borgmann et al., 2008, Borgmann et al., 2002).

Zur Bewertung der Eignung von γ H2A.X- bzw. pATM-Foci im Nachweis residueller Doppelstrangbrüche ist eine Verifikation der Daten mittels bewährter Nachweismethoden unerlässlich. Als eine solche etablierte Nachweismethode bietet sich der G₀/G₁-Assay an, welcher die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung erfasst. Die Methode beruht auf dem Prinzip, DNA-Schäden durch Bestrahlung zu induzieren, welche in der nächsten Mitose zu Chromosomenaberrationen prozessiert werden. Diese können nach Präparation der Zellen in der Metaphase dargestellt sowie mikroskopisch identifiziert und quantifiziert werden. Da Lymphozyten proliferationsinaktiv sind, besteht im Rahmen dieses Assays die Notwendigkeit, die Zellen durch Behandlung mit PHA in den Zellzyklus zurückzuführen.

Letale Chromosomenaberrationen gelten als ein wichtiger Surrogatmarker der zellulären Strahlenempfindlichkeit und konnten in einer Reihe klinischer Studien mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit, d. h. dem Risiko strahleninduzierter Nebenwirkungen, assoziiert werden (Barber et al., 2000, Borgmann et al., 2008, Borgmann et al., 2002, Chua et al., 2011, Hoeller et al., 2003). Allerdings ist ein routinemäßiger Einsatz des G₀/G₁-Assays zur Charakterisierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit wenig praktikabel, da Aufbereitung und Auswertung der Präparate sehr zeitaufwändig sind und bislang keine Automatisierung des Verfahrens möglich ist.

Als weitere Limitationen dieses Assays müssen folgende Aspekte angeführt werden:

Aufgrund der proliferativen Inaktivität der Lymphozyten müssen diese, wie bereits angesprochen, zur Darstellung chromosomaler Aberrationen in den Zellzyklus zurückgeführt werden. Die Stimulation der Zellen erfolgt dabei in der Regel mittels PHA. Da Zellen in Abhängigkeit ihres proliferativen Zustandes bzw. ihrer Zellzyklusphase unterschiedliche Mechanismen zur Reparatur strahlungsbedingter DNA-Schäden zur Verfügung haben, ist es möglich, dass die Stimulation der Zellen auch einen Einfluss auf das zelluläre Überleben nach Bestrahlung, d.h. auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit, hat. Carloni et al. (2001) untersuchten, inwieweit die strahlungsbedingte Apoptoserate von Lymphozyten durch PHA-Gabe modifiziert wird. Sie verglichen Ausmaß und Kinetik apoptotischer DNA-Fragmentierung in ruhenden und nach Bestrahlung stimulierten Lymphozyten und konnten zeigen, dass Apoptose in den proliferierenden Lymphozyten

signifikant seltener auftrat. PHA bzw. der proliferative Status scheinen Lymphozyten demnach vor dem apoptotischen Zelltod nach Bestrahlung zu bewahren. Ein derartiger Einfluss auf das Zellüberleben kann die Aussagekraft des G_0/G_1 -Assay hinsichtlich der zellulären Strahlenempfindlichkeit einschränken.

Des Weiteren erreichen die Zellen nach Eintritt in den Zellzyklus in einem variablen Zeitfenster die nächste Mitose. Das Zeitintervall zwischen Stimulation und Fixierung der Zellen muss dahingehend optimiert werden, lang genug zu sein, sodass möglichst viele Zellen die nächste Mitose erreichen, aber kurz genug, damit möglichst wenig Zellen Gelegenheit haben einen nächsten Zellzyklus zu durchlaufen, sich somit bereits in der zweiten Mitose befinden und evtl. mehr letale Chromosomenschäden präsentieren. Diese methodische Einschränkung kann als Ursache für Widersprüche zwischen einzelnen Untersuchungen angesehen werden (vgl. auch Barber et al., 2000, Borgmann et al., 2008, Borgmann et al., 2002, Chua et al., 2011, Hoeller et al., 2003).

Trotz dieser methodischen Einschränkungen gilt der G_0/G_1 -Assay bislang als 'gold standard' im Nachweis der zellulären Strahlenempfindlichkeit (Borgmann et al., 2008, Borgmann et al., 2002, vgl. auch Chua et al., 2011, Keller et al., 2004) und wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung zur Verifikation der mittels residueller γ H2A.X- bzw. pATM-Foci bestimmten zellulären Strahlenempfindlichkeit humaner Lymphozyten verwendet.

Wie in **Abbildung 24** dargestellt, kann der G_0/G_1 -Assay in der vorliegenden Arbeit gut eine Zunahme chromosomaler Aberrationen mit steigender Bestrahlungsdosis abbilden.

Des Weiteren zeigen die **Abbildung 25** und **Abbildung 26**, dass generell individuelle Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit zwischen den Probanden mittels letaler Chromosomenaberrationen dargestellt werden konnten. Für eine Bestrahlungsdosis von 3 Gy ergab sich ein Variationskoeffizient von 27.5%, für 6 Gy ein Koeffizient von 12.7%. Die Betrachtung der nicht am jeweiligen Mittelwert der Verteilung relativierten Standardabweichung verdeutlicht allerdings besser, dass mit der Bestrahlungsdosis von 6 Gy absolut gesehen größere Differenzen zwischen den Probanden nachgewiesen werden können als für 3 Gy. Somit können sowohl der Foci-Nachweis als auch der G_0/G_1 -Assay interindividuelle Unterschiede nach der höheren Bestrahlungsdosis von 6 Gy besser abbilden als nach einer Dosis von 3 Gy.

Die Überprüfung der dosisunabhängigen Stabilität der Ergebnisse des G₀/G₁-Assays ist in **Abbildung 27** dargestellt. Doch waren diese Daten im Vergleich zum Nachweis residueller Foci weniger überzeugend. Die Konsistenz der Ergebnisse des Assays über die beiden Dosisstufen 3 Gy und 6 Gy war deutlich geringer als im Falle des Foci-Nachweises. Es konnte gezeigt werden, dass die zusätzlichen chromosomalen Fragmente mit einem r^2 von .20 zusammenhängen (vgl. **Abbildung 27**). Dem gegenüber konnte für die entsprechende Dosisstabilität des Foci-Nachweises im Fall von γ H2A.X ein r^2 von .29 sowie im Fall von pATM sogar ein r^2 von .45 gezeigt werden (vgl. **Abbildung 12** und **Abbildung 13**). In einer vergleichbaren Arbeit berichten Borgmann et al. (2008) von einem Zusammenhang der nach 3 Gy und 6 Gy bestimmbaren Anzahlen chromosomaler Aberrationen von $r^2 = .11$, welcher in diesem Fall allerdings aufgrund der deutlich größeren Anzahl untersuchter Personen signifikant wurde.

Diese Ergebnisse zur Dosisstabilität weisen darauf hin, dass die Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels Nachweis residueller Foci möglicherweise präziser gelingt als unter Verwendung des G₀/G₁-Assays. Ob dieses allerdings generell oder nur für die vorliegende Untersuchung gilt, kann nicht abschließend beurteilt werden, da in der Literatur keine entsprechenden Vergleiche mit Foci-Daten dokumentiert sind.

Abschließend wurden für die Bestrahlungsdosis von 6 Gy die Ergebnisse des Foci-Nachweises und des G₀/G₁-Assays auf ihren Zusammenhang überprüft (vgl. **Abbildung 28** und **Abbildung 29**). Eine entsprechende Korrelation residueller Doppelstrangbrüche mit letalen Chromosomenaberrationen konnte weder für γ H2A.X- noch für pATM-Foci dargestellt werden. Dieses kann darin begründet sein, dass der Nachweis letaler Chromosomenaberrationen, wie oben genannt, aus methodischen Gründen nicht zuverlässig möglich war. Die Anfälligkeit des G₀/G₁-Assay wird von einer aktuellen diesbezüglichen Arbeit bestätigt: Chua et al. (2011) quantifizierten die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von 14 Patienten jeweils mittels G₀/G₁-Assay sowie mittels residueller γ H2A.X-Foci. Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung konnte in diesem Fall zwar eine Korrelation beider Bestimmungsmethoden nachgewiesen werden, welche allerdings deutlich vom betrachteten Typ chromosomaler Aberrationen abhing. Die deutlichste statistische Signifikanz wurde erreicht, wenn die Summe aller Aberrationen in der Analyse berücksichtigt wurde. Erfolgte die Berechnung nur für den Anteil der Deletionen,

schwächte sich der Zusammenhang ab, war aber dennoch signifikant. Für die Anzahl der Austauschaberrationen konnte schließlich kein signifikanter Zusammenhang dargestellt werden. Die Anzahl der Deletionen umfasst zusätzliche Fragmente in einer ausgezählten Metaphase, die nicht mit einem di- bzw. multizentrischen Chromosom assoziiert sind (Chua, 2011). In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich die Anzahl zusätzlicher G₁-Fragmente, d.h. Deletionen, analysiert. Auf eine zusätzliche Überprüfung weiterer aus der Auswertung ableitbarer chromosomaler Endpunkte, wie z.B. Anzahl dizentrischer Chromosomen, Austauschaberrationen oder Summe aller Veränderungen hinsichtlich ihres Zusammenhangs mit den Ergebnissen des Foci-Nachweises wurde verzichtet, um multiples Testen und damit verbundene Probleme der statistischen Bewertung der Ergebnisse zu vermeiden.

Zusammenfassend können die Ergebnisse des Vergleichs residueller γ H2A.X- bzw. pATM-Foci mit letalen Chromosomenaberrationen dahingehend gewertet werden, dass möglicherweise der Nachweis residueller Doppelstrangbrüche mittels pATM aufgrund höherer Dosisstabilität der Ergebnisse methodisch unproblematischer ist und die Ergebnisse somit reproduzierbarer sind. Letztgenanntes Verfahren scheint demnach zur Quantifizierung individueller Unterschiede der zellulären Strahlenempfindlichkeit besser geeignet zu sein.

5.5. Flusszytometrischer Nachweis residueller γ H2A.X-Foci

γ H2A.X-Expression gilt als Biomarker von DNA-Doppelstrangbrüchen. In unmittelbarer Nähe der DNA-Schäden akkumulieren diese Proteine und können durch Immunfluoreszenzanfärbung mikroskopisch als Foci visualisiert und quantifiziert werden. Dieser Ansatz zur Erfassung von DNA-Schäden und der zellulären Strahlenempfindlichkeit ist sehr sensitiv, benötigt aber relativ viel Zeit in der Durchführung (Rothkamm und Löbrich, 2003, Sedelnikova et al., 2002). Eine andere Möglichkeit der Quantifizierung der γ H2A.X-Expression besteht darin, nach Fluoreszenzmarkierung der Zellen, dieses flusszytometrisch nachzuweisen. Der Vorteil dieser Methode besteht vor allem darin, große Probenmengen in kurzer Zeit analysieren und somit als Screeningverfahren dienen zu können (Huang et al., 2005, Ismail et al., 2007). Obwohl bereits seit längerer Zeit kommerziell erwerbbar FACS-Kits zur γ H2A.X-Detektion vorliegen, sind noch

weiterreichende Untersuchungen, besonders an humanen Lymphozyten, zur residuellen γ H2A.X-Expression sowie zur interindividuellen Variabilität notwendig (Pope et al., 2011). Die vorliegende Arbeit diene unter anderem der Etablierung dieses wichtigen Analyseverfahrens im Labor der Arbeitsgruppe „Prädiktion“.

Zur Überprüfung, in wie weit eine flusszytometrischen Quantifizierung des Fluoreszenzsignals als äquivalente Alternative zur mikroskopischen Erfassung des γ H2A.X-Signals angesehen werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit für 7 der 21 Probanden der flusszytometrische Nachweis des γ H2A.X-Signals etabliert. Da für alle 21 Probanden zuvor der Foci-Nachweis durchgeführt wurde, war für diese 7 Probanden eine direkte Vergleichsmöglichkeit der beiden Nachweismethoden gegeben.

Zur Überprüfung einer gelungenen Anfärbung der Zellen mittels des im Rahmen dieser Arbeit genutzten FACS-Kits, wurde ein Teil der Proben vor der flusszytometrischen Analyse entnommen, auf Objektträger aufgebracht und mikroskopisch untersucht. Es konnten in allen Fällen abgrenzbare γ H2A.X-Foci sichergestellt werden.

Nach der Zytometrie wurden die Ergebnisse mit dem Programm „FACSDiva“ ausgewertet. Das „acquisition gate“, welches die Auswahl der zu analysierenden Zellen definiert, wurde in Anlehnung an vergleichbare Studien (u.a. Andrievski und Wilkins, 2009, Horn et al., 2011) so gewählt, dass die größte eindeutig abgrenzbare Zellpopulation mit intakten Nuklei erfasst und Zelltrümmer und zusammenhängende Zellen von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Als Endpunkt diene jeweils der Medianwert einer Messung, da dieser robuster gegenüber Ausreißern und Extremwerten ist als das arithmetische Mittel einer Verteilung (vgl. u.a. Smart et al., 2011).

Untersucht wurde zum einen die dosisabhängige Zunahme des γ H2A.X-Signals und dessen Variabilität innerhalb und zwischen den Personen. Zum anderen wurden die Ergebnisse mit denen der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der γ H2A.X-Foci auf Kompatibilität der Methoden überprüft.

5.5.1. Dosis-Effekt-Beziehung und Variabilität des γ H2A.X-Signals

Wie in **Abbildung 30** dargestellt, konnte für alle untersuchten Probanden eine deutliche Zunahme der γ H2A.X-Fluoreszenzintensitäten mit steigender Dosis nachgewiesen werden. Mittels durchgeführter Linearer Regression konnten größtenteils hochsignifikante Zusammenhänge mit Werten zwischen $r^2 = .61$ und $r^2 = .95$ nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Variation der Messwerte innerhalb eines jeweiligen Probanden wurden bis zu sechs experimentelle Wiederholungen durchgeführt. Wie **Abbildung 31** zeigt, konnte für eine Bestrahlungsdosis von 6 Gy generell eine geringe Variabilität, allerdings in zwei Fällen mit Variationskoeffizienten von 20% und über 40% auch eine große Schwankungsbreite der Messergebnisse innerhalb einer Person beobachtet werden. Im letztgenannten Fall ist es allerdings sehr wahrscheinlich, dass zwei Werte Messfehler widerspiegeln und evtl. auf fehlerhafte Probenaufbereitung zurückgeführt werden müssen. Da im vorliegenden Fall das flusszytometrische Verfahren erstmalig eingesetzt wurde, ist davon auszugehen, dass im Zuge weiterer Optimierungen hinsichtlich Standardisierung von Probenaufbereitung und Durchführung der Messungen, die intraindividuellen Schwankungen weitgehend gering gehalten werden können. Im Fall eines routinemäßigen Einsatzes der Flusszytometrie kann daher von stabileren Messwerten bei der wiederholten Untersuchung einer Person ausgegangen werden.

Weiterhin verdeutlicht **Abbildung 31** auch die Variationsbreite der Messergebnisse zwischen den Probanden: Für jeden Probanden wurde aus den Ergebnissen der einzelnen Experimente, wie in **Abbildung 31** dargestellt, der Mittelwert errechnet. Aus dem Vergleich dieser Mittelwerte konnte der Variationskoeffizient bestimmt werden: Der Variationskoeffizient von 18.6% zeigt, dass das angewandte Verfahren zwischen den Probanden gut differenzieren kann, da sich Unterschiede zwischen den Personen zuverlässig abbilden lassen.

Die eigenen Untersuchungen bestätigen die in der Literatur dokumentierten Ergebnisse bezüglich eines dosisabhängigen Anstiegs der γ H2A.X-Intensität. Die Dosis-Effekt-Zusammenhänge wurden, wie im vorliegenden Fall, durch eine lineare Funktion bestätigt. So konnten Horn et al. (2011) an Lymphozyten bei einem Zeitintervall von 24 Stunden zwischen Bestrahlung und Messung eine dosisabhängige Zunahme der γ H2A.X-Intensitäten zeigen. Im gesamten untersuchten Dosisbereich von 0 bis 8 Gy zeigte sich ein linearer Anstieg. Vergleichbare Ergebnisse berichten Bourton et al. (2011) ebenfalls an Lymphozyten für denselben Dosisbereich. Andrievski und Wilkins (2009) untersuchten verschiedene Lymphozyten-Subgruppen, welche sie anhand ihrer CD-Expression unterschieden, nach einem Lyse-Protokoll. Sie wiesen für alle Untergruppen einzeln sowie insgesamt eine lineare Dosisantwort bis zu einer Bestrahlungsdosis von 10 Gy nach.

Die Flusszytometrie ist demnach gut geeignet, eine dosisabhängige Zunahme der γ H2A.X-Expression abzubilden und ist somit dem bereits etablierten mikroskopischen Ansatz äquivalent.

Bezüglich der experimentellen Variabilität der Methode, d.h. den Unterschieden in den γ H2A.X-Intensitäten individueller Probanden in Mehrfachbestimmung, liegen in der Literatur nur sehr wenige Hinweise vor. Hamasaki et al. (2007) untersuchten mit Hilfe der Flusszytometrie kultivierte Lymphozyten sechs verschiedener Spender in drei wiederholten Messungen hinsichtlich der intraindividuellen Variation. Vierundzwanzig Stunden nach einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy zeigten sich trotz der geringen Anzahl an Probanden und Messwiederholungen tendenziell signifikante Unterschiede ($p = .065$) innerhalb eines jeweiligen Probanden. Andrievski und Wilkins (2009) untersuchten unter anderem die Lymphozyten eines Spenders in drei Experimenten und über einen Dosisbereich von 10 Gy. Es zeigte sich eine große Variabilität der Messwerte zwischen den Experimenten. Sie charakterisierten zusätzlich die Lymphozyten hinsichtlich ihrer CD4-, CD8- oder CD19-Expression und wiesen nach, dass sich Lymphozyten-Subgruppen deutlich in ihrer Fähigkeit unterschieden, strahlungsinduzierte Doppelstrangbrüche reparieren zu können. Da diese Subgruppen in den Proben in unterschiedlichen Verhältnissen vorlagen, konnten die gemessenen Differenzen der γ H2A.X-Intensität zwischen den einzelnen Proben des Spenders darauf zurückgeführt werden

Allerdings zeigten sich bei Andrievski und Wilkins (2009) diese Differenzen nur für niedrige Dosen bis 2 Gy und nach kurzen Reparaturzeiten bis ca. 10 Stunden. Es ist aber davon auszugehen, dass nach hohen Bestrahlungsdosen, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, Unterschiede in der Reparaturfähigkeit auch nach einer Reparaturzeit von 24 Stunden noch einen deutlichen Einfluss auf die Messwerte der Probanden haben. So könnte die in der hier diskutierten Arbeit gefundene intraindividuelle Varianz zumindest zum Teil auf unterschiedliche Lymphozyten-Subgruppen Anteile in den einzelnen Proben zurückgeführt werden.

Einen weiteren Erklärungsansatz zur Variabilität der Messergebnisse einer Person zwischen verschiedenen Experimenten lieferte die u.a. von Huang et al. (2005), MacPhail et al. (2003), Olive und Banáth (2004) angesprochene und im Rahmen der Foci-Analyse bereits diskutierte γ H2A.X-Expression apoptotischer Zellen. Es ist gut denkbar, dass in den unterschiedlichen Proben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht

wurden, verschieden große Anteile (früh-)apoptotischer Zellen vorlagen. Besonders früh-apoptotische Zellen exprimieren verstärkt γ H2A.X (MacPhail et al., 2003), sind aber unter Umständen im FACS nur anhand spezifischer Apoptosemarker, wie z.B. der Caspase3-Aktivierung zu erkennen. Da in der vorliegenden Arbeit keine spezifische Apoptose-Differenzierung vorgenommen wurde, könnte das jeweilige Ausmaß früh-apoptotischer Zellen zu der Variabilität der Messergebnisse eines Probanden beigetragen haben.

Insgesamt gelang die Differenzierung der einzelnen Probanden hinsichtlich ihrer individuellen γ H2A.X-Expression gut, obwohl für die vorliegende Studie eine größere Reproduzierbarkeit der Messwerte wünschenswert wäre.

Die beobachteten Differenzen zwischen den Probanden lagen hingegen in einem Bereich, wie er in vergleichbaren Untersuchungen erzielt wurde (vgl. u.a. Andrievski und Wilkins, 2009, Hamasaki et al., 2007, Ismail et al., 2007, Rothkamm und Horn, 2009). Hamasaki et al. (2007) interpretieren diese Variabilität dahingehend, dass individuelle Unterschiede, wie sie im flusszytometrischen γ H2A.X-Nachweis gezeigt werden können, individuelle Unterschiede der DNA-Reparaturfähigkeit darstellen.

Mittels des Variationskoeffizienten ist weiterhin ein Vergleich mit den Ergebnissen der mikroskopischen Auszählung möglich, bei welcher für γ H2A.X nach 6 Gy Bestrahlungsdosis ein Variationskoeffizient von 11.6% nachgewiesen werden konnte. Das flusszytometrische Verfahren erwies sich demnach im Vergleich zu der etablierten Methode der mikroskopischen Erfassung als mindestens vergleichbar differenzierungsfähig. Eine Charakterisierung der Probanden hinsichtlich ihrer zellulären Strahlensensibilität ist somit generell mittels flusszytometrischen Nachweises des γ H2A.X -Signals möglich.

5.5.2. Vergleich der Ergebnisse des γ H2A.X- und pATM-Foci-Nachweises mit den Ergebnissen des flusszytometrischen γ H2A.X-Nachweises

Wie in **Abbildung 32** und **Abbildung 33** dargestellt, wurde der Zusammenhang der flusszytometrischen Ergebnisse mit denen der mikroskopischen Foci-Zählung nach einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy untersucht. Die berechnete Lineare Regression ergab für den Foci-Nachweis mittels γ H2A.X mit einem $r^2 = .22$ einen eher schwachen Zu-

sammenhang. Für die Anzahl an pATM-Foci ergab sich ein Zusammenhang mit dem flusszytometrischen γ H2A.X-Nachweis von $r^2 = .27$. Die Ergebnisse der Flusszytometrie korrelieren somit in etwas höherem Maße mit den Ergebnissen des Foci-Nachweises mittels pATM als mittels γ H2A.X, dennoch ließen sich in beiden Fällen eher geringe Zusammenhänge nachweisen. Zu vergleichbaren Ergebnissen bezüglich γ H2A.X im mikroskopischen und zytometrischen Nachweis kommen auch Mognato et al. (2009) im Rahmen ihrer Untersuchung an Lymphozyten. Als mögliche Erklärung führen die Autoren zum einen die geringere Sensitivität flusszytometrischer Nachweisverfahren im Vergleich zur Auszählung der Foci an. Zum anderen vermuten sie, dass phosphoryliertes H2A.X noch nach Abbau bzw. Zerfall seiner fokalen Akkumulation am Doppelstrangbruch als γ H2A.X-Signal in der Zelle bestehen bleibt und auf diese Weise die Fluoreszenzintensität erhöhen könnte. Der genaue Mechanismus ist in diesem Fall allerdings noch nicht geklärt. Hamasaki et al. (2007) klassifizierten die kultivierten Lymphozyten verschiedener Spender entsprechend ihrer γ H2A.X-Intensität nach 2 Gy Bestrahlungsdosis und 6 Stunden Reparaturzeit in drei Gruppen. Auf diese Weise konnten Unterschiede zwischen geringer, mittlerer und hoher Strahlenempfindlichkeit der Probanden dargestellt werden. Im anschließenden Vergleich der Resultate mit dem mikroskopischen γ H2A.X-Nachweis konnten sie eine signifikante Assoziation der Ergebnisse beider Verfahren nachweisen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Dosis von 6 Gy Schwierigkeiten im mikroskopischen γ H2A.X-Nachweis den Zusammenhang beeinträchtigt haben könnten. In der flusszytometrischen Methode dürfte eine Dosiserhöhung von 2 Gy auf 6 Gy zu keiner Verschlechterung der Messergebnisse führen, da Sensitivität und somit Leistungsfähigkeit hier vor allem im unteren Dosisbereich eingeschränkt sind (vgl. u.a. Luther et al., 2008, Mognato et al., 2009).

Zur Klärung, inwieweit Schwierigkeiten im Nachweis der γ H2A.X-Foci eine Ursache für den vergleichsweise geringen Zusammenhang darstellen, wurde ebenfalls für pATM-Foci der Zusammenhang mit den flusszytometrisch erfassten γ H2A.X-Signalen überprüft. Es ließ sich in diesem Fall eine geringfügig höhere, aber absolut gesehen immer noch niedrige Korrelation der Werte nachweisen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit von Luther et al. (2008) berichteten Befunden. Im Rahmen ihrer Arbeit erzeugten diese bei verschiedenen Zelllinien DNA-Schäden durch chemische Noxen in

unterschiedlicher Konzentration. Nachfolgend verglichen sie jeweils die Anzahl an γ H2A.X-Foci mit der Höhe des flusszytometrisch bestimmten γ H2A.X-Signals. Sie fanden, dass der Foci-Nachweis bei einer höheren Anzahl an Doppelstrangbrüchen eine Sättigung aufweist und der flusszytometrische Nachweis des γ H2A.X-Signals in diesen Fällen die bessere Methode zur Erfassung von DNA-Schäden darstellt. Demnach würde das flusszytometrische Verfahren auch in der vorliegenden Arbeit für die relativ hohe Bestrahlungsdosis von 6 Gy DNA-Schädigungen zuverlässiger erfassen.

Die eigenen Untersuchungen bestätigen somit die in der Literatur dokumentierten Ergebnisse, nach denen eine Quantifizierung des γ H2A.X-Signals mittels Flusszytometrie möglich ist. Es wird aber auch deutlich, dass das Potential dieses Verfahrens noch optimiert werden kann und muss. Wie dargestellt, wurde pATM im Foci-Nachweis gegenüber γ H2A.X als geeigneter identifiziert. Daher gilt es zu überprüfen, ob pATM auch im flusszytometrischen Nachweis den geeigneteren Parameter zur Erfassung strahleninduzierter Doppelstrangbrüche darstellt. Seit mehreren Jahren sind auch für die Flusszytometrie geeignete Antikörper gegen pATM kommerziell verfügbar und wurden in verschiedenen Studien eingesetzt. So kommen u.a. Huang et al. (2005), Kurose et al. (2005), Tanaka et al. (2006), Tanaka et al. (2007b) zu dem Ergebnis, dass diese Antikörper ein gutes Instrument darstellen, um eine ATM-Aktivierung immunzytometrisch nachzuweisen. Der Nachweis erfolgte bisher allerdings überwiegend an verschiedenen Tumorzelllinien und zusätzlich nicht für strahleninduzierte DNA-Schäden. In weiteren Studien müsste daher die Eignung des zytometrisch erfassten pATM-Signals zur Prädiktion der individuellen Strahlenempfindlichkeit an Lymphozyten überprüft werden.

5.6. Ausblick

Die Prädiktion der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit könnte die Anwendung radiotherapeutischer Verfahren wesentlich erleichtern, da durch Anpassung der Dosis an die individuelle Strahlenempfindlichkeit, Dosis und somit Nebenwirkungsrisiko bei strahlenempfindlicheren Patienten gesenkt, hingegen für den überwiegenden Anteil der Patienten Dosis und damit auch Tumorkontrolle erhöht werden können.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass das reparatur-assoziierte Protein pATM dem etablierten γ H2A.X in der Abbildung der zellulären Strahlenempfindlichkeit an Lymphozyten überlegen ist. Eine Überprüfung dieser Ergebnisse in anderen Zellentitäten ist allerdings notwendig. Auch ist eine Verifizierung der Ergebnisse an einer größeren Patientenzahl wünschenswert. Des Weiteren steht die Validierung der Befunde an klinischen Korrelaten zellulärer Strahlenempfindlichkeit noch aus. So müsste, wie beispielsweise für den G_0/G_1 -Assay erfolgt, der Zusammenhang der Anzahl residueller pATM-Foci nach in vitro Bestrahlung mit den klinischen Nebenwirkungen nach Radiotherapie überprüft werden.

Des Weiteren konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass prinzipiell der flusszytometrische Nachweis residueller DNA-Schäden mittels γ H2A.X-spezifischer Antikörper möglich ist. Inwieweit auch für diese Methode die Verwendung von pATM-spezifischen Antikörpern die Darstellung individueller Unterschiede der zellulären Strahlenempfindlichkeit verbessert, müsste in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der optimale Einsatz der Strahlentherapie ist im Rahmen der Behandlung von Tumoren von hoher Relevanz. Die unvermeidbare Bestrahlung des Normalgewebes und das damit verbundenen Risiko strahleninduzierter Nebenwirkungen limitieren allerdings ihren Einsatz. Die klinische Strahlenempfindlichkeit und somit die Toleranz des Normalgewebes ist eng mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit assoziiert, wobei letztere an in vitro bestrahlten Zellen bestimmt werden kann. Ein wichtiges Ziel ist daher, die Strahlenempfindlichkeit von Personen zuverlässig prädiktiv zu erfassen, um eine Individualisierung der Therapie vornehmen zu können.

Residuelle Foci, d.h. Akkumulationen reparatur-assoziiertes Proteins am residuellen Doppelstrangbruch, gelten neben letalen Chromosomenaberrationen als Surrogatmarker der zellulären Strahlenempfindlichkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Lymphozyten von 21 gesunden Probanden untersucht (1.) ob ein Nachweis residueller Foci mittels Antikörper gegen pATM besser gelingt als mittels der etablierten Antikörper gegen γ H2A.X; (2.) ob der Foci-Nachweis den etablierten G₀/G₁-Assay ersetzen oder ergänzen kann und (3.) ob sich Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit auch durch den flusszytometrischen Nachweis von γ H2A.X darstellen lassen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl γ H2A.X als auch pATM geeignet sind, die Zunahme von DNA-Schädigungen mit steigender Bestrahlungsdosis abzubilden. Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass im Vergleich zu γ H2A.X sowohl spontan als auch nach Bestrahlung weniger pATM-Foci nachgewiesen werden konnten.

Auch konnte, anders als für γ H2A.X, kein Zusammenhang zwischen Anzahl spontaner pATM-Foci und Alter der Probanden gefunden werden.

Spontane γ H2A.X-Foci stellen im Gegensatz zu entsprechenden pATM-Akkumulationen nicht nur häufigere Ereignisse dar, sondern bilden auch physiologisch andere Prozesse ab. So wurden zusätzliche, nicht reparaturassoziierte γ H2A.X-Signale u.a. mit frühen Apoptosestadien in Verbindung gebracht. Schlussfolgernd wurde festgehalten, dass pATM-Foci spezifischer residuelle Doppelstrangbrüche abbilden und daher entsprechend besser zur Einschätzung der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit geeignet sind.

Es zeigte sich weiterhin kein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen von Foci-Nachweis und G₀/G₁-Assay bezüglich der individuellen Strahlenempfindlichkeit. Die

fehlende Korrelation wurde auf methodische Einschränkungen des G₀/G₁-Assays, wie u.a. die Notwendigkeit, Lymphozyten mittels PHA zum Eintritt in den Zellzyklus zu stimulieren, zurückgeführt. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels Nachweis residueller Foci wahrscheinlich präziser gelingt als unter Verwendung des G₀/G₁-Assays.

In einem methodischen Teil der Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine Quantifizierung des γ H2A.X-Signals mittels Flusszytometrie generell möglich ist. Das Verfahren erwies sich als gut geeignet, die dosisabhängige Zunahme des γ H2A.X-Signals sowie Unterschiede zwischen den Probanden abzubilden. Es ist dem bereits etablierten mikroskopischen Ansatz in dieser Hinsicht äquivalent, bietet allerdings darüber hinaus deutlich bessere Automatisierungsmöglichkeiten, was eine Implementation dieser Methode in die klinische Routine prinzipiell unterstützt. Doch muss der flusszytometrische Nachweis methodisch weiter optimiert und insbesondere die Eignung des pATM-Signals im Rahmen dieser Methode überprüft werden.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

53BP1	tumor suppressor p53-binding protein 1
ATM	reparatur-assoziierte Proteinkinase, ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia and RAD3 related
BD	Becton Dickinson
BSA	bovines Serum Albumin
CCD-Kamera	charge-coupled device-Kamera
CD	cluster of differentiation
CI	confidence intervall, Konfidenzintervall
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CV	coefficient of variation, Variationskoeffizient
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-phenylindole
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependant protein kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FITC-A	Area, Integral der mittels FACS gemessenenen Intensität des FITC-Signals
FSC	forward scatter
FSC-A	Area, Integral der mittels FACS gemessenenen Intensität des FSC-Signals
G	Gravitationskonstante
G ₀ /G ₁ /S-/G ₂ /M-Phase	Zellzyklusphasen (Ruhephase/ Präsynthesephase/ Synthesephase/ Postsynthesephase/ Mitosephase)
Gy	Gray
H2A.X	reparatur-assoziiertes Histon-Protein
HR	homologe Rekombination
KCl	Kaliumchlorid
LET	linearer Energietransfer

MRE11	Komponente des MRN-Komplexes, besitzt Nukleaseaktivität
MRN-Komplex	Proteinkomplex aus MRE11, RAD50 und NBS1
MW	Mittelwert
n. s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NBS1	Komponente des MRN-Komplexes, verantwortlich für das Nijmegen-breakage-Syndrom
NHEJ	nicht homologes End-joining
p	probability, Signifikanzniveau
pATM	phosphoryliertes ATM
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphate buffered saline
PHA	Phytohaemagglutinin A
r	Korrelationskoeffizient
r ²	Regressionskoeffizient
RAD50	Komponente des MRN-Komplexes
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute
SD	Standardabweichung
SE	standard error, Standard(mess)fehler
SSC	sideways scatter
SSC-A	Area, Integral der mittels FACS gemessenen Intensität des SSC-Signals
γH2A.X	phosphoryliertes H2A.X

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Anderson, L., Henderson, C. & Adachi, Y. 2001. Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol Cell Biol*, 21, 1719-29.
2. Andrievski, A. & Wilkins, R. C. 2009. The response of gamma-H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures. *Int J Radiat Biol*, 85, 369-76.
3. Azria, D. & Magne, N. 2005. Targeted therapies and radiotherapy in colorectal cancer. *Bull Cancer*, 92, 37-43.
4. Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421, 499-506.
5. Banáth, J. P., Klokov, D., Macphail, S. H., Banuelos, C. A. & Olive, P. L. 2010. Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer*, 10, 4.
6. Banáth, J. P. & Olive, P. L. 2003. Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Res*, 63, 4347-50.
7. Barber, J. B. P., Burrill, W., Spreadborough, A. R., Levine, E., Warren, C., Kiltie, A. E., Roberts, S. A. & Scott, D. 2000. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol*, 55, 179-86.
8. Barber, P. R., Locke, R. J., Pierce, G. P., Rothkamm, K. & Vojnovic, B. 2007. Gamma-H2AX foci counting: image processing and control software for high-content screening. *Proc SPIE*, 6441, 64411M1-M10.
9. Bartkova, J., Bakkenist, C. J., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N. E., Sehested, M., Lukas, J., Kastan, M. B. & Bartek, J. 2005. ATM activation in normal human tissues and testicular cancer. *Cell Cycle*, 4, 838-45.
10. Beels, L., Bacher, K., De Wolf, D., Werbrouck, J. & Thierens, H. 2009. Gamma-H2AX foci as a biomarker for patient X-ray exposure in pediatric cardiac catheterization: are we underestimating radiation risks? *Circulation*, 120, 1903-9.
11. Beels, L., Werbrouck, J. & Thierens, H. 2010. Dose response and repair kinetics of gamma-H2AX foci induced by in vitro irradiation of whole blood and T-lymphocytes with X- and gamma-radiation. *Int J Radiat Biol*, 86, 760-8.
12. Begg, A. C. 2006. Can the Severity of Normal Tissue Damage after Radiation Therapy Be Predicted? *PLoS Med*, 3, 1713-14.
13. Bentzen, S. M. 1997. Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing. *Radiother Oncol*, 43, 121-31.
14. Bonner, W. M., Redon, C. E., Dickey, J. S., Nakamura, A. J., Sedelnikova, O. A.,

- Solier, S. & Pommier, Y. 2008. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*, 8, 957-67.
15. Borgmann, K., Haerberle, D., Doerk, T., Busjahn, A., Stephan, G. & Dikomey, E. 2007. Genetic determination of chromosomal radiosensitivities in G0- and G2-phase human lymphocytes. *Radiother Oncol*, 83, 196-202.
16. Borgmann, K., Hoeller, U., Nowack, S., Bernhard, M., Roper, B., Brackrock, S., Petersen, C., Szymczak, S., Ziegler, A., Feyer, P., Alberti, W. & Dikomey, E. 2008. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 71, 256-64.
17. Borgmann, K., Röper, B., El-Awady, R. A., Brackrock, S., Bigalke, M., Dörk, T., Alberti, W., Dikomey, E. & Dahm-Daphi, J. 2002. Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother Oncol*, 64, 141-52.
18. Bourton, E. C., Plowman, P. N., Smith, D., Arlett, C. F. & Parris, C. N. 2011. Prolonged expression of the gamma-H2AX DNA repair biomarker correlates with excess acute and chronic toxicity from radiotherapy treatment. *Int J Cancer*, 129, 2928-34.
19. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D. J. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 276, 42462-7.
20. Burnet, N. G., Wurm, R., Nyman, J. & Peacock, J. H. 1996. Normal tissue radiosensitivity -- How important is it? *Clin Oncol*, 8, 25-34.
21. Carloni, M., Meschini, R., Ovidi, L. & Palitti, F. 2001. PHA-induced cell proliferation rescues human peripheral blood lymphocytes from X-ray-induced apoptosis. *Mutagenesis*, 16, 115-20.
22. Chua, M. L., Somaiah, N., A'hern, R., Davies, S., Gothard, L., Yarnold, J. & Rothkamm, K. 2011. Residual DNA and chromosomal damage in ex vivo irradiated blood lymphocytes correlated with late normal tissue response to breast radiotherapy. *Radiother Oncol*, 99, 362-6.
23. Cleaver, J. E. 2011. GammaH2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair "all that glitters is not gold!". *Photochem Photobiol*, 87, 1230-9.
24. De Feraudy, S., Revet, I., Bezrookove, V., Feeney, L. & Cleaver, J. E. 2010. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 6870-5.
25. Dikomey, E., Borgmann, K., Brammer, I. & Kasten-Pisula, U. 2003. Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology*, 193, 125-35.
26. Dikomey, E., Brammer, I., Johansen, J., Bentzen, S. M. & Overgaard, J. 2000. Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *Int J*

- Radiat Oncol Biol Phys*, 46, 481-90.
27. Edwards, A. A., Lloyd, D. C. & Purrott, R. J. 1979. Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. *Radiat Environ Biophys*, 16, 89-100.
28. Fernet, M. & Hall, J. 2004. Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. *DNA Repair*, 3, 1237-43.
29. Fernet, M. & Hall, J. 2008. Predictive markers for normal tissue reactions: Fantasy or reality? *Cancer Radiother*, 12, 614-18.
30. Fürweger, C., Hajek, M., Vana, N., Kodym, R. & Okayasu, R. 2007. Cellular signal transduction events as a function of linear energy transfer (LET). *Radiat Prot Dosimetry*, 126, 418-22.
31. Goedecke, W. & Pfeiffer, P. 2008. DNA-Reparatur und Mutagenese. In: Ganten, D. & Ruckpaul, K. (eds.) *Grundlagen der Molekularen Medizin*. 3 ed. Heidelberg: Springer.
32. Golfier, S., Jost, G., Pietsch, H., Lengsfeld, P., Eckardt-Schupp, F., Schmid, E. & Voth, M. 2009. Dicentric chromosomes and gamma-H2AX foci formation in lymphocytes of human blood samples exposed to a CT scanner: a direct comparison of dose response relationships. *Radiat Prot Dosimetry*, 134, 55-61.
33. Grudzinski, 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, 14205-10.
34. Guirouilh-Barbat, J., Redon, C. & Pommier, Y. 2008. Transcription-coupled DNA double-strand breaks are mediated via the nucleotide excision repair and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Mol Biol Cell*, 19, 3969-81.
35. Hamasaki, K., Imai, K., Nakachi, K., Takahashi, N., Kodama, Y. & Kusunoki, Y. 2007. Short-term culture and gammaH2AX flow cytometry determine differences in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 48, 38-47.
36. Helt, C. E., Cliby, W. A., Keng, P. C., Bambara, R. A. & O'reilly, M. A. 2005. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem*, 280, 1186-92.
37. Hoeller, U., Borgmann, K., Bonacker, M., Kuhlmeier, A., Bajrovic, A., Jung, H., Alberti, W. & Dikomey, E. 2003. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol*, 69, 137-44.
38. Horn, S., Barnard, S. & Rothkamm, K. 2011. Gamma-H2AX-based dose estimation for whole and partial body radiation exposure. *PLoS One*, 6, 1-8.
39. Huang, X., Halicka, H. D., Traganos, F., Tanaka, T., Kurose, A. & Darzynkiewicz, Z. 2005. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif*, 38, 223-43.
40. Ismail, I. H., Nystrom, S., Nygren, J. & Hammarsten, O. 2005. Activation of ataxia telangiectasia mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely

- with the number of DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, 280, 4649-55.
41. Ismail, I. H., Wadhra, T. I. & Hammarsten, O. 2007. An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acids Res*, 35, e36.
42. Jones, L. A., Scott, D., Cowan, R. & Roberts, S. A. 1995. Abnormal Radiosensitivity of Lymphocytes from Breast Cancer Patients with Excessive Normal Tissue Damage after Radiotherapy: Chromosome Aberrations after Low Dose-rate Irradiation. *Int J Radiat Biol*, 67, 519-28.
43. Keller, U., Kuechler, A., Liehr, T., Müller, E., Grabenbauer, G., Sauer, R. & Distel, L. 2004. Impact of various parameters in detecting chromosomal aberrations by FISH to describe radiosensitivity. *Strahlenther Onkol*, 180, 289-96.
44. Kurose, A., Tanaka, T., Huang, X., Halicka, D., Traganos, F., Dai, W. & Darzynkiewicz, Z. 2005. Assessment of ATM phosphorylation on Ser-1981 induced by DNA Topoisomerase I and II inhibitors in relation to Ser-139-Histone H2AX phosphorylation, cell cycle phase, and apoptosis. *Cytometry A*, 68, 1-9.
45. Kurose, A., Tanaka, T., Huang, X., Traganos, F., Dai, W. & Darzynkiewicz, Z. 2006. Effects of hydroxyurea and aphidicolin on phosphorylation of ataxia telangiectasia mutated on Ser 1981 and histone H2AX on Ser 139 in relation to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cytometry A*, 69, 212-21.
46. Lavaf, A., Fu, S., Peters, S., Hou, Y.-N., Rosenstein, B. S. & Kao, J. 2009. ATM phosphorylation kinetics as a biological reporter of cellular radiosensitivity. *J Cancer Mol*, 5, 9-14.
47. Leonard, A., Rueff, J., Gerber, G. B. & Leonard, E. D. 2005. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. *Radiat Prot Dosimetry*, 115, 448-54.
48. Löbrich, M., Rief, N., Kühne, M., Heckmann, M., Fleckenstein, J., Rube, C. & Uder, M. 2005. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8984-89.
49. Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A. A., Barton, O. & Jeggo, P. A. 2010. γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, 9, 662-9.
50. Luther, E., Henriksen, M. & Holden, E. 2008. *DNA Damage by pH2AX and pATM Foci Counting Compared to Evaluating Total Nuclear Fluorescence* [Online]. Cambridge, MA: CompuCyte Corporation. Available: http://www.compucyte.com/CompuCyte_Materials/ISAC_Posters_2008/DNA_damage_by_pH2AX_and_pATM_foci_counting.pdf.
51. Mackay, R. I. & Hendry, J. H. 1999. The modelled benefits of individualizing radiotherapy patients' dose using cellular radiosensitivity assays with inherent variability. *Radiother Oncol*, 50, 67-75.
52. Macphail, S. H., Banáth, J. P., Yu, Y., Chu, E. & Olive, P. L. 2003. Cell cycle-

- dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. *Radiat Res*, 159, 759-67.
53. Mahrhofer, H., Bürger, S., Oppitz, U., Flentje, M. & Djuzenova, C. S. 2006. Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 64, 573-80.
54. Markova, E., Torudd, J. & Belyaev, I. 2011. Long time persistence of residual 53BP1/gamma-H2AX foci in human lymphocytes in relationship to apoptosis, chromatin condensation and biological dosimetry. *Int J Radiat Biol*, 87, 736-45.
55. Mognato, M., Girardi, C., Fabris, S. & Celotti, L. 2009. DNA repair in modeled microgravity: double strand break rejoining activity in human lymphocytes irradiated with gamma-rays. *Mutat Res*, 663, 32-9.
56. Olive, P. L. & Banáth, J. P. 2004. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58, 331-5.
57. Oppitz, U., Baier, K., Wulf, J., Schakowski, R. & Flentje, M. 2001. The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *Int J Radiat Biol*, 77, 105-10.
58. Peacock, J., Ashton, A., Bliss, J., Bush, C., Eady, J., Jackson, C., Owen, R., Regan, J. & Yarnold, J. 2000. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol*, 55, 173-8.
59. Pfeiffer, P., Goedecke, W. & Obe, G. 2000. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 15, 289-302.
60. Pilch, D. R., Sedelnikova, O. A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A. & Bonner, W. M. 2003. Characteristics of γ -H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol*, 81, 123-9.
61. Pomp, J., Wike, J. L., Ouwerkerk, I. J., Hoogstraten, C., Davelaar, J., Schrier, P. I., Leer, J. W., Thames, H. D. & Brock, W. A. 1996. Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays. *Radiother Oncol*, 40, 121-5.
62. Pope, I. A., Barber, P. R., Horn, S., Ainsbury, E., Rothkamm, K. & Vojnovic, B. 2011. A portable microfluidic fluorescence spectrometer device for γ -H2AX-based biological dosimetry. *Radiat Meas*, 46, 907-11.
63. Powell, S. & Mcmillan, T. J. 1990. DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiother Oncol*, 19, 95-108.
64. Puck, T. T. & Marcus, P. I. 1956. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med*, 103, 653-66.
65. Redon, C. E., Nakamura, A. J., Gouliava, K., Rahman, A., Blakely, W. F. & Bonner, W. M. 2010. The use of gamma-H2AX as a biodosimeter for total-body radiation exposure in non-human primates. *PLoS One*, 5, e15544.
66. Redon, C. E., Nakamura, A. J., Martin, O. A., Parekh, P. R., Weyemi, U. S. & Bonner, W. M. 2011. Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging*, 3, 168-74.

67. Revet, I., Feeney, L., Bruguera, S., Wilson, W., Dong, T. K., Oh, D. H., Dankort, D. & Cleaver, J. E. 2011. Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 8663-7.
68. Rieger, K. E., Hong, W. J., Tusher, V. G., Tang, J., Tibshirani, R. & Chu, G. 2004. Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6635-40.
69. Robert Koch-Institut 2006. Gesundheit in Deutschland. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2 ed. Berlin: Oktoberdruck AG.
70. Roch-Lefèvre, S., Mandina, T., Voisin, P., Gaetan, G., Mesa, J. E. G., Valente, M., Bonnesoeur, P., Garcia, O., Voisin, P. & Roy, L. 2010. Quantification of gamma-H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiat Res*, 174, 185-94.
71. 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, 5858-68.
72. Rothkamm, K. & Horn, S. 2009. Gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita*, 45, 265-71.
73. Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L. H. & Löbrich, M. 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol*, 23, 5706-15.
74. 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, 5057-62.
75. Rube, C. E., Fricke, A., Widmann, T. A., Fürst, T., Madry, H., Pfreundschuh, M. & Rube, C. 2011. Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. *PLoS One*, 6, e17487.
76. 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*, 14, 6546-55.
77. Sauer, R. 2011. Strahlenbiologie. In: Kauffmann, G. W., Sauer, R. & Weber, W. (eds.) *Radiologie. Bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Strahlenschutz*. 4 ed. München: Urban & Fischer.
78. Sauer, R. & Fietkau, R. 2011. Strahlentherapie. In: Kauffmann, G. W., Sauer, R. & Weber, W. (eds.) *Radiologie. Bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Strahlenschutz*. 4 ed. München: Urban & Fischer.
79. Sedelnikova, O. A., Rogakou, E. P., Panyutin, I. G. & Bonner, W. M. 2002. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res*, 158, 486-92.
80. Smart, D. J., Ahmedi, K. P., Harvey, J. S. & Lynch, A. M. 2011. Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay. *Mutat Res*, 715, 25-31.
81. 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, 2390-6.
82. Suzuki, K., Okada, H., Yamauchi, M., Oka, Y., Kodama, S. & Watanabe, M. 2006. Qualitative and quantitative analysis of phosphorylated ATM foci induced by low-dose ionizing radiation. *Radiat Res*, 165, 499-504.
83. Svensson, J. P., Stalpers, L. J., Esveldt-Van Lange, R. E., Franken, N. A., Haveman, J., Klein, B., Turesson, I., Vrieling, H. & Giphart-Gassler, M. 2006. Analysis of gene expression using gene sets discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity. *PLoS Med*, 3, e422.
84. Tanaka, T., Halicka, H. D., Huang, X., Traganos, F. & Darzynkiewicz, Z. 2006. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle*, 5, 1940-5.
85. Tanaka, T., Huang, X., Halicka, H. D., Zhao, H., Traganos, F., Albino, A. P., Dai, W. & Darzynkiewicz, Z. 2007a. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A*, 71, 648-61.
86. Tanaka, T., Kajstura, M., Halicka, H. D., Traganos, F. & Darzynkiewicz, Z. 2007b. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation are strongly amplified during mitogenic stimulation of lymphocytes. *Cell Prolif*, 40, 1-13.
87. Tucker, S. L., Turesson, I. & Thames, H. D. 1992. Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer*, 28A, 1783-91.
88. Wang, H., Wang, M., Bocker, W. & Iliakis, G. 2005. Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J Cell Physiol*, 202, 492-502.
89. Ward, I. M. & Chen, J. 2001. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, 276, 47759-62.
90. Weber, K.-J. & Wenz, R. 2006. Strahlenbiologische Grundlagen. In: Wannemacher, M., Debus, J. & Wenz, F. (eds.) *Strahlentherapie*. Berlin: Springer.
91. Wilson, P. F., Nham, P. B., Urbin, S. S., Hinz, J. M., Jones, I. M. & Thompson, L. H. 2010. Inter-individual variation in DNA double-strand break repair in human fibroblasts before and after exposure to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res*, 683, 91-7.
92. Withers, H. R. 1986. Predicting late normal tissue responses. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 12, 693-8.
93. Yamauchi, M., Oka, Y., Yamamoto, M., Niimura, K., Uchida, M., Kodama, S., Watanabe, M., Sekine, I., Yamashita, S. & Suzuki, K. 2008. Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. *DNA Repair*, 7, 405-17.
94. Zwicker, F., Swartman, B., Sterzing, F., Major, G., Weber, K.-J., Huber, P. E.,

Thieke, C., Debus, J. & Herfarth, K. 2011. Biological in-vivo measurement of dose distribution in patients' lymphocytes by gamma-H2AX immunofluorescence staining: 3D conformal- vs. step-and-shoot IMRT of the prostate gland. *Radiat Oncol*, 6, 62.

9. ANHANG

9.1 Versuchsprotokolle

9.2 Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci aller Probanden nach
0 Gy, 4 Gy und 6 Gy

9.3 Danksagung

9.4. Lebenslauf

9.5 Eidesstattliche Versicherung

9.1. Versuchsprotokolle

9.1.1. *Lymphozyten-Isolierung und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis (γ H2A.X, pATM)*

1. NaCl (0.9%), Ficoll-Paque, RPMI-Medium (inklusive 10% FCS und 5% L-Glutamin) vorwärmen (20-37 °C)
 2. Ficoll-Paque in 5 Spitzboden-Röhrchen (mit 15 ml Volumen) schichten (4 ml je Röhrchen)
 3. ca. 10 ml Blut (2 heparinisierte Röhrchen) entnehmen
 4. Blut in zwei 15 ml-Spitzboden-Röhrchen pipettieren (je 5 ml) und mit je 5 ml NaCl auffüllen
(Verhältnis Blut:NaCl = 1:1)
 5. Invertieren zur Durchmischung von Blut und NaCl
 6. jeweils 4 ml NaCl-Blut auf das vorgelegte Ficoll-Paque schichten,
(maximal Verhältnis Blut:Ficoll-Paque = 1:1)
 7. Zentrifugieren (**I**): 437 G, Raumtemperatur, 30 min. ohne Bremse
(Gesamtdauer ca. 40 min.)
 8. Lymphozyten (befinden sich in der weißen Schicht zwischen Überstand und Ficoll-Paque) vorsichtig mit einer 3 ml-Transfer-Pipette entnehmen
 - a. kein Ficoll-Paque mit entnehmen (etwas Überstand kann dabei sein)
 - b. in neue 15 ml-Spitzboden-Röhrchen überführen
 - c. maximal 2 ml Lymphozyten in jedes Spitzboden-Röhrchen pipettieren (ca. 2-3 Röhrchen benötigt)
 9. Zugabe von angewärmtem RPMI-Medium auf ein Gesamtvolumen von ca. 12 ml pro 15 ml-Spitzboden-Röhrchen (Vermischung mittels Vortex)
 10. Zentrifugieren (**II**): 235 G, Raumtemperatur, 10 min. mit Bremse
 11. Überstand absaugen, Pellets in ca. 12 ml RPMI-Medium resuspendieren (Vermischung mittels Vortex)
 12. Zentrifugieren (**III**): 235 G, Raumtemperatur, 10 min. mit Bremse
 13. Überstand absaugen, Pellets in ca. 4 ml RPMI-Medium resuspendieren (Vermischung mittels Vortex)
 14. Suspension auf 4 Zellkulturflaschen (je 2 ml Volumen) aufteilen
 15. Bestrahlung bei Raumtemperatur mit einer Dosisrate von 2 Gy/min
 16. Reparaturzeit: 24 Stunden im Brutschrank (bei 37°C, 5% CO₂)
-

17. Lymphozyten inklusive Medium aus Kulturflaschen in 15 ml-Spitzboden-Röhrchen überführen
18. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min. mit Bremse
19. Überstand absaugen (unter Steril-Bench)
20. 4 ml PBS zufügen und Pellet darin resuspendieren (Vermischung mittels Vortex)
21. mittels Zellzähler Bestimmung der Lymphozytenanzahl in den Röhrchen
22. **wenn Zellanzahl < 5x10⁵ pro ml:**
 - a. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min. mit Bremse
 - b. Überstand absaugen bis Zielkonzentration: 10⁵ Zellen/200 µl Probe
23. **wenn Zellanzahl > 5x10⁵ pro ml:**
 - c. Probe mit PBS auffüllen bis Zielkonzentration: 10⁵ Zellen/200 µl Probe
24. Objektträger, Lochplättchen und Trichter für Cytospin-Zentrifuge vorbereiten
25. 200 µl Zellsuspension in jeden Trichter einfüllen
26. Aufzentrifugieren der Proben mittels Cytospin-Zentrifuge
27. Fixierung der Zellen:
 - a. Objektträger mit aufgebrauchten Proben für 15 min bei Raumtemperatur in Fixierungslösung unter Abzug stehen lassen

Fixierungslösung	100 ml
PBS	94.6 ml
37%iges Formaldehyd	5.4 ml

- b. Waschen: drei Mal für jeweils 10 min. in PBS auf Agitator

28. Permeabilisierung für 5 min. bei Raumtemperatur auf Agitator

Permeabilisierungslösung	100 ml
PBS	99.9 ml
Triton X 100 (0.1%)	0.1 ml

29. Waschen: ein Mal für 10 min. in PBS-T auf Agitator

PBS-T	100 ml
PBS	99.9 ml
Tween 20 (0,1%)	0.1 ml

30. Blockierung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf Agitator

Blockierungslösung	150 ml
PBS	135 ml
BSA (10%ig)	15 g

31. Inkubationskammer vorbereiten und Objektträger einlegen

32. **1. Antikörper:** jeweils 50 µl der Antikörper-Lösung auf jeden Objektträger geben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur in dunkler Inkubationskammer stehen lassen

Waschlösung I (WL I)	100 ml
PBS	99.5 ml
BSA (1 %ig)	1 g
Tween 20 (0.5%ig)	0.5 ml

1. Antikörper in WL I	100 µl
WL I	98 µl
Antikörper pATM in WL I (1:100)	1 µl
Antikörper γH2A.X in WL I (1:100)	1 µl

33. Objektträger nach Ablauf der 2 Stunden mit Inkubationskammer über Nacht in den Kühlschrank stellen (Kühlung: 4°C)

34. **Nächster Tag:** Waschen: drei Mal für jeweils 10 min. in Waschlösung I auf Agitator

35. Inkubationskammer vorbereiten und Objektträger einlegen

36. **2. Antikörper:** jeweils 50 µl der Antikörper-Lösung auf jeden Objektträger geben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in dunkler Inkubationskammer stehen lassen

2. Antikörper in WL I	100 µl
WL I	98.8 µl
Antikörper Fluorescein in WL I (1:100)	1 µl
Antikörper Alexa in WL I (1:600)	0.17µl

37. Waschen: drei Mal für jeweils 10 min. in Waschlösung II auf Agitator

Waschlösung II (WL II)	100 ml
PBS	99.5 ml
Tween 20 (0.5%ig)	0.5 ml

38. Objektträger abtropfen lassen

39. jeweils 1 Tropfen (entspricht ca. 15 µl) Vectashield-Mounting Medium mit DAPI (1 µl DAPI auf 1000 µl Vectashield) auf die Objektträger tropfen
40. Objektträger mit Deckgläschen abdecken und mittels Nagellack versiegeln
41. mikroskopische Auswertung der Präparate

9.1.2. Lymphozytenaufbereitung und G₀/G₁-Assay

1. Entnahme von Blut in heparinisierte Röhrchen
2. Anlegen von Parallelkulturen in 25 cm²-Zellkulturflaschen (jeweils 1 ml Vollblut je Probe bzw. Zellkulturkulturflasche)
3. Verdünnung des Blutes mit RPMI-Medium im Verhältnis 1:10 (1 ml Vollblut + 9 ml RPMI-Medium inklusive 10% FCS und 5% L-Glutamin)
4. Bestrahlung bei Raumtemperatur mit einer Dosisrate von 2 Gy/min
5. Stimulierung der Lymphozyten: Zugabe von 250 µl Phytohaemagglutinin A je Zellkulturflasche
6. Reparatur: Blutkulturen bei 37°C für 72 Stunden im Brutschrank (5% CO₂) inkubiert
7. Fixierung in der Metaphase: Zugabe von 10 µl Colcemid je Zellkulturflasche
8. Inkubation für 4-6 Stunden bei 37°C im Brutschrank (5% CO₂)
9. Überführung der Proben in 15 ml-Spitzboden-Röhrchen
10. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min.
11. Überstand bis auf ca. 1ml über dem Sediment mit Wasserstrahlpumpe absaugen
12. Waschen der Proben: tropfenweise jeweils 10 ml PBS auf Probe (auf Agitator) geben
13. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min.
14. Überstand absaugen
15. Hypotonische Behandlung: tropfenweise jeweils 10 ml Kaliumchlorid (0.56%ig) auf Probe (auf Agitator) geben
16. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min.
17. Überstand bis auf ca. 1.5 ml absaugen
18. Bestimmung der Zellzahl mittels Zellzählers, Einstellung einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml je Probe
19. Fixierung der Zellen: Carnoy's Fixativ (Methanol, Chloroform, Essigsäure im Verhältnis 6:3:1) tropfenweise zu den Proben geben (Vermischung mittels Vortex)
20. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min.
21. Überstand absaugen
22. Fixierungsschritt wiederholen (Überstand jetzt bis auf ca. 2 ml über Sediment absaugen)
23. Herstellung der Chromosomenpräparate:
Objektträger mit dünnem Wasserfilm (*Aqua destillata*) vollständig überziehen.
24. Aufschütteln der Zellen in den Suspensionen (Vortex)

25. Aufpipettieren von 30 µl Zellsuspension je Probe bzw. Objektträger (in zwei Schüben auf beide Hälften des Objektträgers)
26. Objektträger 20 min. an der Luft trocknen lassen
27. Anfärbung der Chromosomen: Objektträger für 8-10 min. in Küvettenständer mit 6 ml Giemsa-Farbstoff (2%ig in 150 ml PBS) einstellen
28. überschüssigen Giemsa-Farbstoff durch mehrere kurze Waschschriffe (mittels *Aqua destillata*) entfernen
29. Objektträger unter Abzug vollständig trocknen lassen
30. Auf jeden Objektträger einen Tropfen Kunstharz (Entellan) geben und Präparat mit Deckgläschen versehen
31. mikroskopische Auswertung der Präparate

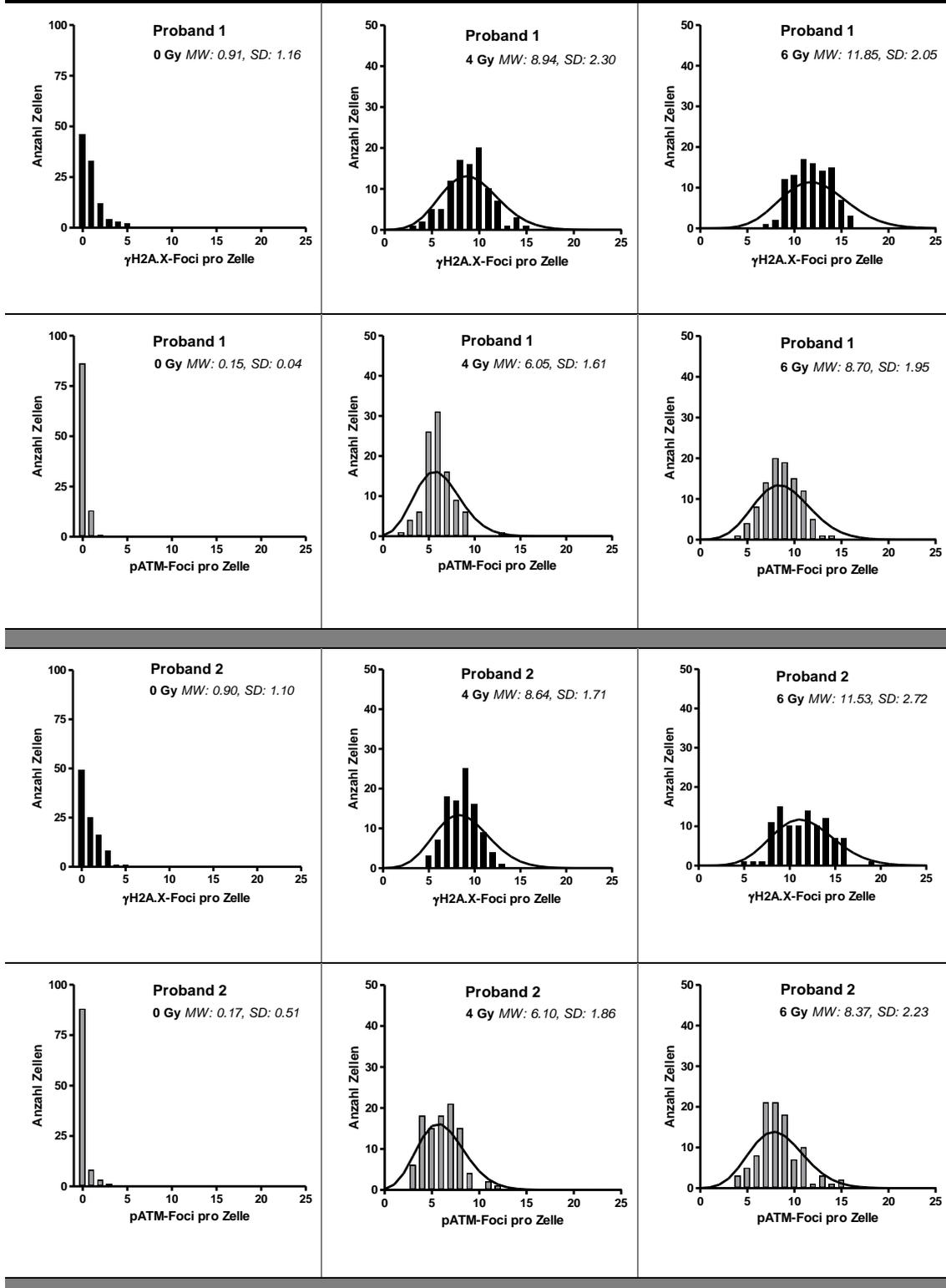
9.1.3. Flusszytometrischer Nachweis mittels FACS-KIT (γ H2A.X)

1. Isolierung und Bestrahlung und Reparaturzeit der Lymphozyten wie unter 9.1.1 beschrieben)
-
2. Lymphozyten inklusive Medium aus Kulturflaschen in 15 ml-Spitzboden-Röhrchen überführen
 3. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min., mit Bremse
 4. Überstand absaugen
 5. 2 ml PBS zufügen und Pellet darin resuspendieren (Vermischung mittels Vortex)
 6. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min., mit Bremse
 7. Überstand absaugen und Resuspension des Pellets in Fixierungslösung (Bestandteil des FACS-Kits, Konzentrat, enthält 37% Formaldehyd mit 10-15% Methanol)
 8. Fixierung:
 - 500 µl Fixierungslösung (in Zielverdünnung) je Probe
 - Verdünnungsfaktor 1:16 → 31.25 µl Fixierungslösung (Konzentrat) + 468.75 µl *Aqua destillata*
 - Lösung zugeben und Proben für 20 min. auf Eis inkubieren
 9. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min., mit Bremse
 10. Überstand absaugen
 11. 1.5 ml PBS zufügen und Pellet darin resuspendieren (Vermischung mittels Vortex)
 12. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min., mit Bremse
 13. Überstand absaugen
 14. 1.5 ml PBS zufügen und Pellet darin resuspendieren (Vermischung mittels Vortex)

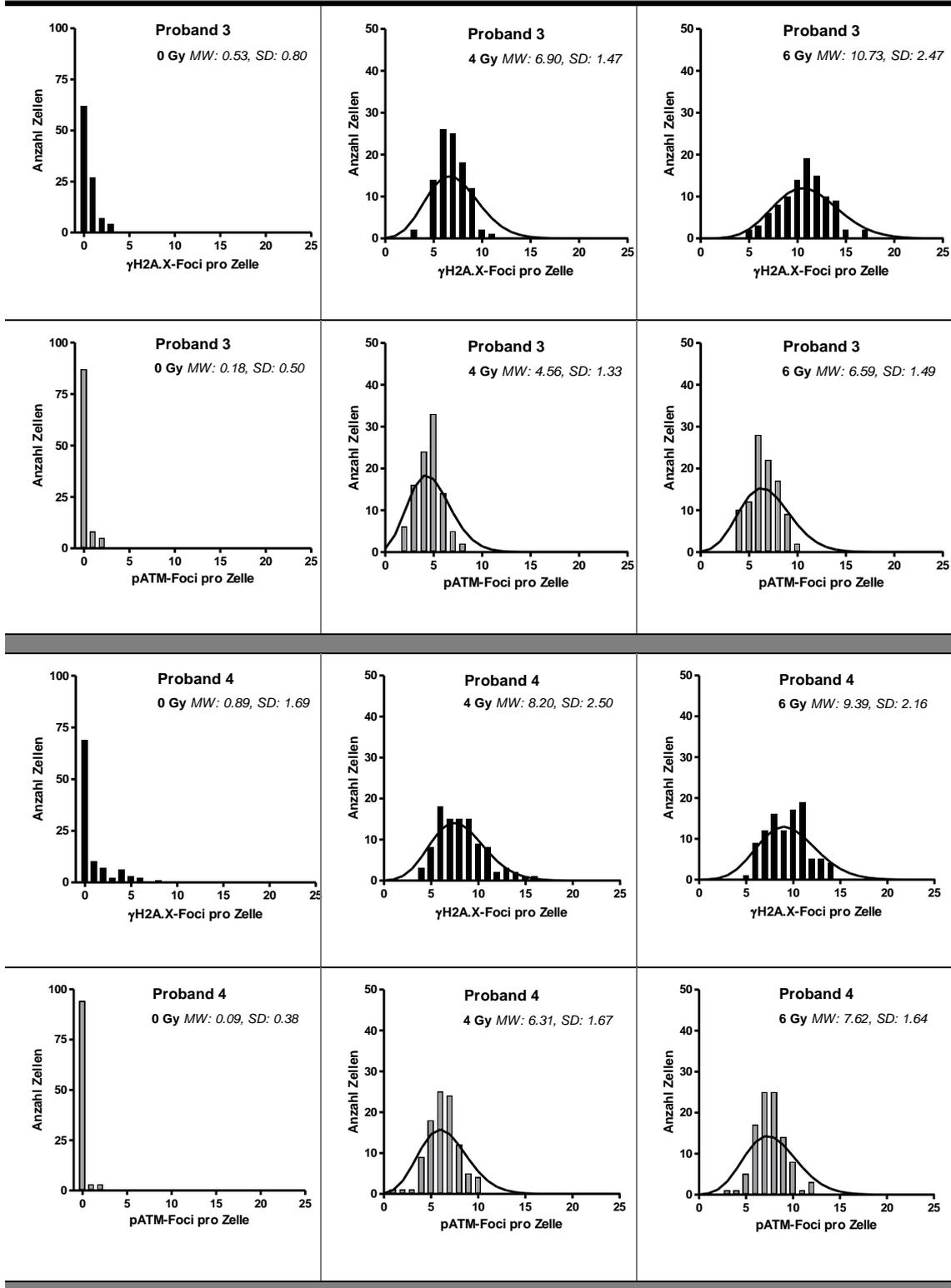
15. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min., mit Bremse
16. Überstand absaugen
17. Resuspendieren in Permeabilisierungslösung (Vermischung mittels Vortex)
 - 50 µl je Probe benötigt, 5000 µl ansetzen, 0.2% Triton X-100
 - 4990 µl PBS + 10 µl Triton X-100
18. Ohne zwischengeschalteten Waschschrift: Zufügen von 3.5 µl Antikörperlösung (Bestandteil des FACS-Kits) je Probe und Vermischung mittels Vortex
19. Inkubation der Proben für 20min. auf Eis
20. Zufügen von 100 µl Waschlösung je Probe (Vermischung mittels Vortex)
 - 100 µl je Probe benötigt, 5000 µl ansetzen, 0.1% Tween 20
 - 4995 µl PBS + 5 µl Tween 20
21. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min., mit Bremse
22. Überstand entfernen
23. erneut Zufügen von 100µl Waschlösung je Probe (Vermischung mittels Vortex)
24. Zentrifugieren: 280 G, Raumtemperatur, 5 min., mit Bremse
25. Überstand entfernen
26. Resuspendieren der Pellets in 0.5-1 ml PBS
27. Überführen der Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen
28. Flusszytometrische Messung des γ H2A.X-Signals

9.2. Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci aller Probanden nach 0 Gy, 4 Gy und 6 Gy

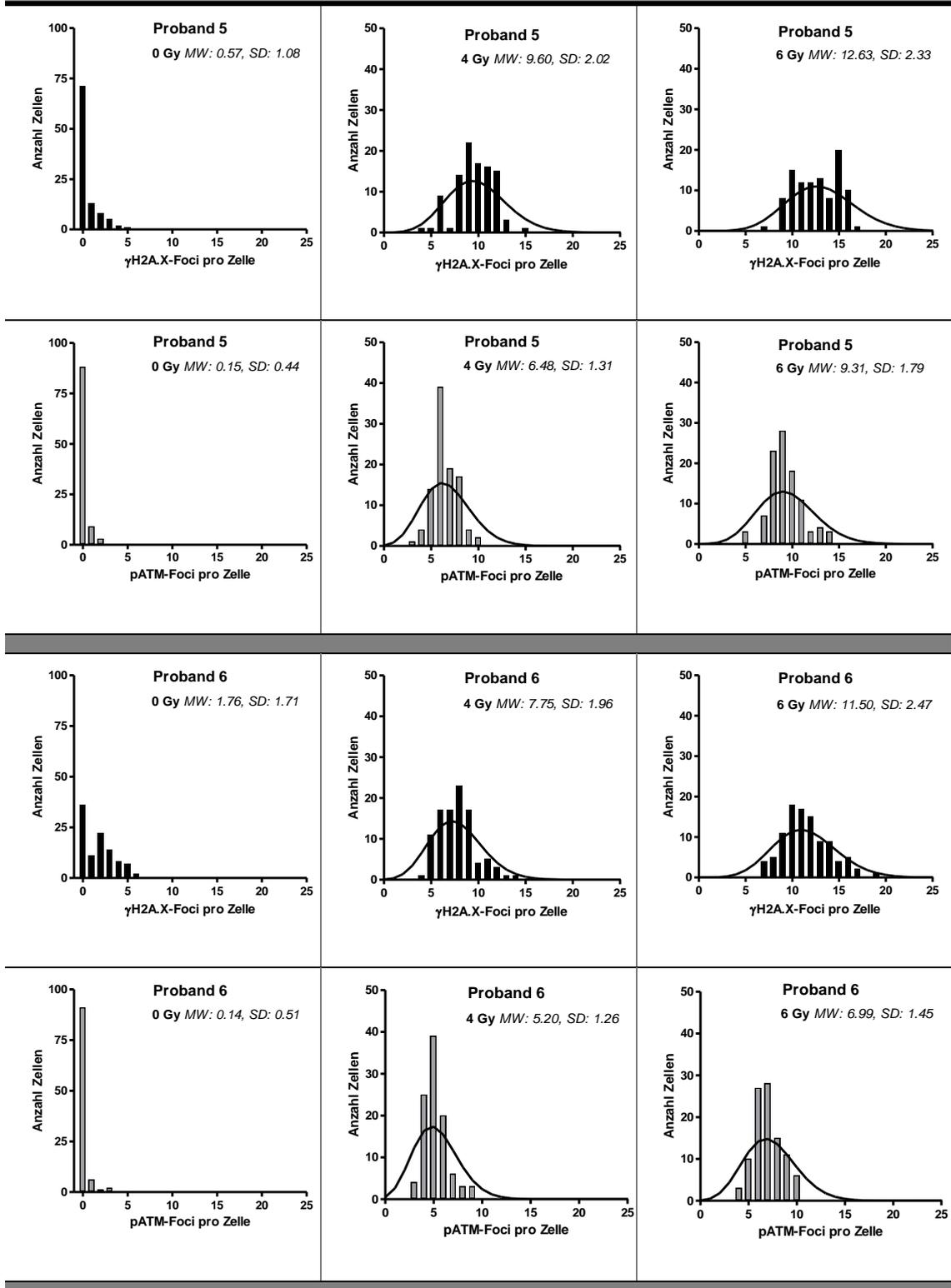
Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



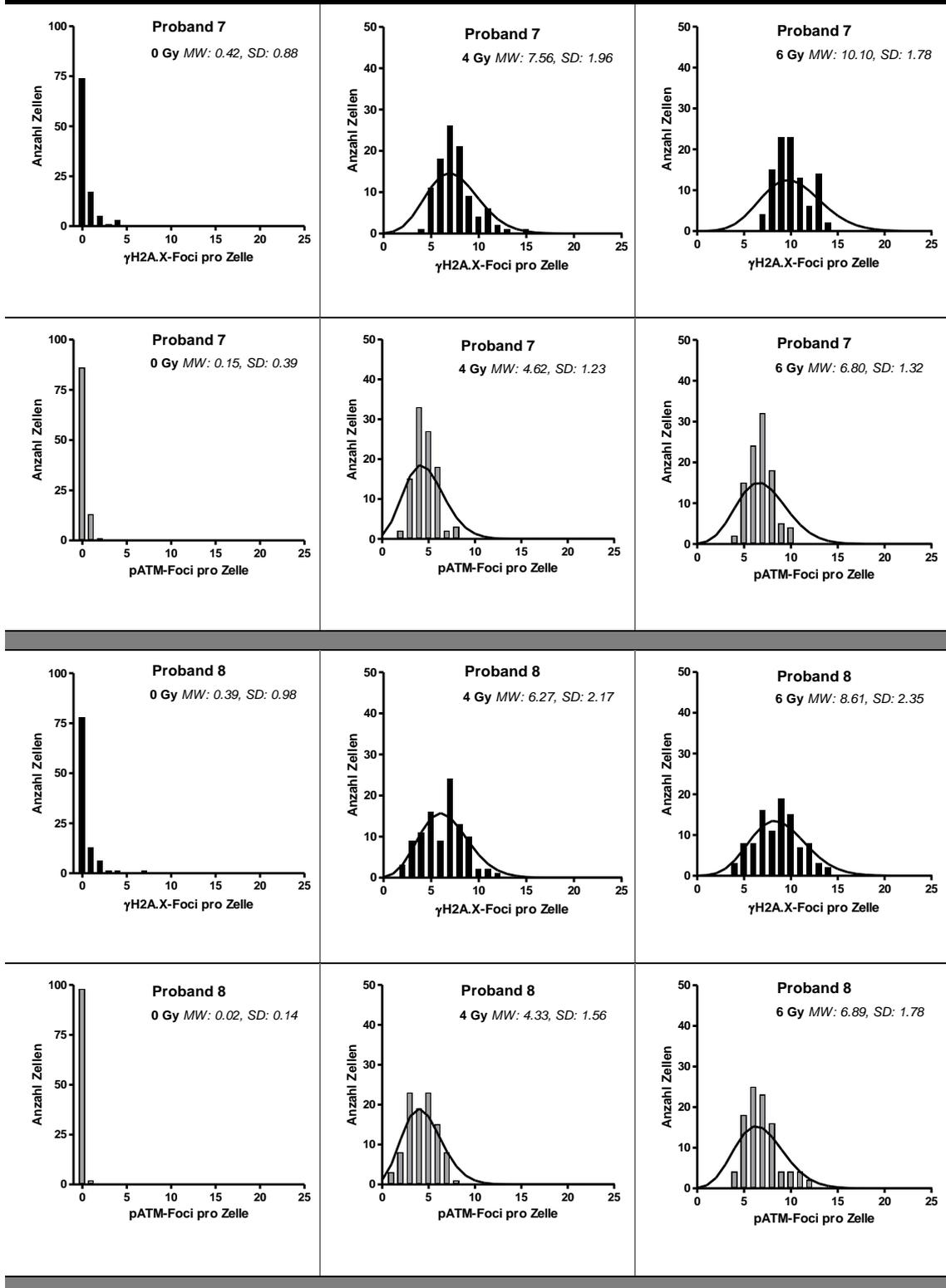
Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



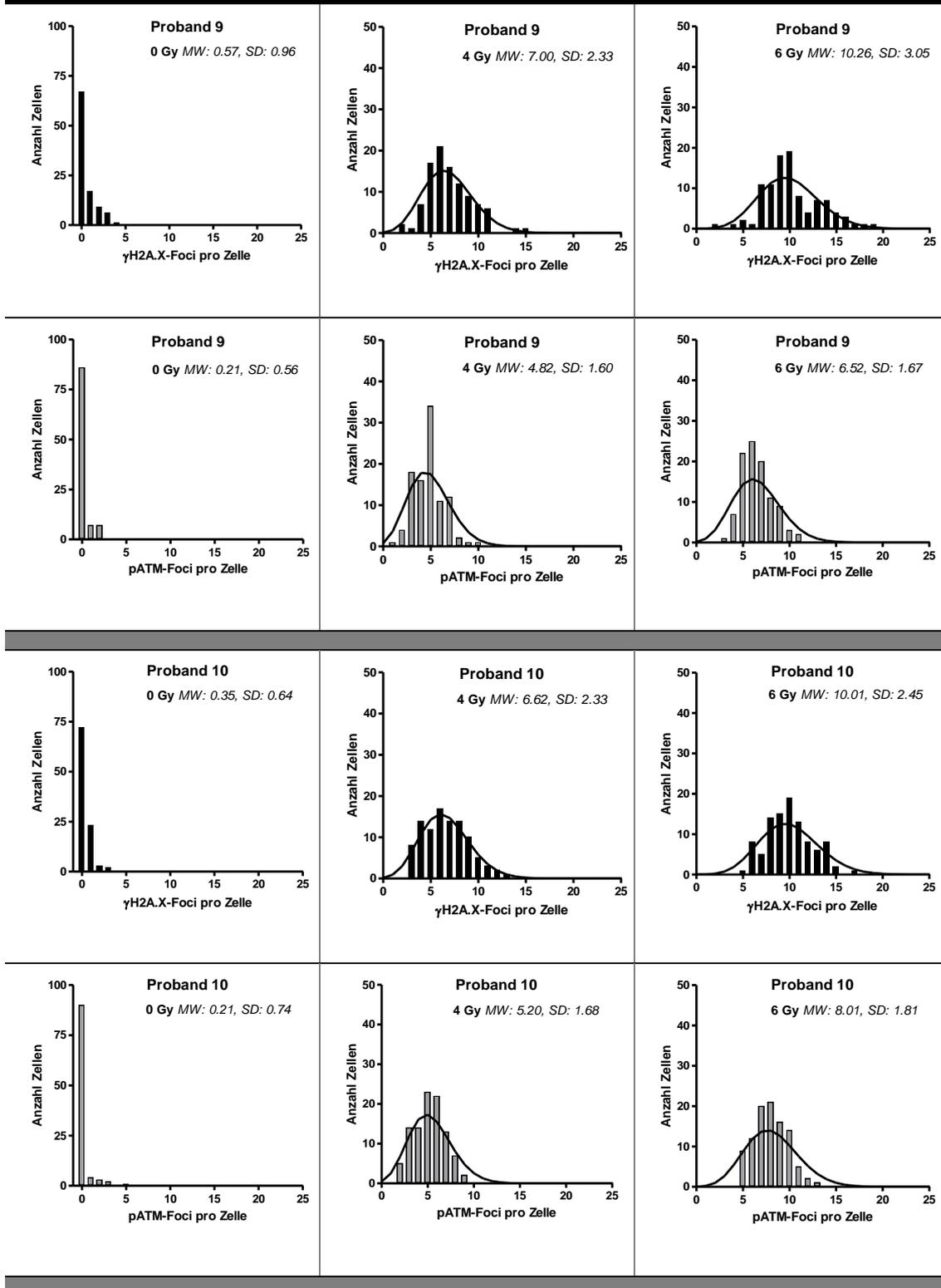
Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



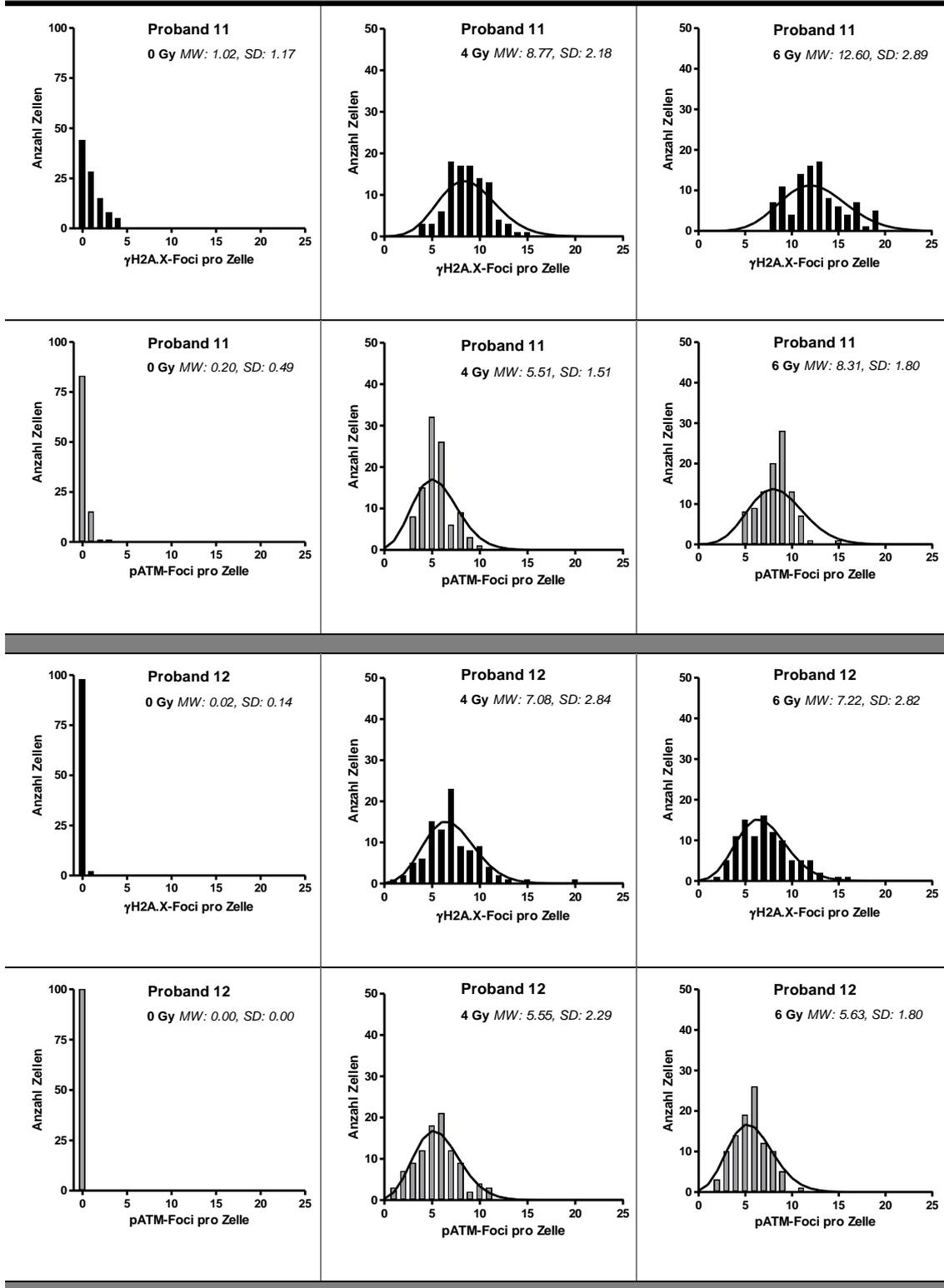
Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



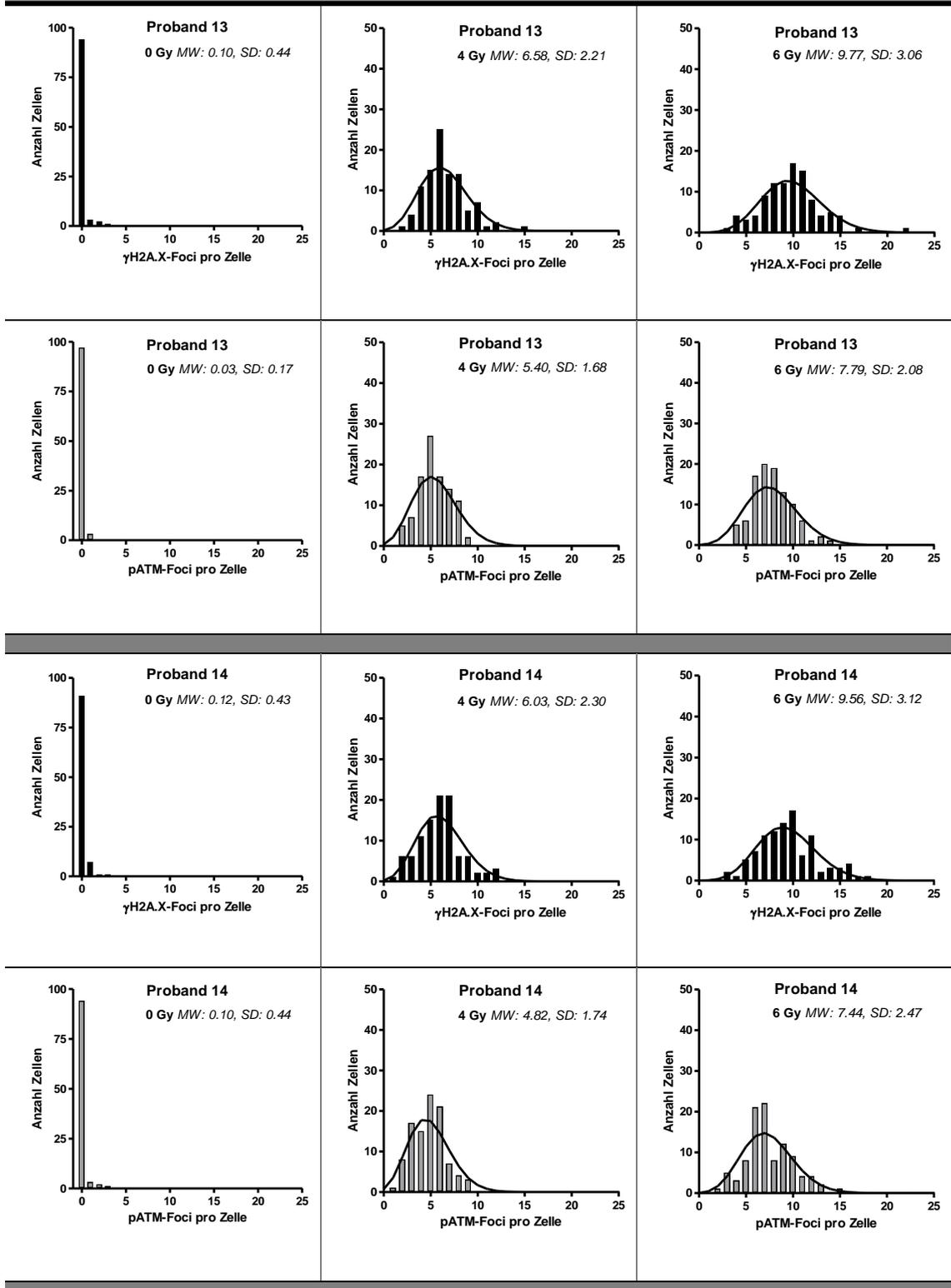
Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



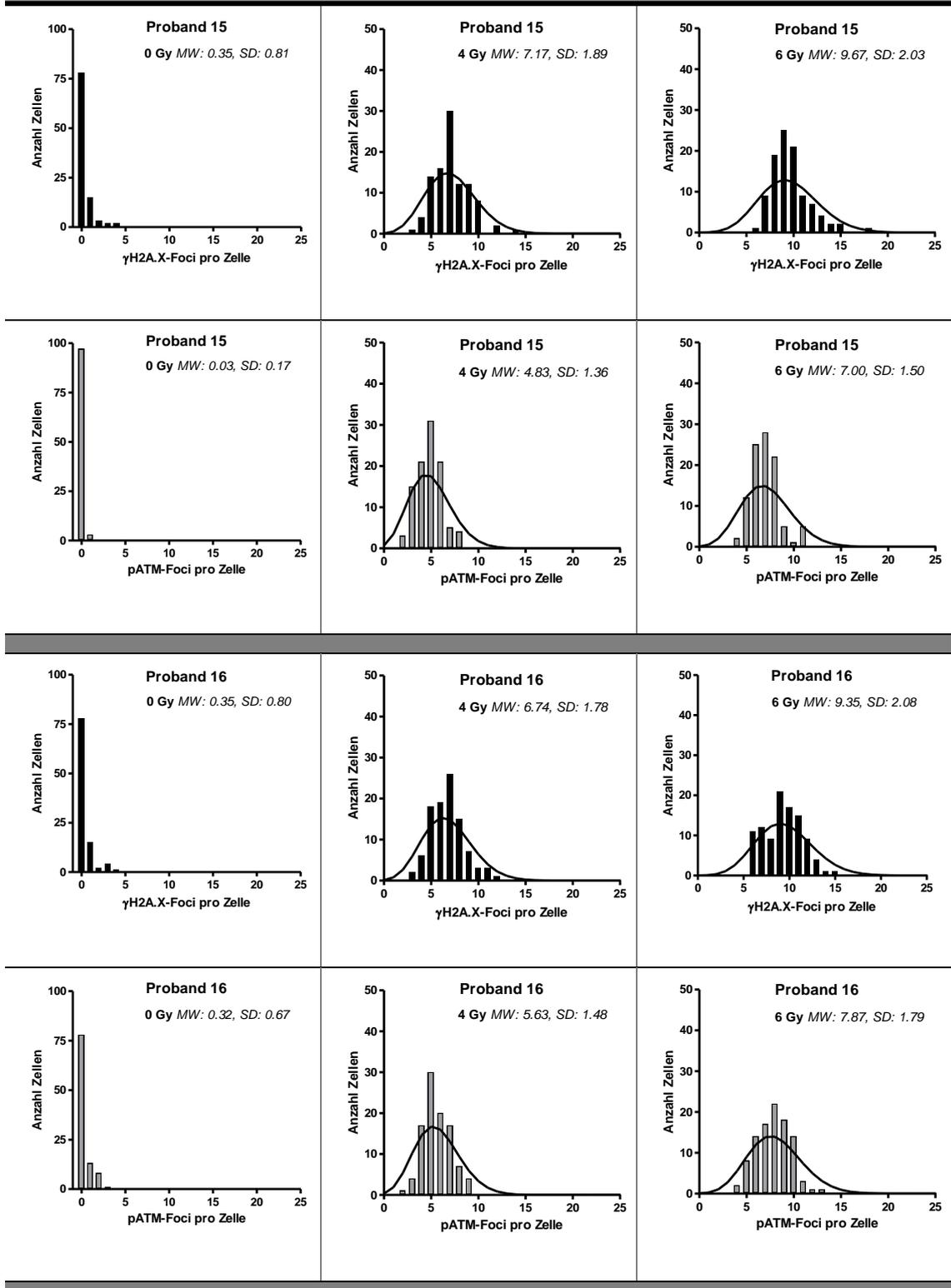
Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



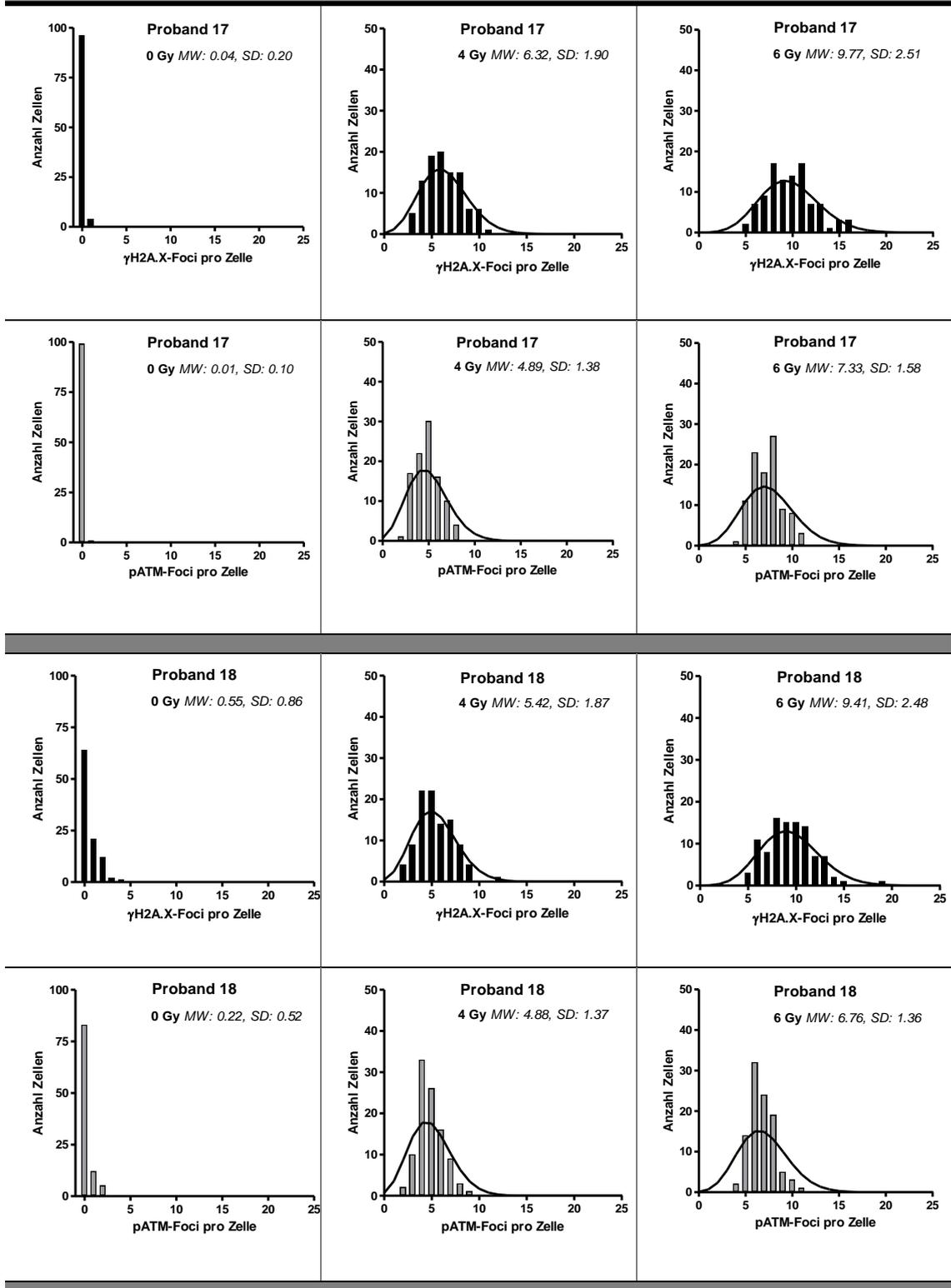
Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



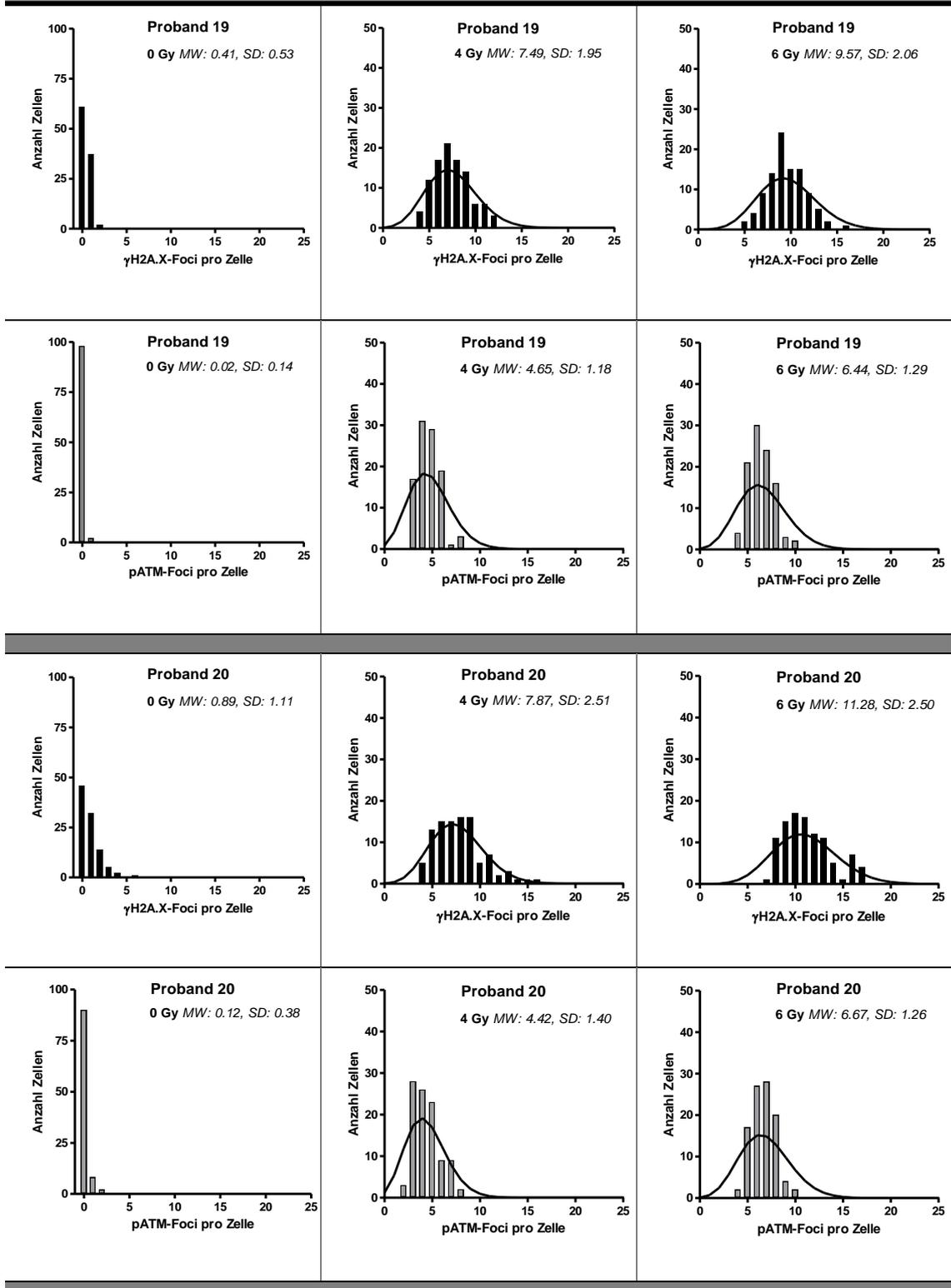
Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



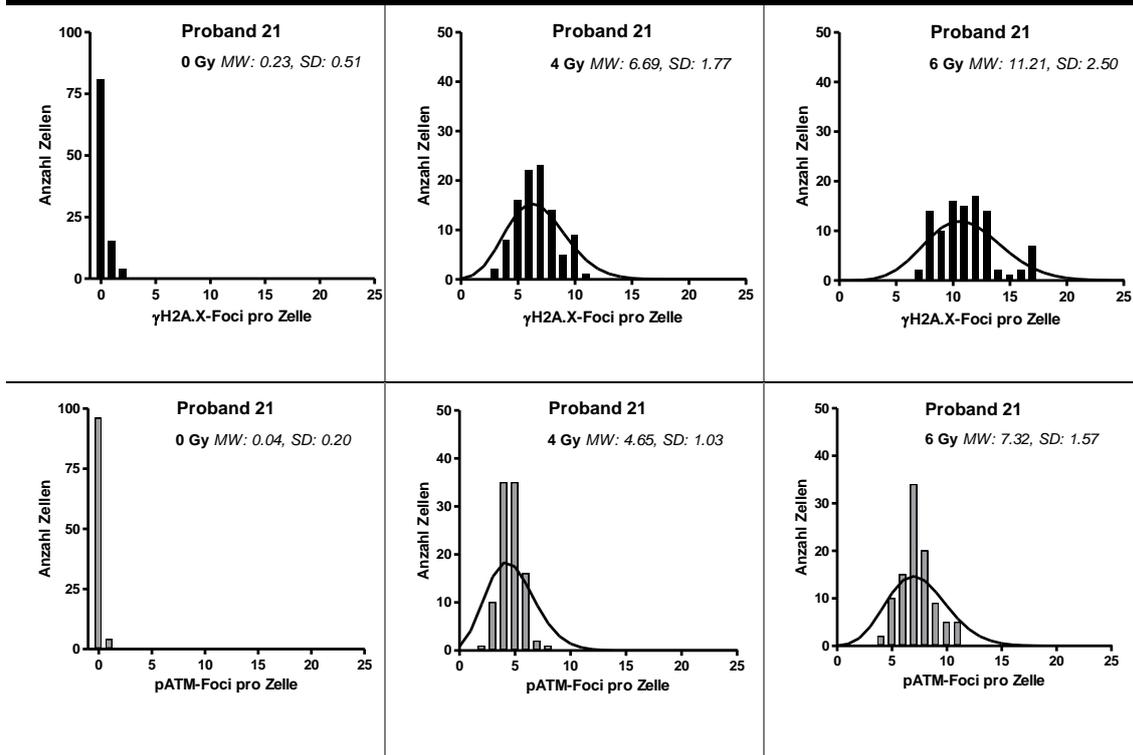
Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



Häufigkeitsverteilungen der γ H2A.X- und pATM-Foci



9.3. Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau PD Dr. Annette Raabe für die Überlassung des Dissertationsthemas, die engagierte Betreuung, ihren großen Einsatz und die umfassende Unterstützung bedanken.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Sebastian Reuther für die Unterstützung und Hilfestellung im Rahmen meiner Dissertation.

Bei Herrn Professor Dr. Ekkehard Dikomey möchte ich mich herzlich für die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken.

Ich danke auch Frau Maria Omniczynski und Frau Alexandra Zielinski für die gewissenhafte Einführung in die Laborarbeit und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Ich danke den Mitarbeitern des Labors für Strahlenbiologie und Experimentell Radioonkologie für ihre Freundlichkeit und ihre große Hilfsbereitschaft.

Liebe Nadia, ich habe mich sehr gefreut, dass wir all diese Zeit zusammen verbringen konnten und hoffe auf viele weitere gemeinsame Jahre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Holger Schulz. Lieber Holger, Du hast mir in so vielen schwierigen Situationen sehr geholfen. Ganz vielen Dank für alles.

Auch meinen Eltern, meiner Schwester und ihrem Ehemann Michael danke ich sehr herzlich für all die hilfreichen Korrekturvorschläge. Danke, dass Ihr Euch so viel Mühe gemacht habt, meine Arbeit so genau zu lesen und ich danke Euch für Euer Zuhören in jeder Lebenslage.

9.4. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

9.5. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: