

Einfluss von Kontrastmittel und der applizierten Röntgendosis auf die Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Saskia Grudzenski

aus Landau/Pfalz

Darmstadt 2009

D 17

Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

Koreferent: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 20.08.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2009

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Isaac Newton (1643-1727)

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	1
2 EINLEITUNG	5
2.1 STRAHLENBIOLOGISCHE GRUNDLAGEN.....	5
2.1.1 Strahlenphysikalische Grundlagen	5
2.1.1.1 Röntgenstrahlung.....	6
2.1.1.2 γ -Strahlung	7
2.1.2 Wechselwirkungen ionisierender Strahlung (IR) mit Materie.....	7
2.1.2.1 Photoeffekt, Comptoneffekt und Paarbildung	7
2.1.2.2 Linearer Energietransfer (LET) und Relative Biologische Wirksamkeit (RBW).....	8
2.1.2.3 Grenzflächeneffekte	9
2.1.3 Wechselwirkung IR mit der DNA	10
2.1.3.1 Locally multiply damaged sites (LMDS)	11
2.1.3.2 DNA-Einzelstrangbrüche (ESBs)	12
2.1.3.3 DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs)	13
2.2 CHARAKTERISIERUNG UND FUNKTION VON KONTRASTMITTELN (KM)	14
2.2.1 Physikalische Wirkung von KM während der Bestrahlung.....	14
2.2.2 Chemische Eigenschaften von KM.....	16
2.2.3 Klinische Nebenwirkungen von KM.....	16
2.2.4 Pharmakokinetik von KM.....	17
2.2.5 Auswirkungen von KM auf die DNA	19
2.3 SCHADENSANTWORT NACH DSBs IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN.....	20
2.3.1 Die zelluläre Erkennung von DSBs	20
2.3.2 Mechanismen zur Reparatur von DSBs	21
2.3.2.1 Nichthomologes Endjoining (NHEJ)	21
2.3.2.2 Homologe Rekombination (HR)	24
2.4 CHARAKTERISIERUNG VERWENDETER MAUSSTÄMME	25
2.4.1 SCID- und BALB/c-Mäuse.....	25
2.4.2 A-T-Mäuse.....	27
2.5 KREBSRISIKO IM NIEDRIGDOSISBEREICH	28
2.6 DNA-SCHÄDEN UND –REPARATUR IM ZUSAMMENHANG MIT ZELLALTERUNG	32

2.7	NACHWEISVERFAHREN VON DSBs	34
2.7.1	Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM)	34
2.7.2	Chromosomale Analysen	35
2.7.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	36
2.8	ZIELSETZUNG	37
2.8.1	Untersuchungen zur Auswirkung von Kontrastmittel auf die Entstehung und Reparatur von DSBs durch IR.....	37
2.8.2	DSB-Reparatur nach niedrigen Dosen	38
3	MATERIAL UND METHODEN	40
3.1	VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE	40
3.2	VERWENDETE CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN UND ANTIKÖRPER	41
3.2.1	Chemikalien	41
3.2.2	Lösungen.....	43
3.2.3	Antikörper.....	44
3.3	VERWENDETE ZELLEN	44
3.4	VERWENDETE MAUSSTÄMME UND MURINE ORGANE	45
3.4.1	Verwendete Mausstämme	45
3.4.1.1	A-T-Mäuse.....	45
3.4.1.2	SCID- und BALB/c-Mäuse	45
3.4.1.3	C57BL/6-Mäuse.....	46
3.4.2	Verwendete murine Organe.....	46
3.5	ZELLKULTUR VON FIBROBLASTEN	46
3.5.1	Kultivierung von Fibroblasten.....	46
3.5.2	Kryokonservierung von Fibroblasten.....	47
3.5.3	Auftauen von Fibroblasten	47
3.6	BESTRAHLUNG	47
3.6.1	Röntgenbestrahlung an der Röntgenröhre	47
3.6.2	Röntgenbestrahlung am Linearbeschleuniger	48
3.6.3	Röntgenbestrahlung am Computertomographen (CT)	48
3.6.4	γ -Bestrahlung an einer ¹³⁷ Cäsium (Cs)-Quelle	49
3.7	STUDIEN MITTELS IFM	49
3.7.1	Fixierung von humanen Fibroblasten für die IFM	49
3.7.2	Isolierung und Fixierung von humanen Blutlymphozyten für die IFM.....	49
3.7.3	Isolierung und Fixierung von murinen Blutlymphozyten für die IFM	50
3.7.4	Fixierung und Präparation von Gewebeschnitten für die IFM.....	51

3.7.5	IF-Färbung von humanen und murinen Zellen.....	51
3.7.6	Quantifizierung von Foci und Anfertigung von Bildaufnahmen.....	52
3.8	CHROMOSOMENSTUDIEN MIT <i>PREMATURE CHROMOSOME CONDENSATION</i> (PCC)	52
3.8.1	Präparation von G2-Chromosomen	52
3.8.2	Giemsa-Färbung.....	53
3.8.3	Auswertung der gefärbten Präparate	53
3.9	PULSFELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE)	53
3.9.1	Isolierung genomischer DNA für PFGE	53
3.9.2	Vorgang der PFGE	54
3.9.3	Gelfärbung und –dokumentation.....	54
3.10	KM-STUDIEN <i>IN VITRO</i>	54
3.10.1	<i>In vitro</i> -Experimente mit KM an humanen Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung.....	54
3.10.2	<i>In vitro</i> -Experimente mit KM an humanen Lymphozyten nach Röntgen- und ¹³⁷ Cs-γ-Strahlung.....	55
3.11	PATIENTENSTUDIEN	55
3.11.1	<i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Untersuchungen an Lymphozyten von CT-Patienten: Patientengruppe I	55
3.11.2	<i>In vivo</i> -Untersuchungen an Lymphozyten von CT-Patienten: Patientengruppe II	56
3.11.3	<i>In vitro</i> -Untersuchungen an Lymphozyten: Patientengruppe III.....	56
3.12	BEHANDLUNG HUMANER PRIMÄRER FIBROBLASTEN MIT H₂O₂	57
3.13	STATISTISCHE AUSWERTUNG UND GRAFISCHE DARSTELLUNG	57
4	ERGEBNISSE.....	58
4.1	NACHWEIS VON DSBs IN MURINEN LYMPHOZYTEN MITTELS IFM UND ANWENDUNG DER METHODE AUF KLINISCHE FRAGESTELLUNGEN	58
4.1.1	<i>In vivo</i> -Nachweis der Induktion und Reparatur von DSBs in murinen Lymphozyten verschiedener Mausstämmen nach Röntgenbestrahlung mittels γH2AX-IFM	59
4.1.2	<i>In vitro</i> -Experimente zum Einfluss von KM auf die Induktion und Reparatur von DSBs in humanen Lymphozyten nach Röntgen- und γ- Bestrahlung mittels γH2AX-IFM	62

4.1.3	<i>In vitro</i> -Experimente zum Einfluss von KM auf die Induktion und Reparatur von DSBs in humanen Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung mittels γ H2AX-IFM	67
4.1.4	Nachweis des KM-Effekts nach Röntgenbestrahlung an humanen Fibroblasten mittels PCC und PFGE	70
4.2	UNTERSUCHUNG DES KM-EFFEKTS <i>IN VIVO</i> AN HUMANEN LYMPHOZYTEN.....	72
4.2.1	<i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Nachweis der Induktion und Reparatur von DSBs in humanen Lymphozyten der Patientengruppe I mittels γ H2AX-IFM.....	73
4.2.2	Bildung der Dosisäquivalente von Patientengruppe I.....	79
4.2.3	Modifikation der Studie mit weiteren Patienten der Patientengruppe II.....	80
4.3	UNTERSUCHUNG VON FAKTOREN, DIE DAS REPARATURVERMÖGEN BEEINFLUSSEN	83
4.3.1	Unterscheidung der Patienten von Patientengruppe I nach verschiedenen Faktoren	83
4.3.2	Weitere Patientenstudie zur Klärung des Einflusses verschiedener Faktoren auf das DSB-Reparaturverhalten <i>in vitro</i> mit Patientengruppe III.....	87
4.4	ANWENDUNG EINES MAUSGEWEBEMODELLS ZUR UNTERSUCHUNG VON NIEDRIGDOSEN	91
4.4.1	<i>In vivo</i> -Nachweis von DSBs über γ H2AX in verschiedenen murinen Geweben nach Röntgenbestrahlung mittels IHC.....	92
4.4.2	<i>In vivo</i> -Nachweis von DSBs in verschiedenen murinen Geweben nach mehreren Röntgendosen mittels γ H2AX-IFM	95
4.4.3	Nachweis der Kolo-kalisation von γ H2AX und 53BP1 in verschiedenen murinen Geweben mittels IFM	97
4.4.4	<i>In vivo</i> -Nachweis von DSBs in verschiedenen murinen Geweben nach mehreren Röntgendosen mittels 53BP1-IFM	99
4.4.5	<i>In vitro</i> -Experimente zur DSB-Reparatur humaner Fibroblasten nach mehreren Röntgendosen mittels γ H2AX- und pATM-IFM.....	102
4.4.6	Behandlung humaner Fibroblasten mit H ₂ O ₂	104
5	DISKUSSION.....	109
5.1	NACHWEIS VON DSBs IN MURINEN LYMPHOZYTEN	109
5.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR AUSWIRKUNG VON KM AUF DIE ENTSTEHUNG VON DSBs NACH IR ...	113
5.2.1	<i>in vitro</i> -Untersuchung des KM-Effekts an humanen Lymphozyten nach Röntgen- und γ -Strahlung mittels γ H2AX-IFM	113

5.2.2	<i>In vitro</i> -Untersuchung des KM-Effekts an humanen Fibroblasten mittels γ H2AX- und 53BP1-IFM und alternativen Nachweismethoden.....	116
5.3	<i>IN VIVO</i>-UNTERSUCHUNG DES KM-EFFEKTS AN HUMANEN LYMPHOZYTEN	118
5.4	EINFLUSS VERSCHIEDENER FAKTOREN AUF DIE REPARATUR VON DSBs	124
5.5	<i>IN VIVO</i> UND <i>IN VITRO</i>-UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG NIEDRIGER DOSEN IR	128
5.5.1	<i>In vivo</i> -Untersuchung zur Wirkung niedriger Dosen IR	129
5.5.2	<i>In vitro</i> -Untersuchung zur Wirkung niedriger Dosen IR	132
5.5.3	Überlegungen zu Faktoren, welche die Schadensantwort nach niedrigen Dosen IR beeinflussen können.....	135
5.6	AUSBlick	137
6	LITERATURVERZEICHNIS	139
7	ANHANG	154
8	LEBENSlauf	166
9	PUBLIKATIONEN, AUSZEICHNUNGEN UND TAGUNGSBEITRÄGE.....	167
	DANKSAGUNG.....	169

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>
*g	Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Ampere
AR	<i>Adaptive Response</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar
c	Geschwindigkeit
cm	Zentimeter
Co	Cobalt
Cs	Cäsium
CT	Computertomographie
CTDI _{vol}	<i>volumetric CT dose indices</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DG	Deckgläschen
DLP	Dosis-Längen-Produkt
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PK _{Cs}	katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase
DSB(s)	DNA-Doppelstrangbruch/(-brüche)
E	Energie
ECF	<i>extracellular fluid</i>
EDTA (K)	Ethylendiamintetraacetat (mit Kalium)
em	elektromagnetisch
ESB(s)	DNA-Einzelstrangbruch/(-brüche)
FA	Formaldehyd

FAR	<i>fraction of radioactivity released</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
G0-Phase	Ruhephase des Zellzyklus
G1-Phase	erste <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus
G2-Phase	zweite <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus
GS	Ziegenserum (<i>goat serum</i>)
Gy	<i>Gray</i>
h	Stunde, Plancksches Wirkungsquantum
HE	Hounsfield-Einheit
HR	Homologe Rekombination
IF(M)	Immunfluoreszenz(-Mikroskopie)
IR	<i>ionizing radiation</i>
IRIF	<i>ionizing radiation induced foci</i>
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
KM	Kontrastmittel
l	Liter
LCI	<i>life cell imaging</i>
LET	linearer Energietransfer
LMDS	<i>locally multiply damaged site</i>
LNT	<i>linear no threshold</i>
m	milli/Meter
M	molar
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MeV	Megaelektronenvolt
MilliQ	doppelt destilliertes Wasser
min	Minute
ml	Milliliter
MPF	<i>maturation/mitosis-promoting factor</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
NEAA	<i>Nonessential amino acids</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur

NHEJ	Nichthomologes Endjoining
nm	Nanometer
osm	osmol
OT	Objektträger
Pa	Pascal
PCC	<i>premature chromosome condensation</i>
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RBW	Relative Biologische Wirksamkeit
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S-Phase	Synthetisierungsphase im Zellzyklus
SSA	<i>single strand annealing</i>
Sv	Sievert
V(D)J	<i>variable (diversity) joining</i>
w _R	Wichtungsfaktor
Z	Ordnungszahl
α	alpha
β	beta
γ	gamma
λ	lambda (Wellenlänge)
ν	Frequenz

1 Zusammenfassung/Summary

Die Strahlendiagnostik ist die größte künstlich geschaffene Quelle für Röntgenstrahlung im Alltag. DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) sind hierbei die schwerwiegendsten von ionisierender Strahlung (IR) verursachten Läsionen, da sie die genomische Integrität gefährden (UNSCEAR 2000). Bei Computertomographie (CT)-Untersuchungen werden zur Unterstützung der Bildgebung vor der Bestrahlung häufig Kontrastmittel (KM) injiziert, welche Elemente mit einer hohen Ordnungszahl (Z) (z. B. Jod) enthalten und somit die Absorption der Strahlung verstärken. Dies beruht darauf, dass bei Photonenenergien, wie sie in der Röntgendiagnostik eingesetzt werden, bei der Absorption sowohl der Photo- als auch der Comptoneffekt auftritt und die Abhängigkeit der durch den Photoeffekt deponierten Energie von Z sehr hoch ist. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich deshalb mit der Frage, ob eine Bestrahlung im Beisein von jodhaltigem KM einen Einfluss auf die DSB-Entstehung hat.

In der Röntgendiagnostik werden Röntgendosen von wenigen mGy appliziert. Hierbei werden wenige DSBs induziert, für deren Messung man eine sensitive Methode benötigt. In einer früheren Studie wurde erfolgreich die Methode der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM) in Lymphozyten von CT-Patienten etabliert (Lobrich et al. 2005). Diese erwies sich als sehr sensitiv. Bei klinischen Studien besteht jedoch das Problem, dass sich Patienten in ihrem genetischen Hintergrund unterscheiden, was einen Einfluss auf die gemessenen Effekte haben kann. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Sensitivität der IFM unter standardisierten Bedingungen validiert werden. Dazu wurde zunächst in Kooperation mit der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar die γ H2AX-IFM in murinen Lymphozyten etabliert (Rube et al. 2008b). Hierfür wurde die Induktion und Reparatur von DSBs in Lymphozyten verschiedener Mausmutanten mit bekannten Defekten in Komponenten der DSB-Reparatur gemessen. Hierbei spiegelte sich selbst eine geringe Strahlenempfindlichkeit der Mäuse in einer eingeschränkten DSB-Reparaturkapazität wider, sodass sich die IFM als sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von DSBs erwies.

Nach Validierung der Methode wurde zunächst *in vitro* die Auswirkung von KM auf die Induktion und Reparatur von DSBs untersucht. Dies wurde mittels γ H2AX- und 53BP1-IFM sowie alternativer Methoden wie Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und *premature chromosome condensation* (PCC) durchgeführt. Hierbei konnte in primären humanen Lymphozyten und Fibroblasten gezeigt werden, dass die Zugabe von KM vor 90 kV-Röntgenbestrahlung verglichen mit unbehandelten Proben zu einer 40-60%igen Erhöhung der initialen DSB-Anzahl führt (= KM-Effekt). Ohne Bestrahlung hatte KM keinen Einfluss auf die DSB-Entstehung. Um die Abhängigkeit des KM-Effektes von der Photonenenergie zu untersuchen, wurden humane Lymphozyten auch mit 660 kV- γ -Strahlung bestrahlt, woraufhin

kein KM-Effekt beobachtet wurde. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Anwesenheit von KM während 90 kV-Röntgenbestrahlung eine Steigerung des Photoeffektes zur Folge hat, was zu einer erhöhten Induktion von DSBs führt, da nach γ -Bestrahlung die Energie hauptsächlich durch Comptonelektronen deponiert wird. Da dieser Vorgang unabhängig von Z ist, konnte kein KM-Effekt beobachtet werden.

In anschließenden Patientenstudien wurde der KM-Effekt auch *in vivo* mittels γ H2AX-IFM an Lymphozyten von CT-Patienten untersucht. Parallel dazu wurde die individuelle *in vitro*-Reparatur anhand von *in vitro*-bestrahlten Proben ermittelt. Unter Berücksichtigung der individuellen DSB-Schadensantwort konnte auf diese Weise auch nach *in vivo*-Bestrahlung eine 20-40%ige Erhöhung der initialen DSB-Anzahl in Anwesenheit von KM beobachtet werden. Da die erste untersuchte Patientengruppe bezüglich der Patientencharakteristika inhomogen war, wurden die Ergebnisse mit einem zweiten unabhängigen CT-Patientenkollektiv verifiziert. Hierbei glichen sich die nativ und die mit KM bestrahlte Vergleichsgruppe im mittleren Alter, in der Altersverteilung innerhalb jeder Gruppe sowie in den klinischen Indikationen. Die Messungen ergaben auch hier eine signifikante Erhöhung der Anzahl an induzierten DSBs von 33% bei CT-Patienten mit KM-Gabe, sodass die *in vivo*-Daten der ersten Patientengruppe verifiziert werden konnten.

In den o. g. Patientenstudien traten große Unterschiede im individuellen Reparaturverhalten auf. Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht, ob die Reparaturkapazität von den Faktoren Alter, klinischer Indikation oder dem Geschlecht beeinflusst wird. Sowohl im ersten als auch in einer dritten Patientengruppe konnte gezeigt werden, dass Patienten über 60 Jahre eine verminderte DSB-Reparaturkapazität gegenüber jüngeren Patienten (im Mittel 30 Jahre) aufweisen. Weiterhin zeigten Frauen ein tendenziell schlechteres Reparaturvermögen als Männer. Dagegen ergab ein Vergleich der klinischen Indikationen keine Unterschiede.

Eine frühere Studie konnte beobachten, dass in konfluenten Fibroblasten die DSB-Reparaturkapazität *in vitro* mit niedriger werdender Röntgendosis abnimmt und nicht-reparierte DSBs verbleiben (Rothkamm & Lobrich 2003). Um die physiologische Relevanz zu untersuchen, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit das Reparaturvermögen im Niedrigdosisbereich auch *in vivo* in verschiedenen Mausgeweben untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die DSB-Reparatureffizienz auch *in vivo* konsistent zu den bisherigen *in vitro*-Daten nach einer Niedrigdosis von 10 mGy verglichen mit höheren Dosen abnimmt. Nachdem die Daten von Rothkamm & Lobrich (2003) *in vitro* in konfluenten Fibroblasten mit zusätzlichen Röntgendosen und zwei DSB-Markern bestätigt wurden, wurde versucht, ein besseres Verständnis für die Ursache von nicht-reparierten DSBs zu erlangen. Hierfür wurde mittels H_2O_2 -Behandlung vor Röntgenbestrahlung der oxidative Stress in den Zellen erhöht, was zur Reparatur aller strahleninduzierten DSBs führte. Dies lässt vermuten, dass durch eine Erhöhung des oxidativen Stresses in der Zelle die DSB-Reparatur stimuliert wird.

Diagnostic X-rays are the largest man-made source of radiation exposure. They induce DNA double-strand breaks (DSBs) which are the most relevant biological damage induced by ionizing radiation (IR) as they compromise the genomic integrity (UNSCEAR 2000). Very often, contrast media (CM) are used to improve the visibility of internal body structures with similar densities in an X-ray image. Contrast media contain elements with high atomic numbers as iodine which increase the absorption of radiation. When photon radiation interacts with cells, secondary electrons are emitted by either the photoelectric or the Compton effect. At photon energies that are used during diagnostic X-ray examinations, the photoelectric effect is the predominant process that generates secondary electrons. The number of electrons emitted by this effect strongly depends on the atomic number (Z) of the irradiated matter ($\sim Z^4$).

The first part of this work aimed to investigate if iodinated CM influences the DSB induction after X-irradiation. In radiation diagnostics low dose exposure in the range of few mGy is applied. DSB levels induced by these doses are very low. The methods for the assessment of DSBs have to be very sensitive. In a past study in which γ H2AX-IFM (immune fluorescence microscopy) could be established successfully in lymphocytes of CT patients, this method proved to be very sensitive (Lobrich et al. 2005). As patients often differ in their genetic background, this can have an influence on the measured effects. To validate the sensitivity of this method under controlled conditions, the IFM was established in lymphocytes of different mouse mutants with known defects in DSB repair components. This happened in collaboration with the Department of Radiooncology, Saarland University, Homburg/Saar (Rube et al. 2008b). The ability to measure even slight differences in DSB repair pointed out the high sensitivity and suitability of this approach for the investigation of DSB induction and repair.

Following *in vitro* experiments to assess the influence of CM on the DSB induction included γ H2AX- and 53BP1-IFM and alternative methods like pulsed field gel electrophoresis and premature chromosome condensation. Therefore primary human lymphocytes and fibroblasts were irradiated in the presence or absence of CM. Thereby, CM administration prior to irradiation with 90 kV X-rays led to a dose-dependent increase of the initial amount of DSBs and chromosome breaks by approximately 40-60%. The administration of CM after irradiation had no effect. To investigate the dependence of this effect on the applied dose and the photon energy, additional experiments with lymphocytes were performed using 660 kV- γ -rays. After γ -ray exposure CM had no effect on the DSB induction. γ -rays predominantly interact with matter through the Compton effect. The number of emitted Compton electrons by this effect is independent of Z . This suggests that the presence of iodine during X-irradiation increases the yield of DSBs in irradiated cells because of the higher X-ray absorption due to increased photoelectric interaction.

To investigate the CM effect *in vivo*, the amount of γ H2AX-foci was quantified in lymphocytes of individuals undergoing CT examinations with or without CM administration. Considering the individual repair capacity of each patient by comparing his *in vivo* data with individual *in vitro* data, the results obtained *in vivo* showed that a CM administration prior to CT examination leads to an increase of DSBs in the lymphocytes of patients of approximately 30%. As the first group of patients showed great inter-individual variation in the level of DSB repair, and to confirm the recent findings, a second independent CT patient group was evaluated. To avoid inter-individual variation, this patient group was matched in age and health status. Foci numbers assessed *in vivo* after CT confirmed the findings that CM leads to an increase in the induction of DSBs by X-irradiation.

Because there were substantial differences in DSB repair between individuals, further investigations were performed in order to identify factors which influence DSB repair. Therefore, patients of the first and of a new third patient group were compared in age, health status and gender and analyzed by their DSB repair behaviour. The results revealed a diminished repair capacity for patients older than 60 years compared to younger patients with a mean age of 30 years. Furthermore, women showed a slightly diminished DSB repair capacity compared to men. In contrast, the health status did not influence DSB repair. This suggests that a person's age and perhaps also gender may affect the individual DSB repair capacity.

A former work of Rothkamm & Lobrich (2003) with confluent wild-type fibroblasts reported that DSB repair becomes less efficient with decreasing radiation doses and that a subset of DSBs remains unrepaired. To examine the physiological relevance of these results, subsequent low dose studies were performed in different mouse tissues of repair proficient wild-type mice. Using γ H2AX and 53BP1 as DSB markers, it could be seen for the first time that consistent to the previous findings *in vitro*, DSB repair after a dose of 10 mGy is less efficient compared with higher doses *in vivo* and that a subset of DSBs remains unrepaired after irradiation.

After approving the data of Rothkamm & Lobrich (2003) with confluent wild-type fibroblasts, but with additional radiation doses and two DSB markers (γ H2AX and pATM), further investigations should improve our understanding for the reasons of DSBs remaining unrepaired after X-ray irradiation. Therefore confluent wild-type fibroblasts were treated with H₂O₂ before irradiation to enhance cellular oxidative stress. Following DSB repair studies revealed that H₂O₂ pretreated cells exhibited a better DSB repair capacity than untreated cells. These results led to the conclusion that oxidative stress has an impact on the efficiency of DSB repair.

2 Einleitung

2.1 Strahlenbiologische Grundlagen

Das Hauptaugenmerk der Strahlenbiologie ist die Wirkung von ionisierender Strahlung (ionizing radiation = IR) auf biologische Systeme. Hierbei bildet die DNA den Hauptgegenstand der Betrachtungen, weil der Erhalt der genomischen Integrität von größter Wichtigkeit für jeden Organismus ist. Die DNA wird jeden Tag sowohl durch exogene als auch endogene Faktoren auf verschiedenste Art und Weise geschädigt, wobei IR durch die natürliche Hintergrundstrahlung und die Anwendung in der medizinischen Diagnostik ein wichtiger exogener Faktor ist. Um dessen Einfluss auf die DNA untersuchen zu können, gilt es, neben zellbiologischen Vorgängen auch die physikalischen Grundlagen zu verstehen.

2.1.1 Strahlenphysikalische Grundlagen

Physikalisch definiert man „Strahlung“ als den Transport von Energie, ohne dass dies durch ein Medium vermittelt werden muss. Daher versteht man z. B. das Licht als Strahlung. Strahlung kann als elektromagnetische (em) Welle oder als Teilchenstrahlung auftreten. Die em-Welle ist dadurch gekennzeichnet, dass ihre elektrischen und magnetischen Felder senkrecht aufeinander stehen und mit der Zeit variieren, sodass sich die em-Welle vorwärts bewegt. Die Geschwindigkeit (c), mit der sich diese Welle vorwärts bewegt, ist dabei das Produkt der Wellenlänge (λ) und der Frequenz (ν). Sie lässt sich nach dem Prinzip der Quantentheorie auch als Form kleiner Energiepakete (E) verstehen, welche das Produkt aus dem Planckschen Wirkungsquantum (h) und ν sind (Abb. 2.1).

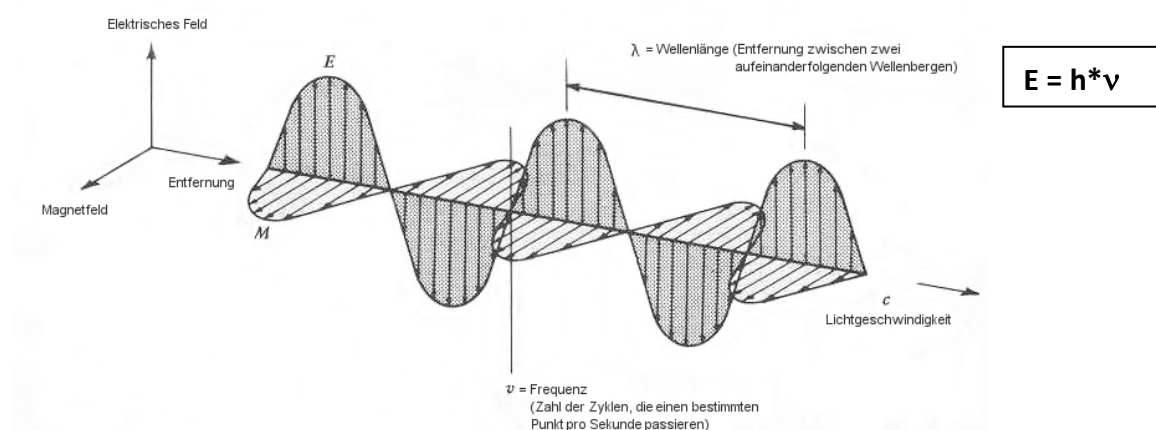


Abb. 2.1: Elektromagnetische (em) Welle

Die elektrischen und magnetischen Felder stehen senkrecht aufeinander und variieren mit der Zeit. Die Geschwindigkeit (c) der daraus entstehenden Bewegung ist das Produkt aus der Wellenlänge (λ) und der Frequenz (ν). Nach der Quantentheorie besteht sie aus Energiepaketen (E), welche das Produkt aus dem Planckschen Wirkungsquantum (h) und ν sind.

(Quelle: www.fe-lexikon.info/lexikon-e.htm#elektromagnetischewelle).

Bei der Betrachtung der Wechselwirkung zwischen Strahlung und Materie kommt der Quantenenergie eine entscheidende Rolle zu. Sie bestimmt die Art der Wechselwirkung und die daraus resultierenden Effekte. In der Strahlenbiologie ist in diesem Zusammenhang besonders das Ionisationsvermögen von entscheidendem Interesse. Damit wird die Fähigkeit der em-Strahlung beschrieben, bei der Absorption durch Materie deren Atome und Moleküle anzuregen und zu ionisieren. Unter Ionisation versteht man einen Stoßprozess, bei welchem die Strahlungsquanten mit den Elektronen wechselwirken und diese aus ihrer Bahn um den Atomkern werfen, sodass ein positiv geladenes Atom zurückbleibt.

Zu ionisierender Strahlung gehören alle Strahlenarten ab einer Wellenlänge von 100 nm, wobei diese Grenze nicht abschließend festgelegt ist. Hierzu zählen bei den Quantenstrahlungsarten kurzwellige UV-Strahlung sowie Röntgen- und γ -Strahlung. Daneben gehört auch die Teilchenstrahlung wie z. B. Protonen, α -Teilchen sowie Neutronen zu ionisierender Strahlung.

Röntgen- und γ -Strahlung unterscheiden sich prinzipiell nicht in ihren Eigenschaften, sondern in der Art ihrer Entstehung. Während Röntgenstrahlung bei der Wechselwirkung beschleunigter Elektronen mit Materie entsteht, wird γ -Strahlung bei dem Zerfall radioaktiver Elemente wie z. B. Cäsium gebildet (Kiefer & Kiefer 2003).

2.1.1.1 Röntgenstrahlung

Die Röntgenstrahlung wurde von Wilhelm Conrad Röntgen entdeckt. Außerhalb Deutschlands wird sie häufig mit dem von Röntgen ursprünglich selbst verwendeten Begriff *X-Strahlung* (englisch *X-rays*) bezeichnet. Sie entsteht, wenn beschleunigte Elektronen auf Materie treffen. Hierbei werden zwei Prozesse unterschieden: zum einen die Bildung von „charakteristischer Strahlung“ und zum anderen die Bildung von „Bremsstrahlung“.

Treffen beschleunigte Elektronen mit ausreichend hoher Energie auf absorbierende Materie, werden Hüllelektronen aus der Atomhülle der in der Materie befindlichen Atome gelöst. Dadurch kommt es zu einem freien Platz in der entsprechenden Atomschale. Wird dieser Platz von einem Elektron aus einer höheren Schale besetzt, wird die Energiedifferenz als Strahlungsquant freigegeben. Die Energie des Quants ist atomtypisch, da sie von der energetischen Lage der beteiligten Orbitale abhängt. Man spricht daher auch von „charakteristischer Röntgenstrahlung“.

Bei der Entstehung von „Bremsstrahlung“ handelt es sich im Gegensatz dazu um einen Prozess, bei welchem das beschleunigte Elektron nach dem Coulombschen Gesetz vom positiv geladenen Atomkern angezogen wird. Dadurch wird die Elektronenbahn um den Kern gekrümmt und das Elektron gebremst, wodurch es Energie abgibt. Der dabei abgegebene Energiebetrag kann sehr variabel sein. Er hat als obere Grenze die ursprüngliche Elektronenenergie und hängt vom Abstand zum Kern ab. Das Emissionsspektrum einer Rönt-

genröhre setzt sich somit aus der „charakteristischen Röntgenstrahlung“ und der „Bremsstrahlung“ zusammen (Kiefer & Kiefer 2003).

2.1.1.2 γ -Strahlung

Radioaktivität (radioaktiver Zerfall oder Kernzerfall) entsteht durch den Zerfall von instabilen Atomkernen. Dies ist ein spontaner Prozess, bei welchem Teilchen abgegeben werden. Der Grund hierfür liegt in einer speziellen Kernzusammensetzung von einer großen Anzahl an Protonen und Neutronen, welche zu Instabilität führt. Der zeitliche Verlauf der Emissionen nach Zerfall ist durch das Zerfallsgesetz beschrieben, bei welchem die wichtigste charakteristische Größe die Zerfallskonstante ist. Diese kennzeichnet die Geschwindigkeit des radioaktiven Zerfalls einer Substanz. Hat ein Atomkern nach Zerfall ein Teilchen emittiert, kann er angeregt zurückbleiben, bevor er nach Aussenden von γ -Quanten in seinen Grundzustand zurückfällt. Da ähnlich wie in der Atomhülle auch im Kern die Anregungszustände durch diskrete Niveaus festgelegt sind, sind die Energien der abgegebenen γ -Strahlung charakteristisch für die verschiedenen Elementisotope (Kiefer & Kiefer 2003).

2.1.2 Wechselwirkungen ionisierender Strahlung (IR) mit Materie

Bei der Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit Materie finden Ionisationsprozesse statt, bei welchen die Strahlungsquanten mit den Elektronen der Materie wechselwirken und diese aus ihrer Bahn um den Atomkern werfen. Von physikalischer Bedeutung ist, dass vor und nach dem Stoßprozess die Bilanz der Energien und des Impulses gleich bleibt. Im Folgenden werden die verschiedenen Wechselwirkungsprozesse beschrieben.

2.1.2.1 Photoeffekt, Comptoneffekt und Paarbildung

Liegen die Quantenenergie und die Stärke der Elektronenbindung in vergleichbarer Größenordnung vor, kommt es vorwiegend zum Photoeffekt. Beim Photoeffekt überträgt das beschleunigte Elektron seine gesamte Energie auf ein Elektron der K-, L- oder M-Schale des absorbierenden Materials. Das Elektron verlässt seine Schale mit einer kinetischen Energie, die der Quantenenergie abzüglich der Bindungsenergie entspricht. Die freie Schale des ionisierten Atoms kann wiederum durch ein Elektron einer kernferneren Schale aufgefüllt werden, wodurch es zu einer Abnahme der potenziellen Energie kommt und die überschüssige Energie als Photonen charakteristischer em-Strahlung abgegeben wird. Der Photoeffekt tritt hauptsächlich bei niedrigeren Photonenenergien bis 50 keV auf.

Bei mittleren Energien von 0,1 bis 1 MeV kommt es in erster Linie zum Comptoneffekt. Hierbei sind meist Elektronen der äußeren Umlaufbahnen um den Kern betroffen, deren Bindungsenergie kleiner ist als die eintreffende Photonenenergie. Es kann somit nicht mehr die gesamte

Energie an das Elektron abgegeben werden, sodass ein Quant niedrigerer Energie übrig bleibt, welches in einem bestimmten Winkel gestreut wird.

Für die Paarbildung, einem dritten Wechselwirkungsprozess, sind Quantenenergien von mehr als 1,02 MeV nötig, um die „Ruheenergien“ der bei diesem Prozess entstehenden Teilchen zu übersteigen. Das eintreffende Quant materialisiert bei diesem Prozess zu einem Positron und einem Elektron. Die Summe ihrer kinetischen Energien entspricht der Quantenenergie vermindert um die „Ruheenergien“ der beiden Teilchen (Kiefer & Kiefer 2003, Hall & Giaccia 2006).

Die bei den beiden erstgenannten Prozessen entstehenden Photo- und Comptonelektronen sowie gestreuten Quanten haben meist eine ausreichend große Energie, um in der Materie noch eine gewisse Strecke zurückzulegen. Auf diesem Weg können sie auf weitere Atome treffen und dort weitere Anregungen und Ionisationen auslösen. Dies bezeichnet man als Ionisations- oder Bahnspur. Die Energiedeposition bei em-Strahlung erfolgt also im Wesentlichen durch entstandene Sekundärelektronen (Nikjoo & Goodhead 1991). Somit sind nicht hauptsächlich die primären Absorptionsprozesse der Quanten, sondern die durch Sekundärelektronen ausgelösten weiteren Ionisationen verantwortlich für die Wirkung von Röntgen- und γ -Strahlung.

2.1.2.2 Linearer Energietransfer (LET) und Relative Biologische Wirksamkeit (RBW)

Bei der Energiedeposition ionisierender Strahlung in der Materie durch Sekundärelektronen kann man je nach Energie die ionisierende Strahlung in dicht oder dünn ionisierend unterscheiden. Röntgen- und γ -Strahlung gehören zu den dünn ionisierenden Strahlenarten, bei deren Absorption die dabei entstehenden Sekundärelektronen auf ihrem weiteren Weg eine relativ geringe Anzahl an Ionisationen mit weit auseinander liegenden Ionisationsorten hinterlassen. Dies steht im Gegensatz zu α - und Teilchenstrahlung, welche entlang ihrer Bahnspur tausende von Ionisationen auslösen und daher als dicht ionisierend gelten. Um diesen Vorgang genauer zu beschreiben, wurde der LET (*linear energy transfer*) als Messgröße eingeführt. Dieser beschreibt die längs der Bahnspur pro Weglängeneinheit lokal deponierte Energie aller Teilchen. Außerdem ändert er sich mit der kinetischen Energie der Sekundärelektronen. Da deren Geschwindigkeit gegen Ende der Bahnspur abnimmt, hinterlassen sie daraufhin mehr Ionisationen pro Wegstreckeneinheit, wodurch der LET zunimmt.

$$\text{LET} = \frac{\text{lokal absorbierte Energie}}{\text{durchlaufende Wegstrecke}} \left[\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right]$$

Alle Arten von IR verlieren beim Durchgang durch Materie Energie. Entscheidend für die Betrachtung der biologischen Wirkung von Strahlung ist daher die im Körper deponierte Energie. Diese so genannte „Energiedosis“ wird als absorbierte Energie pro Masse definiert

[Joule pro kg] und in der Einheit Gray [Gy] angegeben. Im Strahlenschutz wird diese Einheit jedoch nicht verwendet, da unterschiedliche Strahlenarten bei gleicher Dosis unterschiedliche biologische Wirkungen entfalten. Man spricht hierbei von einer unterschiedlichen Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW). In diesem Zusammenhang wurde die Äquivalentdosis mit der Einheit Sievert (Sv) eingeführt. Diese ergibt sich wiederum aus dem Produkt aus der Energiedosis in Gy und dem Wichtungsfaktor (w_R). Beispielsweise entspricht 1 Gy Röntgen- oder γ -Strahlung einer Äquivalentdosis von 1 Sv, da Photonenstrahlung bei allen Energien einen w_R von 1 besitzt. Eine Bestrahlung mit 1 Gy α -Teilchen würde jedoch einer Äquivalentdosis von 20 Sv entsprechen, da der w_R von α -Teilchen 20 ist.

$$\text{Äquivalentdosis [Sv]} = w_R * \text{Energiedosis [Gy]}$$

2.1.2.3 Grenzflächeneffekte

Bei der Betrachtung der absorbierten Dosis in einem bestimmten Materialvolumen (z. B. dem menschlichen Körper) muss berücksichtigt werden, dass beim Auftreffen von Strahlung an der Grenzfläche zur Luft (z. B. an der Haut) ein sogenannter Grenzflächeneffekt auftritt. Hierbei können Sekundärelektronen, welche unmittelbar hinter dieser Grenzfläche entstehen, aus dem Volumenelement herausfliegen und somit absorbierte Energie wieder heraustragen. Aus der Luft, die vergleichsweise wenige Moleküle enthält, fliegen jedoch kaum Sekundärelektronen in das Volumenelement hinein, sodass ein Sekundärelektronenungleichgewicht entsteht. Die maximale Energiedosis wird also nicht direkt an der Grenzfläche erreicht, sondern erst im Inneren des Volumenelements (z. B. im Gewebe) (Abb. 2.2).

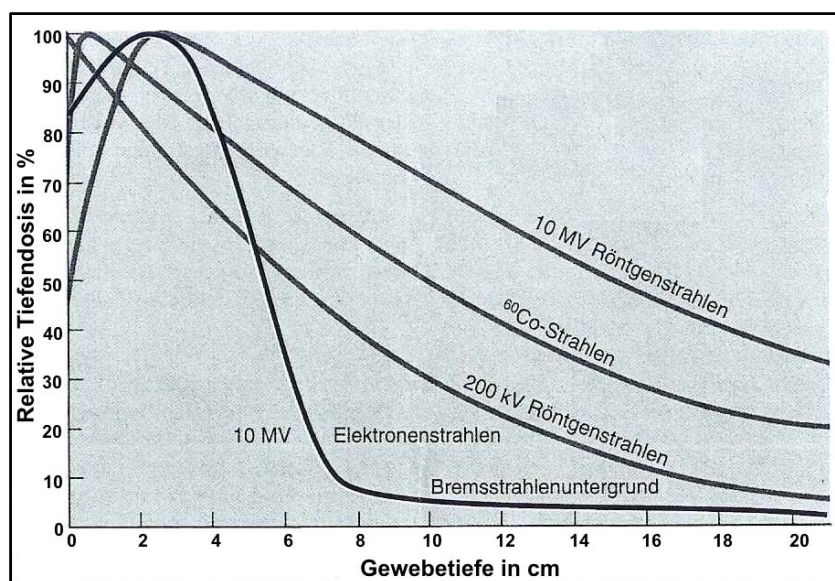


Abb. 2.2: Tiefenverlaufskurven verschiedener Photonenstrahlen und 10 MV Elektronenstrahlen in Wasser
Verlauf der Energiedeposition (Relative Tiefendosis in %) in unterschiedlichen Gewebetiefen abhängig von der Energie der Strahlung. In welcher Tiefe die maximale Energiedosis erreicht ist, hängt von der Photonenenergie ab. Je höher die Energie, desto weiter verschiebt sich das Maximum in die Tiefe (Quelle: Sauer 2003).

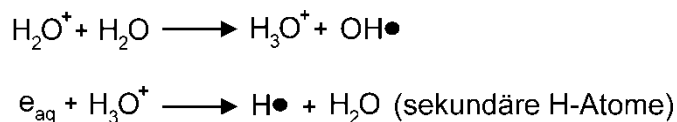
Wo im Inneren des Volumenelements das Dosismaximum erreicht ist, hängt von der Energie der Strahlung und damit von der Reichweite der Sekundärelektronen ab. Je höher die Energie der Elektronen, desto weiter verschiebt sich das Dosismaximum in die Tiefe. Bei harter γ -Strahlung und ultraharter Röntgenstrahlung bewegen sich darüber hinaus die Sekundärelektronen ganz überwiegend in Richtung der einfallenden Photonenstrahlung, weisen also eine Vorwärtsstreuung auf (Sauer 2003).

2.1.3 Wechselwirkung IR mit der DNA

Es wurde bereits früh erkannt, dass für das Überleben von Zellen nach Bestrahlung die Schädigung der DNA und nicht die Schädigung von Bestandteilen im Zytoplasma verantwortlich ist (Munro 1970). Dabei unterscheidet man die direkte von der indirekten Strahlenwirkung. Die direkte Strahlenwirkung tritt vorwiegend bei dicht ionisierender Strahlung auf (z. B. α -Strahlung). Hierbei wechselwirkt das Strahlungsteilchen oder ein Sekundärelektron direkt mit der DNA und hinterlässt angeregte oder ionisierte Atome. Demgegenüber werden bei der indirekten Strahlenwirkung über die Wechselwirkung mit anderen Atomen und Molekülen in der Zelle zuerst diffusible Radikale erzeugt, welche wiederum über eine Radikalkettenreaktion zu einer DNA-Schädigung führen können. Da eine Zelle zum größten Teil aus Wasser besteht, reagieren die Photonen meist zuerst mit Wassermolekülen und ionisieren oder spalten diese anschließend:



Dabei entstehen oxidierende OH-Radikale ($\text{OH}\bullet$) und reduzierende H-Radikale ($\text{H}\bullet$) sowie Elektronen mit Wasserhülle. H_2O^+ ist ein hoch reaktives Ionenradikal, da es ein ungepaartes Elektron besitzt. Seine Halbwertszeit beträgt 10^{-10} s. In dieser Zeit kann es mit anderen Wassermolekülen wechselwirken:



Neben reduzierenden H-Radikalen ($\text{H}\bullet$) entstehen daraufhin weitere reaktive Hydroxylradikale ($\text{OH}\bullet$). Diese haben ebenfalls eine Halbwertszeit von 10^{-10} s (Acworth et al. 1999). Es wird davon ausgegangen, dass zweidrittel der entstehenden DNA-Schäden nach Bestrahlung mit dünnionisierender Strahlung von Hydroxylradikalen verursacht werden (Ward et al. 1985). Um die DNA schädigen zu können, müssen diese Radikale in einem Umkreis von wenigen nm um die DNA herum entstehen (vgl. Abb. 2.3). Größere Distanzen führen zur Detoxifikation (Ward et al. 1987, Goodhead 1994).

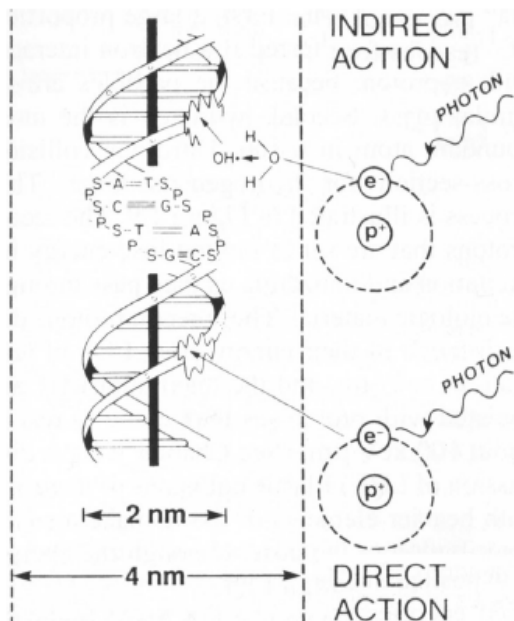


Abb. 2.3: Direkte und indirekte Strahlenwirkung ionisierender Strahlung

Über die Wechselwirkung von Photonen mit Atomen werden Sekundärelektronen gebildet. Bei der indirekten Strahlenwirkung (oberer Teil der Darstellung) werden über die Wechselwirkung der Sekundärelektronen mit anderen Atomen und Molekülen in der Zelle zuerst diffusible Radikale (hier ein Hydroxylradikal = $\text{OH}\bullet$) erzeugt, welche über eine Radikal-kettenreaktion zu einer DNA-Schädigung führen. Bei der direkten Strahlenwirkung (unterer Teil der Darstellung) interagieren die Sekundärelektronen oder Photonen (hier ein Sekundärelektron) direkt mit der DNA. Bei dicht ionisierender Strahlung überwiegen direkte Strahleneffekte, bei dünn ionisierender Strahlung indirekte. (S = Zucker; P = Phosphat; A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymin) (Quelle: Hall & Gaccia 2006)

Da die Energie der Strahlung nicht gleichmäßig verteilt, sondern entlang der Bahnsuren von Sekundärelektronen abgegeben wird, treten lokale Anhäufungen von Radikalen auf. Diese bezeichnet man als *Spurs* und *Blobs* (Ward 1990). Bei Röntgen- und γ -Strahlung wird 95% der absorbierten Energie in Form von *Spurs* deponiert. Diese beinhalten bis zu 100 eV an Energie und drei Ionenpaare. Sie haben einen Durchmesser von 4 nm, was dem doppelten DNA-Durchmesser entspricht. Weniger häufig treten *Blobs* auf. Diese haben einen Durchmesser von 7 nm und beinhalten zwölf Ionenpaare. Bei ihnen liegt die durchschnittliche deponierte Energie bei 100 bis 500 eV.

2.1.3.1 Locally multiply damaged sites (LMDS)

Wenn *Spurs* und *Blobs* innerhalb eines gewissen Radius' um die DNA herum auftreten, reagieren die Radikale mit dem DNA-Molekül und hinterlassen sogenannte *Multiply damaged sites* (MDS), also Mehrfachschädigungen der DNA (Ward 1990) (Abb. 2.4). Hierbei häufen sich Basen- oder Zucker-Phosphat-Rückgradschäden im Bereich weniger Basenpaare an. Diese werden aufgrund der örtlichen Begrenzung auch als *Locally multiply damaged site* (LMDS) bezeichnet (Goodhead 1989). Sie werden durch eine einzige Bahnspur erzeugt und nehmen mit der Dosis und dem LET der Strahlung zu (Holley & Chatterjee 1996).

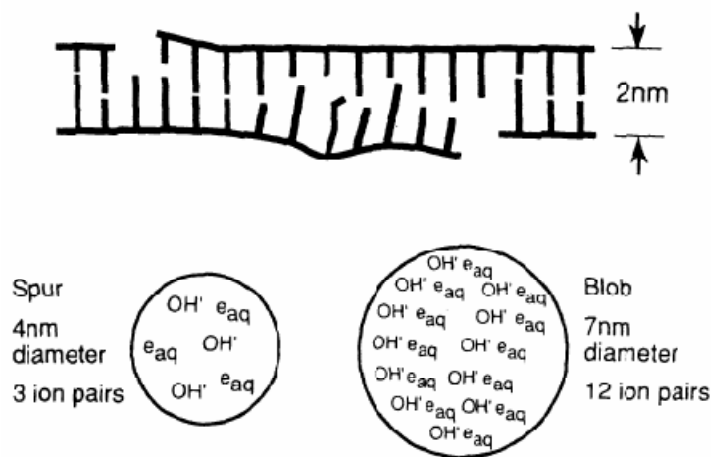


Abb. 2.4: Schematische Darstellung einer *Locally Multiply Damaged Site* (LMDS)

Die Energie von IR wird in Form von entstehenden *Spurs* und *Blobs* entlang der Bahnspur eines geladenen Teilchens deponiert. Treten diese in der Nähe der DNA auf, so kommt es zu zahlreichen Ionisationen innerhalb eines bestimmten Bereichs der DNA, so dass viele Schäden auf eng begrenztem Raum auftreten. Die räumlichen Ausmaße der ionisierten Bereiche sind dabei vergleichbar mit dem Durchmesser der DNA-Doppelhelix (Quelle: Hall & Gaccia 2006).

Haben Hydroxylradikale einmal die DNA erreicht, können sie dort eine Vielfalt unterschiedlicher Schäden in Form von apurinisierten Stellen, DNA-Strangbrüchen oder DNA-Protein-Crosslinks hinterlassen (Mello Filho & Meneghini 1984, Teebor et al. 1988). Berechnungen und Messungen ergaben, dass pro Gy Röntgenstrahlung etwa 2.500-3.000 Basenschäden, 1.000 Einzelstrangbrüche (ESBs) und 40 Doppelstrangbrüche (DSBs) erzeugt werden. Diese Werte variieren jedoch von Quelle zu Quelle (Elkind & Redpath 1977, Dahm-Daphi et al. 2000, Fisher et al. 2007).

Basenschäden entstehen jedoch nicht nur durch IR, sondern auch durch UV-Strahlung und endogene oxidative Prozesse. Diese treten dann in Form von DNA-Protein-Vernetzungen, deletierten Basen, Desaminierungen oder Depurinierungen auf. Basenschäden und ESBs können effektiv von der Zelle repariert werden und stellen keine besondere Gefahr für die genomische Integrität dar (Ward 1995).

2.1.3.2 DNA-Einzelstrangbrüche (ESBs)

ESBs können in vier Klassen eingeteilt werden: Zur ersten Klasse gehören ESBs, die durch einen Schnitt in der Phosphodiesterbindung entstehen und keine weiteren Veränderungen der Zucker oder Basen aufweisen (vgl. Abb. 2.5). Klasse II beinhaltet ESBs, bei welchen eine Phosphatgruppe fehlt ohne weitere Veränderungen der Zucker oder Basen. In der dritten Klasse von ESBs liegen veränderte Zucker oder Basen vor, entweder mit oder ohne Verlust der Phosphatgruppe. Zur Klasse IV gehören ESBs, die durch den Verlust eines kompletten Nukleotids entstanden sind (Obe et al. 1992).

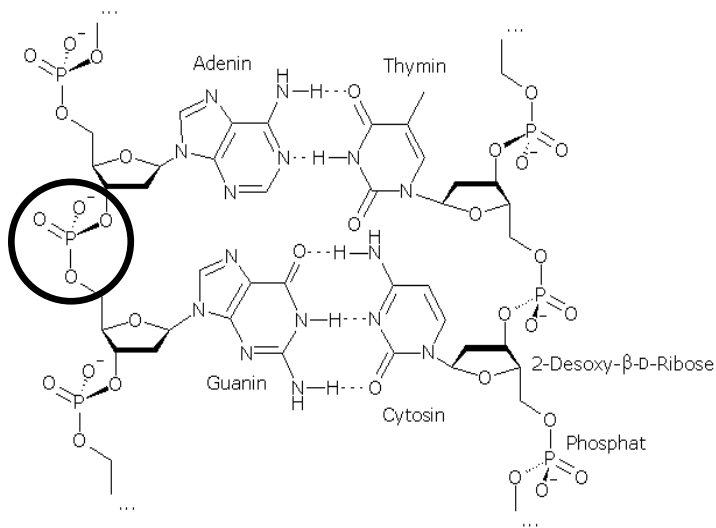


Abb. 2.5: Struktur des DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Moleküls

Die Molekülstruktur der DNA ist ein Polymer aus Nucleotiden. Jedes Nucleotid besteht aus Phosphorsäure bzw. Phosphat, dem Zucker Desoxyribose sowie einer heterozyklischen Base. Die Desoxyribose- und Phosphorsäure-Untereinheiten sind bei jedem Nucleotid gleich. Sie bilden das Rückgrat des Moleküls. Einheiten aus Base und Zucker (ohne Phosphat) werden als Nucleoside bezeichnet. Der schwarze Kreis-ausschnitt kennzeichnet eine Phosphodiesterbindung

(Quelle: www.kliniken.de/lexikon/Medizin/Diagnostik/Mikrobiologie/GC-Gehalt.html).

2.1.3.3 DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs)

Wird das Zucker-Phosphat-Rückgrat von beiden Einzelsträngen in einem Bereich von 10 bp geschädigt, sodass auf beiden Seiten ESBs entstehen, kommt es zu einem DSB (Friedland et al. 1999). Da sich ESBs selten direkt gegenüberliegen, sondern meist örtlich etwas voneinander versetzt sind, besitzen die entstehenden DSBs meistens keine glatten Enden, sondern Enden mit einzelsträngigen Überhängen oder Basen- und Phosphatgruppen-Modifikationen. Oftmals fehlt auch die 3'-OH-Gruppe. Brüche mit diesen Bruchenden werden meist als „komplexe“ Brüche bezeichnet.

DSBs bilden in Bezug auf das Zellüberleben die gravierendsten DNA-Läsionen und können zu Mutationen führen (Zhang et al. 2007). Bei Inaktivierung eines wichtigen Genprodukts kann bereits ein einzelner DSB in mehrzelligen Organismen zum Tod der Zelle führen (Jackson 2002). DSBs können durch endogene oder exogene Faktoren entstehen. Zu den exogenen Faktoren gehören IR (Ward 1990), chemische Agenzien sowie Chemotherapeutika (Povirk 1996, Degrossi et al. 2004). Zu den endogenen Faktoren zählen z. B. die V(D)J-Rekombination, ein Prozess zur Bildung der Antikörperdiversität (Gellert 2002, Franco et al. 2006), oder die Homologe Rekombination zwischen homologen Chromosomen während der Meiose (Keeney & Neale 2006). Weiterhin kommt es durch die Bildung metabolischer Nebenprodukte (*reactive oxygen species* = ROS) während der zellulären Atmung zu Basen- und Nucleotidschäden, die während der Replikation zu DSBs führen können (Dahm-Daphi et al. 2000). Auch mechanischer Stress, der auftreten kann wenn dizentrische Chromosomen während der Mitose zu den entgegengesetzten Polen gezogen werden, kann zur Entstehung von DSBs führen (Murnane 2006, Acilan et al. 2007).

2.2 Charakterisierung und Funktion von Kontrastmitteln (KM)

Kontrastmittel (KM) gelten nach § 2 Abs. 1 Nr. 2 des deutschen Arzneimittelgesetzes (AMG) als Arzneimittel. Sie dienen dazu, in bildgebenden Verfahren der Medizin die Darstellung von Strukturen und Funktionen des Körpers mit ähnlicher Röntgendichte zu verbessern und werden vor allem in der Röntgendiagnostik, der Magnetresonanztomographie (MRT) sowie der Sonographie eingesetzt. Dabei werden jod- und bariumhaltige KM in der Computertomographie (CT), gadoliniumhaltige KM in der Magnetresonanztomographie und Mikroläschen in der Ultraschalluntersuchung verwendet.

2.2.1 Physikalische Wirkung von KM während der Bestrahlung

In der diagnostischen Radiologie werden bei der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung üblicherweise Photonenenergien eingesetzt, die bei ca. 100 keV liegen. Dies stellt jedoch nur die maximal auftretende Photonenenergie dar. Das Energiemaximum liegt hierbei niedriger. In diesem Energiebereich werden jeweils ca. 50% der deponierten Energie in der Materie von Photo- bzw. Comptonelektronen verursacht. Bei höheren Photonenenergien verschiebt sich das Verhältnis hin zu einer vermehrten Entstehung von Comptonelektronen (Glocker & Macherauch 1971). Die beiden Absorptionseffekte unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrer strahlenbiologischen Wirkung, da bei beiden Effekten die Photonenenergie in kinetische Energie von Sekundärelektronen umgewandelt wird.

Röntgenstrahlung wird beim Durchgang durch Materie durch Absorption exponentiell geschwächt. Die Absorption ist hierbei zu der Dicke, der Dichte, der Ordnungszahl (Z) sowie den Elementen des Gewebes direkt und zur Energie der Röntgenstrahlen indirekt proportional. Die Materialkonstanten Dichte und Ordnungszahl werden häufig auch unter dem Begriff „Röntgendichte“ eines Stoffes zusammengefasst. Da die Abhängigkeit der durch den Photoeffekt deponierten Energie in Form von Sekundärelektronen von der mittleren Ordnungszahl (Z) des absorbierenden Gewebes sehr hoch ist ($\sim Z^4$), werden in der diagnostischen Radiologie (wie z. B. der CT) Photonenenergien verwendet, bei denen sich Photo- und Comptoneffekt die Waage halten. Die Ordnungszahlen der wichtigsten im Körper vorkommenden Elemente reichen von $Z = 1$ (Wasserstoff, H) über $Z = 6$ (Kohlenstoff, C), $Z = 7$ (Stickstoff, N), $Z = 8$ (Sauerstoff, O) bis hin zu $Z = 20$ (Calcium, Ca). Geordnet nach aufsteigender Röntgendichte absorbiert demnach im Körper vorhandene Luft keine Röntgenstrahlung, während Fettgewebe bereits eine geringe Absorption aufweist, gefolgt von parenchymatösem Gewebe und Knochen mit der höchsten Röntgendichte (www.rad.rwth-aachen.de/lernprogramm/grd.htm). Die Wirkung von jodhaltigen KM besteht darin, die Absorption der Röntgenstrahlung, welche nach dem Durchstrahlen des untersuchten Gewebes von Detektoren registriert wird, so zu modifizieren, dass hierdurch zusätzliche Informationen

struktureller (morphologischer) und funktioneller (physiologischer) Natur gewonnen werden können. Bildhaft zeigt sich dies in unterschiedlich hellen Bereichen auf einem CT-Bild. Die Erklärung für die Helligkeitsunterschiede zwischen Orten verschiedener Röntgendichte liegt in der computergestützten Berechnung eines CT-Bildes.

In der CT wird der Körper in Schichten eingeteilt, welche wiederum aus Volumenelementen (Voxel) bestehen. Um ein Bild zu erzeugen, wird die Schwächung von Röntgenstrahlung durch das Gewebe unter verschiedenen Einstrahlwinkeln gemessen. Die Schwächung eines jeden Voxels entlang eines Strahls wird anschließend aufsummiert, sodass die daraus resultierenden Messwerte Linienintegrale und alle aus einer Richtung aufgenommenen Linienintegrale wiederum ein Schwächungsprofil darstellen. Daraus lässt sich mittels eines Rekonstruktionsalgorithmus der lineare Schwächungskoeffizient μ der einzelnen Volumenelemente berechnen. Die in der CT allgemein verwendeten relativen Schwächungskoeffizienten μ_{rel} sind auf den Schwächungskoeffizienten von Wasser bezogen. Sie werden als Hounsfield-Einheiten (HE) bezeichnet und in der willkürlich bestimmten Hounsfield-Skala in Grautönen dargestellt. Dabei entspricht Wasser einer HE von 0 und Luft einer HE von 1.000 (Bohndorf & Richter 1992, Morneburg 1995).

Man unterscheidet generell zwischen röntgennegativen und -positiven KM. Röntgennegative KM sind Substanzen sehr geringer oder fehlender Absorption. Auf dem CT-Bild erscheinen sie daher schwarz. Den röntgennegativen KM sind z. B. H_2O , CO_2 oder Luft zuzuordnen. Röntgenpositive KM sind demgegenüber Substanzen mit einer sehr hohen Absorptionsfähigkeit, da sie Elemente mit hohem Z enthalten, welche viel höher als die des umliegenden Gewebes ist (z. B. Barium ($Z = 56$) oder Jod ($Z = 53$)). Reichern sich z. B. jodhaltige KM an bestimmten Stellen des Körpers an, werden im CT-Bild konzentrationsabhängige Unterschiede in der Absorption der Röntgenstrahlung angezeigt. Orte mit höheren Konzentrationen an KM und damit höherem mittleren Z absorbieren die Strahlung stärker als Orte mit niedrigerer Konzentration an KM und damit kleinerem mittleren Z und erscheinen damit auf dem CT-Bild heller (Elke et al. 1992). Der Zusammenhang zwischen KM-Konzentration (und damit Jodkonzentration) und Helligkeitsänderungen auf dem CT-Bild ist direkt linear (Clement et al. 2002).

Zu röntgenpositiven KM zählen zum einen Lösungen, die nicht wasserlöslich sind. Sie dienen zur besseren Darstellung der Speiseröhre und des Magen-Darm-Traktes (z. B. bariumsulfathaltige Lösungen) oder werden bei Lymphografien (ölige Jodverbindungen) eingesetzt. Zum anderen sind wasserlösliche KM zu nennen. Diese sind Salze der Trijod-Benzoesäure und werden intravaskulär gespritzt. Sie dienen zur Darstellung der Nieren, ableitender Harnwege (Urographie), von Blutgefäßen (Angiographie) oder anderer Organe (z. B. in der Computertomographie). Sie sind entweder lebergängig oder werden über die Nieren ausgeschieden.

2.2.2 Chemische Eigenschaften von KM

Jodhaltige KM sind mit 40 bis 50 Millionen Anwendungen pro Jahr weltweit die am häufigsten verwendeten Arzneimittel für die intravaskuläre Anwendung bei medizinischen bildgebenden Verfahren (Stand: 2000) (Christiansen et al. 2000). Es handelt sich dabei um hoch konzentrierte Lösungen an jodhaltigen Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht. Diese lassen sich in ionische und nicht-ionische Mono- und Dimere unterscheiden. Dabei gibt die Anzahl an Benzenringen ihren jeweiligen Status als Mono- oder Dimer wieder. Weitere relevante Merkmale von KM sind die Viskosität, elektrische Ladung, Osmolalität, Hydrophilie und die Molekültoxizität.

Die Viskosität eines KM hängt von der Form des Moleküls, der Anzahl der OH-Gruppen, der Konzentration und der Temperatur ab, was vor allem beim Handling während der Untersuchung eine Rolle spielt. Die Osmolalität ist durch die Konzentration der im Lösungsmittel gelösten KM-Moleküle gekennzeichnet. Die Hydrophilie wird durch die Anzahl an OH-Gruppen, deren räumlicher Anordnung und der Anordnung von lipophilen CH₃-Gruppen bestimmt. Die Molekültoxizität hängt vom räumlichen Aufbau und der Eigenschaft sich an Proteine zu binden ab. Weil 95% des KMs über die Nieren ausgeschieden wird, ist es von großer klinischer Bedeutung, dass Osmolalität, Molekültoxizität und Hydrophilie des KMs einen Einfluss auf die Nephrotoxizität haben (Wild & Puig 2003).

2.2.3 Klinische Nebenwirkungen von KM

Auch wenn die Anwendung bei bildgebenden Verfahren Routine ist und KM medizinisch als sicher eingestuft werden, kann es nach der Anwendung dennoch zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen. Hierbei sind nicht-ionische KM mit nur 2 bis 17% an auftretenden Nebenreaktionen verträglicher als ionische mit 9 bis 54% (Thomsen & Dorph 1993). Bei der Verträglichkeit stellt z. B. die Osmolalität einen wichtigen Faktor dar. Da die Osmolalität von Blutplasma bei 290 mosm pro ml liegt, kann es bei einer Verteilung von Substanzen mit einer wesentlich höheren Osmolalität zum Einstrom physiologischer Gewebsflüssigkeit in das Gefäßsystem kommen. Dies belastet das Herz-Kreislaufsystem. Neben vorhersagbaren toxischen Reaktionen können auch unvorhersehbare Nebenreaktionen auftreten, welche allergisch bedingt sind. Hierbei sind vor allem die KM-induzierte Nephropathie und die jodinduzierte Hyperthyreose zu nennen (Küfner et al. 2008).

Nicht-ionische KM kommen seit den 1980er Jahren in Europa zur Anwendung (Katayama et al. 1990) und gelten als sehr hydrophil. Zusätzlich zeigen sie eine geringe Neigung zur Bindung an Proteine. Zu den nicht-ionischen monomeren KM gehören z. B. die in der vorliegenden Arbeit verwendeten KM mit den Wirkstoffen Iopromid (Ultravist®, Schering, Berlin) und Iomeprol (Imeron®, Bracco Altana, Konstanz) (Abb. 2.6). Beide KM zeigen die gleiche Anzahl an

Jodatomen, haben eine ähnliche Dichte und besitzen ein ähnliches Molekulargewicht. Sowohl die Osmolalität (0,52 mosm pro kg H₂O gegenüber 0,61 mosm pro kg H₂O) als auch die Viskosität (4,5 mPa*s gegenüber 5,1 mPa*s (bei 37°C)) sind für Iomeprol jedoch geringer als für Iopromid (Gallotti et al. 1994, Speck 1999). Während bei der Applikation für beide KM keine oder geringfügige Effekte auf das kardiovaskuläre System sowie die Erythrozyten und Thrombozyten festgestellt werden konnten, traten bei 2 bis 8% der Patienten nach Gabe von Iopromid bei unterschiedlichen Röntgenuntersuchungen Nebenwirkungen auf (Piechaud et al. 1997, Sahin et al. 1998, Albrecht et al. 1999). Die Literaturangaben für Iomeprol differieren dagegen stark, bisher wurden aber nur milde bis moderate und nur wenige schwere Nebenwirkungen beobachtet.

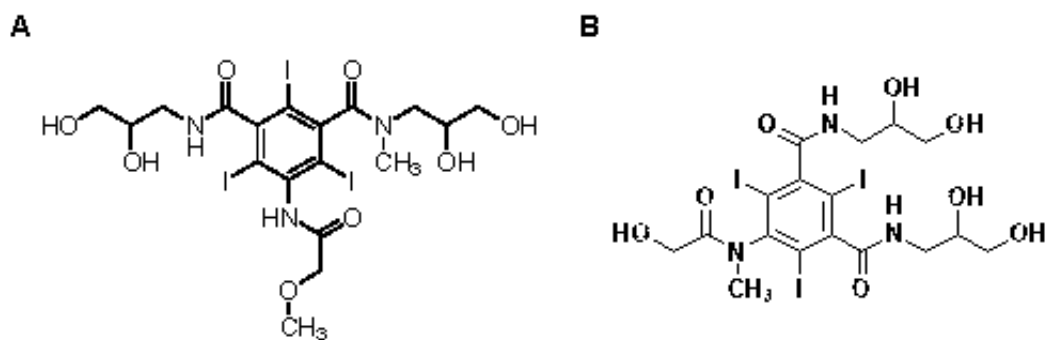


Abb. 2.6: Strukturformel von den KM mit dem Wirkstoff Iopromid (A) und Iomeprol (B)

(Quelle: [www.medicin.dk/\(jtblir55ihexf3jd1fr22345\)/show.aspx](http://www.medicin.dk/(jtblir55ihexf3jd1fr22345)/show.aspx))

2.2.4 Pharmakokinetik von KM

Die Verteilung von KM im Körper folgt einem einfachen Zwei-Kompartiment-Modell. Hierbei wird angenommen, dass das Mittel sich zunächst komplett mit dem Blutplasma vermischt, bevor der Transfer von dort in das Interstitium (*extracellular fluid* = ECF) erfolgt (Abb. 2.7).

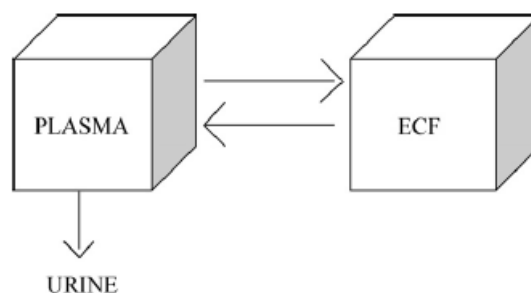


Abb. 2.7: Das Zwei-Kompartiment-Modell

Im Zwei-Kompartiment-Modell wird das KM in das Blutplasma (Plasma) injiziert. Hierbei wird vorausgesetzt, dass sich das KM erst komplett darin verteilt, bevor es von dort aus in das Interstitium (*extracellular fluid* = ECF) gelangt. Die Ausscheidung erfolgt über den Urin (Quelle: Dawson et al., 2006).

Nach der Injektion von KM fließen diese von der peripheren Injektionsvene in die Vena cava, wo es bereits zu einer Vermischung mit nicht-kontrastiertem Blut kommt. Dieser Vorgang ist bis

zur rechten Herzhälfte abgeschlossen. Von der rechten Herzhälfte gelangt das KM in den Lungenkreislauf und erreicht von dort über die linke Herzhälfte die Aorta. Etwa 15 bis 22 s nach der Injektion erreicht der KM-Bolus die Aorta (Prokop & van der Molen 2003) (Abb. 2.8).

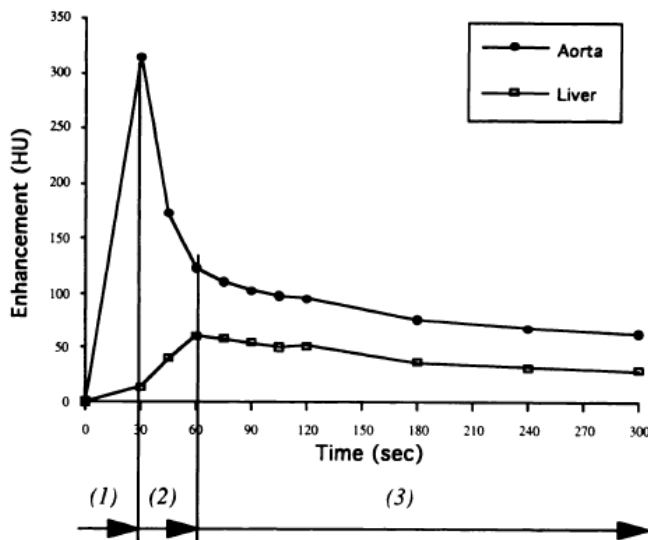


Abb. 2.8: Zeitverlaufskurven nach KM-Gabe

Zeitverlaufskurven für die Kontraststeigerung in Form von Hounsfield-Einheiten (HE, hier *Hounsfield Unit* = HU) in der Aorta und der Leber. In der Injektionsphase (1) wird das KM in das Blutkompartiment injiziert. Danach erfolgt die Verteilung im Blutkompartiment und im Interstitium der gut durchbluteten Organe wie Leber, Milz und Nieren (2). In (3) erreicht die Verteilung langsam auch schlecht erreichbare Kompartimente wie die Skelettmuskeln und schlecht durchblutetes Fettgewebe. Die höchste KM-Konzentration wird in diesem Beispiel in der Aorta nach ca. 30 s erreicht, während diese in der Leber erst am Ende der Phase (2) erreicht wird (Quelle: Bae et al. 1998).

In dieser Injektionsphase (= Phase 1 in der dargestellten Kinetik) wird der höchste Konzentrationspeak idealerweise in der Aorta erreicht. Dieser Peak steigt jedoch durch kumulative Effekte mit Fortschreiten der Injektion weiter an und erreicht an deren Ende seinen höchsten Wert. Die Zeit bis zur höchsten Konzentration hängt hierbei direkt von der Injektionsrate (ml pro s) und der Jodkonzentration (mg pro ml) ab. In der zweiten Phase findet eine schnelle Verteilung des KM im Blut und im Interstitium von gut durchbluteten Organen wie z. B. Leber, Milz und Nieren statt. Nur 1 bis 2% der applizierten Dosis gelangt in die Zellen (Dawson 2006). Als Interstitium, auch „Stroma“ genannt, wird das parenchymatische Zwischengewebe (meist Bindegewebe) bezeichnet. Darin verlaufen die Versorgungsbahnen der Organe (Blutgefäße und Nerven). Die Zellzwischenräume werden von der sogenannten Interstitialflüssigkeit ausgefüllt. In der letzten Phase 3 erreicht die Verteilung langsam auch schlecht erreichbare Kompartimente (z. B. die Skelettmuskeln und schlecht durchblutetes Fettgewebe). Auch wenn in dieser Zeit eine renale Ausscheidung des KM stattfindet, so verläuft diese verglichen mit der Verteilung doch relativ langsam. Um 50% des KM auszuschleiden, bedarf es ca. 2 h (Krause et al. 1994, Rosati 1994, Bae et al. 1998). KM werden im Körper nicht weiter metabolisiert und lassen sich nach 24 h fast vollständig im Urin nachweisen (Bourin et al. 1997).

2.2.5 Auswirkungen von KM auf die DNA

Neben Untersuchungen zu klinischen Nebenwirkungen existieren auch solche zum Auftreten von DNA-Schäden nach Gabe von jodhaltigem KM alleine oder in Kombination mit Röntgenstrahlung. Hierzu wurden Chromosomenaberrationen und Mikrokerne in unterschiedlichen Zellsystemen untersucht (Matsudaira et al. 1980, Hadnagy et al. 1982, Matsubara et al. 1982). Es zeigte sich, dass bei Lymphozyten, denen KM *in vitro* vor der Bestrahlung mit diagnostischer Röntgenstrahlung zugegeben wurde, die Anzahl an Chromosomenaberrationen und an Mikrokernen mit steigender KM-Konzentration signifikant anstieg. Dies stand im Gegensatz zu Lymphozyten, die ohne Zugabe von KM bestrahlt wurden. Dieser Effekt war interessanterweise nicht mehr zu beobachten, als durch *in vitro*-Bestrahlung mit ^{60}Co - γ -Strahlung die verwendete Photonenenergie stark erhöht wurde (Matsudaira et al. 1980, Matsubara et al. 1982, Santos Mello et al. 1983). Weiterhin führte eine Zugabe von KM *in vitro* ohne Bestrahlung nicht zu einer Erhöhung der Anzahl an Chromosomenaberrationen (Hadnagy et al. 1982).

Der genannte KM-Effekt konnte ebenfalls *in vivo* an Patienten, die eine diagnostische Röntgenuntersuchung durchliefen, in Form von Chromosomenaberrationen und Mikrokernen nachgewiesen werden (Adams et al. 1978, Norman et al. 1978, Matsubara et al. 1982). Hierbei wurde in Patientenstudien die tatsächlich verabreichte Dosis während der Röntgenuntersuchung anhand von Dosimetern bestimmt. Der Vergleich der ermittelten Anzahl an Mikrokernen nach der Untersuchung mit Äquivalenzdosen aus *in vitro*-Untersuchungen ergab, dass das KM eine Dosissteigerung in Form von vermehrt auftretenden Mikrokernen bewirkte (Callisen et al. 1979, Cochran et al. 1980). Auch die Anzahl an Chromosomenaberrationen stieg im Beisein von KM über das aufgrund der applizierten Dosis zu erwartende Maß hinaus an (Stephan & Hadnagy 1981). Ein direkter Vergleich der Anzahl an Chromosomenaberrationen in Lymphozyten nach einer CT-Untersuchung des Kopfes zwischen Patienten ohne und mit Gabe von KM vor der Untersuchung erbrachte ebenfalls einen signifikanten Anstieg, wenn KM verwendet wurde. Dagegen unterschieden sich die nativ bestrahlten Patienten nicht von unbestrahlten Kontrollen (Mozdarani & Fadaei 1998).

Obwohl diese Beobachtungen bereits seit mehreren Jahrzehnten gemacht werden, sind deren Ursachen bis heute unklar. Erklärungsversuche schließen u. a. einen höheren initialen DNA-Schaden nach Bestrahlung ein, der durch die Anwesenheit von KM während der Bestrahlung durch ein verstärktes Auftreten des Photoeffektes verursacht werden könnte (Norman et al. 1978, Callisen et al. 1979, Hadnagy et al. 1982, Santos Mello et al. 1983). Weiterhin werden eine Beeinträchtigung des Reparaturvermögens durch Spaltprodukte des KM nach Bestrahlung (Joubert et al. 2005) sowie zytotoxische Effekte, die KM unabhängig von Strahlung verursachen (Parvez et al. 1987), in Betracht gezogen.

2.3 Schadensantwort nach DSBs in eukaryotischen Zellen

Für Organismen spielt die korrekte Weitergabe von genetischer Information an Tochterzellen bei der Zellteilung eine essentielle Rolle. Die DNA wird täglich auf vielfältigste Art und Weise geschädigt. Von allen möglichen Arten der DNA-Schädigung sind DSBs am gravierendsten für die Zelle, da hierbei das Zucker-Phosphat-Rückgrat auf beiden Strängen und damit auch die genetische Information unterbrochen werden (Ward 1995).

Beim Auftreten von DSBs werden in der Zelle verschiedene Mechanismen aktiviert, welche der Wiederherstellung der genomischen Integrität dienen. DSB-Reparaturmechanismen beseitigen die Schäden, während die Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints Zeit für die Reparatur zur Verfügung stellt. Ist die DNA-Schädigung zu gravierend, kann eine Zelle die Apoptose einleiten. Der Verlust eines oder mehrerer Mechanismen kann zu genomischen und damit zu malignen Veränderungen führen (Hoeijmakers 2001, van Gent et al. 2001).

Nach Auftreten von DSBs werden verschiedene Signal-Transduktionskaskaden aktiviert. Dabei erkennen Sensor-Proteine den Bruch und übermitteln dieses Signal an *Transducer*-Proteine. Diese verstärken wiederum das Signal und leiten es je nach Art des Schadens an Effektor-Proteine weiter (Khanna & Jackson 2001, Shiloh 2003, Su 2006).

2.3.1 Die zelluläre Erkennung von DSBs

Tritt ein DSB in der Zelle auf, wird dieser sofort von Sensorproteinen erkannt. Eines der ersten Proteine, welches aktiviert wird, ist ATM (*ataxia telangiectasia mutated*). ATM gehört zur Gruppe der Phosphatidylinositol 3-Kinase-ähnlichen Proteinkinasen (PIKK) und liegt in nichtaktiviertem Zustand als Dimer vor (Falck et al. 2005, You et al. 2005). Es wird durch Autophosphorylierung aktiviert, wodurch die Dimere voneinander dissoziieren. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob die Aktivierung von ATM durch strukturelle Veränderungen des Chromatins erfolgt, welche nach einem DSB auftreten (Bakkenist & Kastan 2003).

Die aktivierten ATM-Monomere phosphorylieren daraufhin H2AX innerhalb von ein bis drei Minuten nach Bestrahlung zu γ H2AX (Rogakou et al. 1999). H2AX ist eine Histonvariante von H2A und in Hefen, in *Drosophila*, in *Xenopus* und in Säugern hochkonserviert. Bei Säugern erfolgt die Phosphorylierung am Ser139, bei Hefen am Ser129. Dies ist dabei nicht auf den Schadensort reduziert, sondern weitete sich in Säugern über Mbp große Bereiche aus (Pilch et al. 2003). Neben H2AX phosphoryliert ATM noch weitere Downstreamprodukte wie z. B. p53 oder Chk1 und Chk2 (Checkpointkinase 1 und 2), welche für den Zellzyklusarrest und/oder die Einleitung der Apoptose zuständig sind (Kurz & Lees-Miller 2004, Niida & Nakanishi 2006).

Für die Akkumulation von ATM an den Ort des Bruches wird der MRN-Komplex benötigt. Dieser setzt sich aus MRE11, RAD50 und Nbs1 zusammen (Uziel et al. 2003, Stiff et al. 2005). Zur

Verstärkung des Schadenssignals bedarf es weiterer sogenannter Mediatoren. Hierzu gehören MDC1, 53BP1 und BRCA1, die als Gemeinsamkeit eine BRCT (*BRCA1 carboxyl terminal*)-Domäne besitzen. Weiterhin binden sie an verschiedene Komponenten, welche an der DNA-Schadensantwort beteiligt sind, und fördern deren Interaktion untereinander (Su 2006).

MDC1 bindet unmittelbar an γ H2AX und interagiert auch direkt mit dem MRN-Komplex. Die Aufrechterhaltung dieses Komplexes am Bruchort benötigt die direkte Bindung von dessen Komponente Nbs1 an MDC1. Dieser Vorgang ist für die Erkennung von γ H2AX entscheidend (Stucki et al. 2005). Daraufhin vermittelt MDC1 die Rekrutierung und Bindung von 53BP1 an den Bruch (Ward et al. 2003, Bekker-Jensen et al. 2006). Diese Ereignisse ermöglichen die Rekrutierung weiterer ATM-Moleküle, welche wiederum weitere H2A-Moleküle phosphorylieren können. Dadurch entsteht eine positive Rückkopplung und sequenzielle Rekrutierung von MDC1, dem MRN-Komplex und ATM, sodass sich das γ H2AX-Signal ausbreiten kann.

2.3.2 Mechanismen zur Reparatur von DSBs

Es gibt zwei Hauptwege für die Reparatur von DSBs: das Nichthomologe Endjoining (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR). Das NHEJ ist der Hauptreparaturmechanismus für DSBs in mehrzelligen Eukaryoten. Er beruht auf der Verknüpfung freier DNA-Enden. Besonders wichtig ist das NHEJ für die Reparatur von spontanen und IR-induzierten DSBs in der G₀- und G₁-Phase (Rothkamm et al. 2003). Es ist aber auch in der G₂-Phase für die Reparatur eines Teils der Brüche zuständig.

In niederen Eukaryoten (z. B. der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*) ist demgegenüber die HR der Hauptreparaturweg und daher in diesen Organismen sehr gut charakterisiert. In höheren Eukaryoten spielt dieser Reparaturmechanismus gegenüber dem NHEJ eine eher untergeordnetere Rolle. Während das NHEJ in allen Phasen des Zellzyklus aktiv ist, ist die HR lediglich in der späten S-Phase sowie in der G₂- und M-Phase des Zellzyklus aktiv (Takata et al. 1998, Rothkamm et al. 2003). Dies hat seinen Ursprung darin, dass in diesen Phasen des Zellzyklus zwei Chromatiden pro Chromosom vorhanden sind, und diese nahe beieinanderliegen. Dies vereinfacht wahrscheinlich die Suche nach homologen Bereichen für die Reparatur stark, was dadurch bekräftigt wird, dass Schwesterchromatiden etwa 100 Mal häufiger in den HR-Reparaturprozess involviert werden als homologe Chromosomen (Johnson & Jasin 2001). Sie sind somit das bevorzugte Template der HR (Kadyk & Hartwell 1992, Dronkert et al. 2000).

2.3.2.1 Nichthomologes Endjoining (NHEJ)

Viele Untersuchungen über das NHEJ wurden an Oozyten von *Xenopus laevis* durchgeführt (Gu et al. 1997, Labhart 1999). Das Meiste wurde jedoch an Säugerzellen erforscht (Feldmann et al.

2000, Chen et al. 2001). Das NHEJ ist ein sehr schneller Reparaturprozess. Die daran beteiligten Proteine und Enzyme erkennen DNA-Enden eher an ihrer Struktur als an ihrer Sequenz, weshalb Sequenzhomologien im NHEJ im Gegensatz zum HR-Mechanismus beim Wiederverknüpfen der DNA-Enden keine Rolle spielen (Weterings & van Gent 2004). Dadurch kann dieser Prozess bei der Wiederverknüpfung der DNA-Enden fehlerbehaftet sein (Pfeiffer et al. 2004).

Am Anfang des NHEJ-Vorgangs bindet ein Heterodimer, welches aus den Proteinuntereinheiten Ku70 (70 kDa) und Ku80 (80 kDa) besteht (Walker et al. 2001), sequenzunabhängig an die DNA-Enden (Blier et al. 1993). Anschließend fädelt es sich auf ein freies DNA-Ende und bildet einen asymmetrischen Ring um die DNA-Helix (Abb. 2.9). Dieser Ring bedeckt hierbei 16 bis 18 bp (Walker et al. 2001). Danach rekrutiert das Ku70/Ku80-Heterodimer die katalytische Untereinheit der DNA-PK an den Bruch. Es folgt eine Autophosphorylierung bestimmter Cluster von Serin- und Threoninresten (Ding et al. 2003, Reddy et al. 2004, Chen et al. 2007). Untersuchungen mittels ultraviolettem *Crosslinking* lassen vermuten, dass die daraufhin durchgeführte Konformationsänderung der katalytischen Untereinheit der DNA-PK dazu führt, dass der Ku70/Ku80-Komplex ins Innere in Richtung des intakten DNA-Strangs wandert. Hierdurch werden die DNA-Enden für die Bindung weiterer Reparaturfaktoren wie z. B. Ligase IV (LigIV) und XRCC4 frei (Yoo & Dynan 1999).

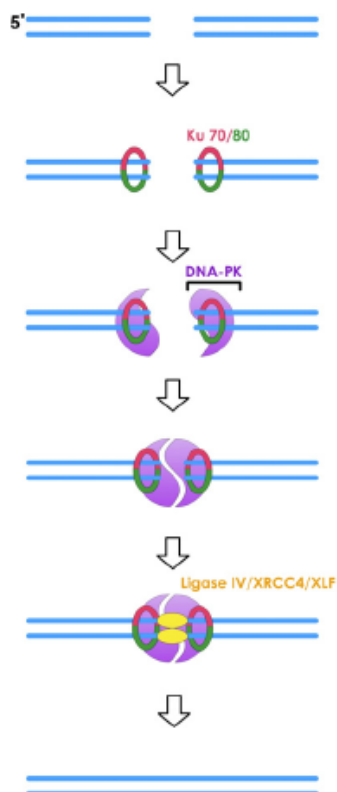


Abb. 2.9: Schematischer Ablauf des Nichtthomologen Endjoinings (NHEJ)

Beim NHEJ werden die DNA-Enden zunächst vom Ku70/Ku80-Heterodimer gebunden, welches anschließend DNA-PK_{CS}, die katalytische Untereinheit der DNA-PK, rekrutiert. Das entstandene Holoenzym, die DNA-PK, rekrutiert daraufhin den Ligase IV-Komplex, welcher aus Ligase IV, XRCC4 und Cernunnos/XLF besteht. Diese beiden Kernkomponenten des NHEJ ligieren anschließend zusammen die DNA-Enden (Quelle: Helleday et al. 2007).

DNA-PK_{CS} und Ku70/Ku80 bilden zusammen das Holoenzym DNA-PK, eine 470 kDa schwere Serin-Threonin-Kinase (Smith & Jackson 1999). Dies hat die Rekrutierung und Phosphorylierung

weiterer Reparaturfaktoren wie z.B. LigIV und dessen Kofaktor XRCC4 zur Folge (Burma et al. 2006). LigIV liegt in einem engen Komplex mit XRCC4 vor, wodurch es stabilisiert und die DNA-Ligation stimuliert wird (Calsou et al. 2003). Eine anschließende Bindung von XRCC4/LigIV an DNA-PK wird durch Kontakte von Ku70/Ku80 und Lig IV sowie DNA-PK_{CS} und XRCC4 vermittelt, sodass es zu einer stabilen Bindung zwischen diesen beiden Kernkomponenten des NHEJ kommt (Hsu et al. 2002). Der so entstehende Komplex ist für die anschließende Bruchversiegelung verantwortlich (Drouet et al. 2005).

Seit 2003 ist Cernunnos/XLF (*XRCC4-like factor*) als neuer Faktor des NHEJ bekannt, der zunächst im Zusammenhang mit einem Patienten mit novel SCID (*severe combined immunodeficiency*) beschrieben wurde (Dai et al. 2003). Die bestehende Strahlensensitivität und der Defekt in der V(D)J-Rekombination, bei welcher das NHEJ ebenfalls eine Rolle spielt, konnten mit Cernunnos/XLF in Verbindung gebracht werden. Dieses weist eine ähnliche Proteinstruktur wie XRCC4 auf und liegt im gleichen Komplex vor. Es wird vermutet, dass es im frühen NHEJ-Prozess eine Rolle spielt und zusätzlich im weiteren Verlauf Lig IV stimuliert (Buck et al. 2006, Yano et al. 2008).

Die Anwesenheit der Kernkomponenten reicht aus, um kompatible oder glatte DNA-Enden korrekt zu verbinden (van Heemst et al. 2004). Oftmals besitzen die Bruchenden jedoch zusätzliche Modifikationen, z. B. 3'-Phosphat oder Phosphoglykolat (Valerie & Povirk 2003) und/oder Basenschäden, welche die direkte Ligation verhindern. Deshalb benötigen sie vor der Ligation eine Prozessierung der Enden durch DNA-Polymerasen und/oder Nukleasen, wodurch es zu Deletionen, Insertionen oder Basenpaarsubstitutionen in der Größenordnung von einigen bp oder kbp kommt.

Es wurde gezeigt, dass für eine Unterklasse von Brüchen das Protein Artemis benötigt wird (Kuhne et al. 2004, Riballo et al. 2004). Diese Nuklease ist in die Prozessierung der Bruchenden vor der Ligation durch die bereits beschriebenen Faktoren involviert und bisher hauptsächlich dafür bekannt, in der V(D)J-Rekombination die entstehenden Haarnadelenden der Intermediate zu schneiden. Außerdem prozessiert Artemis einzelsträngige Enden mit beschädigten Basen oder Zuckern (Moshous et al. 2001, Ma et al. 2002). Artemis wurde bisher sowohl als Exo- als auch als Endonuklease beschrieben. Nach neuesten Erkenntnissen hat es aber eher eine Endonukleasefunktion (Beucher et al.). Seine Aktivierung wird mit DNA-PK in Zusammenhang gebracht (Wyman & Kanaar 2006).

Die Tatsache, dass konfluente Artemis- und ATM-defiziente Zellen einen identischen Reparaturdefekt aufweisen, der nach 90 keV-Röntgenstrahlung etwa 10% an residualen DSBs ausmacht, unterstreicht die Bedeutung der Rolle dieser Reparaturkomponenten bei der Reparatur einer Unterklasse von Brüchen (Kuhne et al. 2004, Riballo et al. 2004).

2.3.2.2 Homologe Rekombination (HR)

Die Homologe Rekombination ist im Gegensatz zum NHEJ ein fehlerfreier Reparaturprozess, der DSBs anhand der homologen Sequenzen der Schwesterchromatiden oder der homologen Chromosomen repariert. Geschädigte oder verloren gegangene Sequenzinformationen am Bruch werden bei diesem Prozess resynthetisiert. Die Faktoren der HR sind die Komponenten der Rad52-Epistasisgruppe. Dazu gehören die Homologen der *Sacharomyces cerevisiae*-Proteine Rad51, Rad52 und Rad54 sowie die Rad51-Paralogue XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C und Rad51D (Symington 2002, Thompson & Schild 2002).

Der erste Schritt der HR ist die Rekrutierung des MRN-Komplexes (Paull & Gellert 1998) (Abb. 2.10). Hierbei werden Mre11 und Nbs1 von ATM phosphoryliert, wodurch die Nukleaseaktivität von Mre11 verändert wird (Gatei et al. 2000, Costanzo et al. 2004). Mre11 ist an der anschließenden Resektion des Stranges beteiligt, hierbei gibt es jedoch auch andere Nukleasen (Trujillo et al. 1998, Gravel et al. 2008). Die dadurch entstehenden einzelsträngigen Bereiche werden anschließend mit RPA (*human single strand binding protein*) besetzt, um sie zu stabilisieren. Daraufhin wird RPA durch die Rekombinase Rad51, dem RecA-Homolog aus *E.coli*, ersetzt, was wiederum von BRCA2 unterstützt wird (Baumann et al. 1996, Davies et al. 2001, Shivji & Venkitaraman 2004).

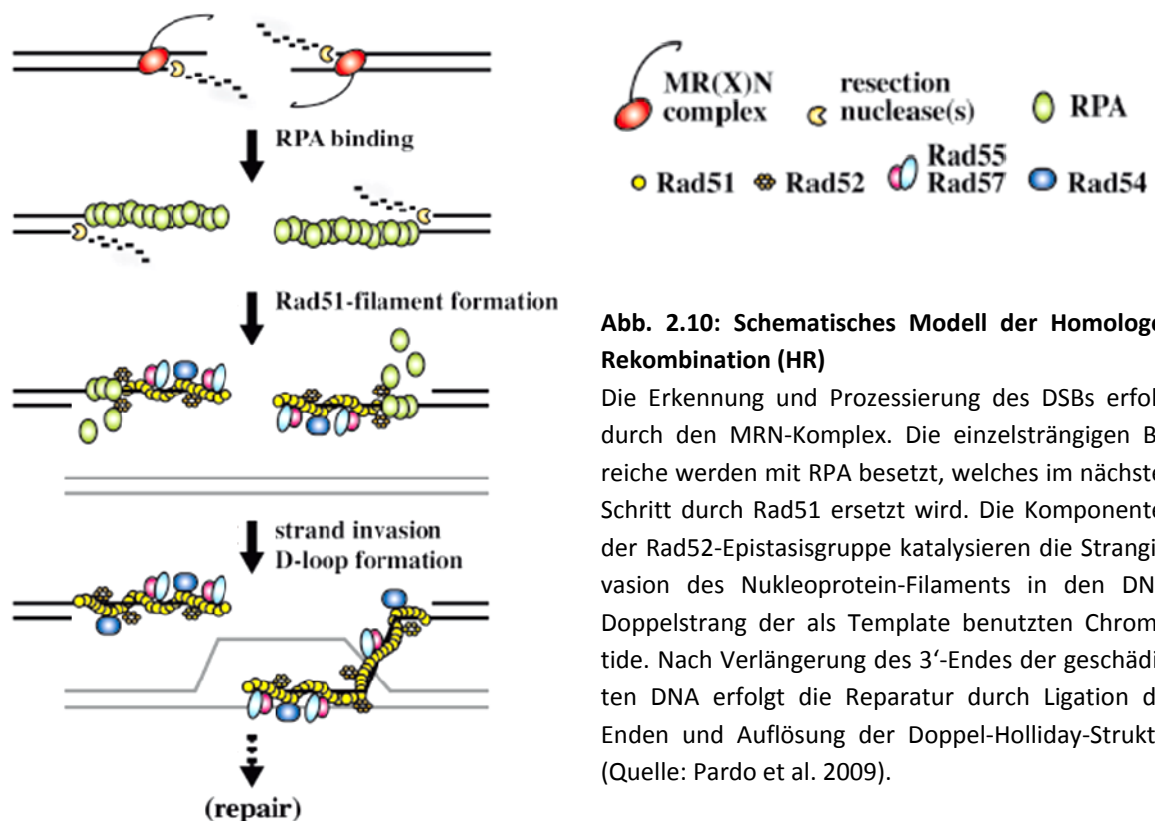


Abb. 2.10: Schematisches Modell der Homologen Rekombination (HR)

Die Erkennung und Prozessierung des DSBs erfolgt durch den MRN-Komplex. Die einzelsträngigen Bereiche werden mit RPA besetzt, welches im nächsten Schritt durch Rad51 ersetzt wird. Die Komponenten der Rad52-Epistasisgruppe katalysieren die Stranginvasion des Nukleoprotein-Filaments in den DNA-Doppelstrang der als Template benutzten Chromatide. Nach Verlängerung des 3'-Endes der geschädigten DNA erfolgt die Reparatur durch Ligation der Enden und Auflösung der Doppel-Holliday-Struktur (Quelle: Pardo et al. 2009).

Rad51 funktioniert als langes helikales Polymer, welches sich um die DNA windet und so ein Nukleoprotein-Filament bildet (Benson et al. 1994). Die Komponenten der Rad52-Epistasis-

gruppe katalysieren die Homologiesuche und anschließende Stranginversion des Nukleoprotein-Filaments in den DNA-Doppelstrang der Chromatide, welche als Template benutzt wird (West 2003). Hierbei wird das 3'-Ende der geschädigten DNA anhand des als Matrize fungierenden ungeschädigten Strangs durch die DNA-Polymerase η verlängert (McIlwraith et al. 2005). Nach der Ligation durch Ligase I wandert der Strang zurück zum eigentlichen Chromosom, und es erfolgt die Auflösung der entstandenen Doppel-Holliday-Struktur. Hierbei kann es bei inkorrekt er Auflösung zu *Crossover*-Ereignissen kommen.

Die Mechanismen zur Auflösung der Struktur sind im Gegensatz zu *E.coli* bei Eukaryoten noch weniger gut verstanden, schließen aber die RecQ-Familie der 3'- zu 5'-Helikasen (Mohaghegh et al. 2001) mit Mitgliedern wie z. B. BLM (Bloom-Syndrom) und WRN (Werner-Syndrom) mit ein (Constantinou et al. 2002, Saintigny et al. 2002, Heyer et al. 2003, Rao et al. 2005).

2.4 Charakterisierung verwendeter Mausstämme

Mäuse besitzen aufgrund der Tatsache, dass sie Säugetiere sind, ähnliche DNA-Reparaturmechanismen wie der Mensch. Es gibt Knockout-Mäuse für viele Komponenten der DNA-Schadensantwort. Diese sind auch bei Defekten in wichtigen Komponenten der DNA-Reparatur im Gegensatz zum Menschen oft noch lebensfähig. Dadurch ließen sich bisher in der wissenschaftlichen Analyse der Reparaturwege wie NHEJ und HR aus diesen Mäusen wertvolle Erkenntnisse über die Art der Komponenten und deren Reihenfolge im Ablauf des Reparaturvorgangs gewinnen (Fulop & Phillips 1990, Biedermann et al. 1991, Gu et al. 1997, Stewart et al. 1999, Arrington et al. 2000, Rooney et al. 2003).

2.4.1 SCID- und BALB/c-Mäuse

Der schwere kombinierte Immundefekt (*severe combined immunodeficiency*, kurz: *scid*) ist eine seltene Erbkrankheit, welche zum ersten Mal bei Kindern in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts beobachtet wurde (Glanzmann & Riniker 1950, Hitzig et al. 1958). In Mäusen wurde dieser Defekt 1983 beschrieben (Bosma et al. 1983). Die SCID-Maus war die erste Mausmutante mit einem Defekt in einer der Kernkomponenten des NHEJ. Sie zeichnet sich durch eine eingeschränkte Ausreifung der B- und T-Lymphozyten aus. Diese basiert auf einem Defekt in der V(D)J-Rekombination, einem Prozess zur Ausdifferenzierung und Bildung von Immunglobulinen, die von den B-Lymphozyten hergestellt werden, und zur Bildung von T-Zellrezeptoren. Menschen und Mäuse, deren Ablauf der V(D)J-Rekombination gestört ist, entwickeln einen schweren kombinierten Immundefekt.

Die SCID-Maus trägt eine spontane Mutation im *Prkdc*-Gen, welches für die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PK_{CS}) kodiert. Dies resultiert in einer Deletion von 83 Carboxy-terminalen Aminosäuren des DNA-PK_{CS}-Proteins (Schuler & Bosma 1989). Das für die DNA-PK_{CS} kodie-

rende Gen wurde beim Menschen auf Chromosom 8q11 lokalisiert (Kirchgessner et al. 1995, Siple et al. 1995), bei der Maus auf Chromosom 16 (Bosma et al. 1989). Die DNA-PK ist eine der Kernkomponenten des NHEJ, welches neben strahleninduzierten DSBs auch während der V(D)J-Rekombination gezielt induzierte DSBs repariert (Karran 2000).

Die V(D)J-Rekombination ist ein Prozess im Zuge der Entwicklung des adaptiven Immunsystems, bei dem die unterschiedlichen DNA-Abschnitte der Gene für die leichten und schweren Ketten der Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren zufällig miteinander kombiniert werden. Hierfür müssen Gensegmente, welche für die *Variable (V)*-, *Diversity (D)*- und *Joining (J)*-Segmente der Ketten kodieren, umgruppiert und die dazwischen liegenden nicht-kodierenden Signalsequenzen entfernt werden. Dazu schneiden die Proteine RAG 1 und RAG 2 (Rekombinase-aktivierende Gene) die DNA an bestimmten Punkten ein (Abb. 2.11). Die stumpfen Bruchenden der nicht-kodierenden Zwischensequenzen (*signal ends*) werden verknüpft, sodass Ringstrukturen entstehen, welche dem Genom verloren gehen.

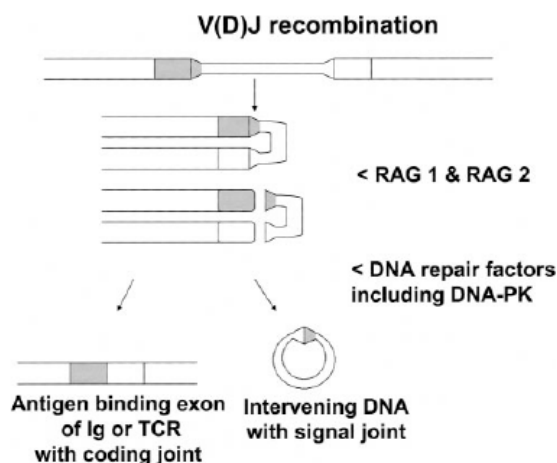


Abb. 2.11: Die V(D)J-Rekombination.

Bei der V(D)J-Rekombination nehmen die Genprodukte der Rekombinase-aktivierenden Gene, RAG 1 und RAG 2, eine entscheidende Rolle beim Schneiden der DNA an bestimmten Punkten für die anschließende Umlagerung ein. Dabei werden stumpfe Enden, die *signal ends*, und die Enden der kodierenden Sequenzen für die Immunglobulin- oder T-Zellrezeptoren (*coding ends*) gebildet. DNA-PK ist zusammen mit anderen Reparaturfaktoren für die Bildung eines Exons durch Wiederverknüpfen der Enden verantwortlich (Quelle: Perryman 2004).

An den Enden der kodierenden Sequenzen werden Haarnadelstrukturen gebildet, die vor der Ligation dieser Segmente von der Nuklease Artemis geöffnet werden. Die anschließende Verknüpfung der DNA-Enden erfolgt durch die Kernkomponenten des NHEJ. In diesem Zusammenhang spielt die DNA-PK eine essentielle Rolle bei der Bildung eines Exons durch Wiederverknüpfung der *coding ends* (Lewis 1994, Gellert 2002, Perryman 2004).

DNA-PK_{CS}-defiziente Mäuse sind immundefizient, da zwar die Bildung des *signal joints* normal ablaufen kann, die des *coding joints* und damit die Wiederverknüpfung der kodierenden Sequenzen jedoch beeinträchtigt ist (Lieber et al. 1988, Blackwell et al. 1989). Es wurde weiterhin beobachtet, dass SCID-Mäuse nach Bestrahlung lymphoide Tumore der T-Zellen entwickeln, was auf eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit hindeutet (Lieberman et al. 1992). Dies wird von Daten aus Überlebensexperimenten mit murinen Knochenmarkszellen gestützt. Diese zeigten ebenfalls, dass diese Zellen eine hohe Strahlenempfindlichkeit aufweisen. Reparaturstudien mit murinen Fibroblasten wiesen darüber hinaus nach, dass SCID-Mäuse

einen starken DSB-Reparaturdefekt besitzen (Fulop & Phillips 1990, Biedermann et al. 1991). Letztendlich konnten bereits frühere Studien belegen, dass SCID-Zellen zwar ein funktionelles Ku-Protein, aber keine funktionelle DNA-PK_{CS} besitzen, wodurch die DNA-PK-Aktivität stark eingeschränkt ist (Blunt et al. 1996, Araki et al. 1997). Dies verstärkt das Bild, dass DNA-PK_{CS} wichtig für eine uneingeschränkte Funktion der DNA-PK ist, welche wiederum eine hohe Bedeutung für die Reparatur von strahleninduzierten DSBs besitzt.

BALB/c-Mäuse entwickeln eine Reihe von unterschiedlichen spontanen sowie strahleninduzierten soliden Tumoren (Storer et al. 1988). Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigen sie nach IR eine erhöhte Apoptoserate (Mori et al. 1992) sowie eine stärkere Neigung zur Entwicklung von Lymphomen (Okumoto et al. 1989, Okumoto et al. 1995). Allerdings besitzen BALB/c-Mäuse ein normal entwickeltes Immunsystem und werden daher in Studien mit SCID-Mäusen häufig als Vergleichsmäuse herangezogen (Fulop & Phillips 1990, Biedermann et al. 1991, Araki et al. 1997).

In Bezug auf die Reparaturfähigkeit von DSBs hat eine Studie ergeben, dass bei BALB/c-Mäusen ein partieller Defekt in der Expression von *Prkdc* vorliegt, sodass DNA-PK_{CS} nur in verminderter Menge gebildet werden kann (Okayasu et al. 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Mutation im *Prkdc*-Gen bei diesem Mausstamm anders gestaltet ist als bei SCID-Mäusen. Es liegen hierbei zwei unterschiedliche Polymorphismen in der kodierenden Sequenz vor, welche jeweils einen Austausch von zwei Aminosäuren zur Folge haben. Dies trägt neben einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit zusätzlich zu einer genomischen Instabilität in präneoplastischen Brustepithelien bei, sodass weibliche BALB/c-Mäuse empfindlich gegenüber der strahleninduzierten Entstehung von Brustkrebs sind (Yu et al. 2001). Beim Auftreten einer großen Anzahl strahleninduzierter DSBs führt dies zu einer leicht verminderten Reparaturkapazität in Form einer verlangsamten Reparatur (Rube et al. 2008b). Dies schlägt sich letztlich auch in einer erhöhten Strahlensensitivität nieder. Die verminderte Expression ist jedoch ausreichend, um die in der V(D)J Rekombination entstehenden DSBs zu reparieren, da dort im Gegensatz zu IR verhältnismäßig wenige DSBs erzeugt werden (Kienker et al. 2000).

2.4.2 A-T-Mäuse

Ataxia Telangiectasia (A-T) ist eine seltene autosomal rezessive neurodegenerative Erkrankung. Sie geht beim Menschen mit einer gesteigerten Strahlensensitivität einher und ist durch eine zerebrale Ataxie, eine Immundefizienz sowie eine Prädisposition für maligne Erkrankungen (speziell Lymphome) charakterisiert (Swift 1990). Das Krankheitsbild wurde in den 1970er Jahren entdeckt, als man beobachtete, dass Fibroblasten von Patienten mit A-T sensitiv gegenüber Strahlung waren, was mit der beobachteten Strahlensensitivität der Patienten korrelierte (Taylor 1978).

Betroffen ist bei diesem Defekt ein Gen für das Protein ATM auf Chromosom 11q22-23 (Gatti et al. 1988). Die Kinase-Domäne des Proteins ist in Richtung des C-Terminus lokalisiert. Eine Mutation in diesem Bereich inaktiviert die Kinase und führt zu A-T (Abraham 2001). A-T-Mäuse weisen ähnliche Symptome auf wie Menschen. Sie sind ebenfalls immundefizient, zeigen schwere Defekte in der Ausdifferenzierung von T-Zellen und eine Prädisposition für Tumore, welche die T-Zellen betreffen (Barlow et al. 1996, Elson et al. 1996, Xu et al. 1996).

Die Schwere und Vielfältigkeit der Symptomatik lässt sich durch die zentrale Rolle von ATM bei der DSB-Erkennung erklären. Untersuchungen an primären Zellen, die von ATM-defizienten Mäusen generiert wurden, zeigten, dass diese nicht in der Lage sind einen Teil der IR-induzierten DSBs zu reparieren (Kato et al. 2006). Studien, die ATM-defiziente humane Fibroblasten untersuchten, führten dies auf eine Rolle von ATM bei der Reparatur komplexer DSBs zurück (Kuhne et al. 2004, Riballo et al. 2004). Auch wurde ATM in einen Zusammenhang mit der Reparatur von Heterochromatin-assoziierten DSBs gebracht (Goodarzi et al. 2008).

Eine weitere Ursache für die Strahlenempfindlichkeit von A-T-Mäusen ist in der wichtigen Rolle von ATM bei der Regulation des Zellzyklus zu suchen. Die in der Schadensantwort aktivierten ATM-Monomere phosphorylieren u. a. p53 und die Checkpoint-Kinase Chk2 (Banin et al. 1998, Canman et al. 1998, Melchionna et al. 2000). Ein Defekt im ATM-Protein führt somit dazu, dass Checkpoints nicht aktiviert werden und Zellen mit unreparierten DSBs proliferieren (Kastan et al. 1992, el-Deiry et al. 1993, Harper et al. 1993), denn A-T-Zellen sind nicht in der Lage, den G1/S- und den G2/M-Checkpoint zu aktivieren sowie den Intra-S-Checkpoint richtig zu regulieren. Letzteres führt zum sogenannten RDS (*radioresistent DNA synthesis*)-Phänotyp, bei welchem trotz DNA-Schäden in der S-Phase die DNA-Synthese nicht gestoppt wird. Dies hat weitere DNA-Schäden zur Folge (Falck et al. 2002).

2.5 Krebsrisiko im Niedrigdosisbereich

Ungefähr 1% aller Zellen im menschlichen Organismus wird jeden Tag von ionisierenden Teilchen und Strahlung, welche aus dem Weltall kommen, getroffen. Zusätzlich sind Menschen der Strahlung radioaktiver Stoffe, welche natürlich in der Erdkruste auftreten, ausgesetzt. Man spricht hierbei von der sogenannten ‚natürlichen Hintergrundstrahlung‘. Die Dosis der natürlichen Hintergrundstrahlung beträgt auf der Erde ca. 0,01 mSv pro Tag. Astronauten erhalten demgegenüber auf einer Raumstation eine etwa zehnmal höhere Dosis von 1 mSv pro Tag (Lyndon 2002) (weitere Beispiele für applizierte Dosen sind in Tabelle 2.1 angegeben). Durch Hintergrundstrahlung werden ROS erzeugt, welche per Zufallsprinzip Zellbestandteile schädigen, darunter auch die DNA (Riley 1994).

Es ist allgemein bekannt, dass hohe Dosen ab 150 mSv an IR die Entstehung von Krebs fördern (NCRP 1991). Die Strahlung im Bereich zwischen der natürlichen Hintergrundstrahlung und

hohen Dosen an IR wird als Niedrigdosisstrahlung bezeichnet. Deren Wirkung auf den Organismus ist noch weitgehend unbekannt, obwohl besonders für den Strahlenschutz die Frage wichtig ist, ob auch kleinste Strahlendosen als potenziell krebserregend einzustufen sind.

Tab. 2.1: Angaben der durchschnittlich absorbierten Dosis an IR für verschiedene Gegebenheiten

Da der Strahlungsart-abhängige w_R für Röntgen- und γ -Strahlung = 1 ist, gilt, dass 1 mSv = 1 mGy. Außer bei den mit * gekennzeichneten medizinischen Untersuchungen, die nur Teilkörperbestrahlungen betreffen, ist eine Ganzkörperdosis angegeben (Quelle: Brenner et al. 2003). Die Angaben können geringfügig von anderen Quellen abweichen.

Gegebenheit	Durchschnittlich applizierte Dosis [mSv]
Natürliche Hintergrundstrahlung	Ca. 3/Jahr
Transatlantikflug (Hin- und Zurück)	0,1
Mammographieuntersuchung*	3
Thorax-Computertomographieuntersuchung*	ca. 10
Expositionslimit von Nukleararbeitern (ICRP 1991)	20/Jahr
Atombombenüberlebende (mittlere Dosis in der LSS-Kohorte, Preston 2003)	200

Die heutigen Erkenntnisse zu den Auswirkungen von Niedrigdosen beruhen in erster Linie auf den Ergebnissen epidemiologischer Studien. Die größte Studie zur Wirkung von Dosen unter 500 mSv wurde an 50.000 Überlebenden der Atombombenabwürfe von Hiroshima und Nagasaki/Japan durchgeführt. Die mittlere Dosis bei dieser Gruppe lag bei 200 mSv, bei über 50% der exponierten Individuen wurden Dosen von unter 50 mSv appliziert. Die Kategorie der Individuen mit Dosen von 5 mSv bis 125 mSv zeigte hierbei eine signifikante Steigung der Krebssterblichkeit durch solide Tumoren (Pierce & Preston 2000, Preston 2003). Insgesamt wurde in dieser Kohorte u. a. das Auftreten von 7.000 soliden Tumoren über eine Zeitspanne von 47 Jahren untersucht.

Die Überlebenden der Atombombenabwürfe auf Hiroshima und Nagasaki dienten bisher als Hauptquelle für die Risikoabschätzung von Strahlendosen und die Festlegung eines Standards von Grenzwerten für Menschen, die berufs- oder umweltbedingt Strahlung ausgesetzt sind (CBEIR 1990, ICRP 1991). Diese sowie weitere Studien kamen zu der Schlussfolgerung, dass für Röntgen- und γ -Strahlen bei einer akuten Dosis von über 50 mSv sichere Beweise für ein erhöhtes Krebsrisiko existieren. Unterhalb dieser Dosen konnten bisher keine sicheren Aussagen getroffen werden.

Neben der Dosis spielt für die Risikoabschätzung auch die Dosisleistung, also die innerhalb einer definierten Zeitspanne abgegebenen Dosis, eine Rolle. Bei niedrigen Dosisleistungen und niedrigen Dosen liegt die derzeit gültige Abschätzung des Risikofaktors für die Zunahme der Krebsmortalität bei 5% pro Sv. Bei hohen Dosisleistungen und hohen Dosen liegt sie bei 10%. Das Krebsmortalitätsrisiko der Bevölkerung (Lebenszeitrisiko) ohne zusätzliche Strahlenexposition beträgt in Deutschland derzeit 25%.

Generell ist es schwierig, Tumorfrequenzen nach Bestrahlung mit Niedrigdosen epidemiologisch zu messen. Ein limitierender Faktor ist die benötigte Anzahl an exponierten Individuen. Da die gemessenen Effekte aufgrund der niedrigen applizierten Dosen sehr klein sind, wird eine relativ hohe Anzahl an zu untersuchenden Individuen benötigt, um statistisch signifikante Resultate zu erhalten. Weiterhin ist es oftmals schwierig, eine geeignete Kontrollgruppe zu finden, die den zu untersuchenden Parametern nicht ausgesetzt ist. Außerdem beträgt die Latenzzeit bis zum Auftreten eines strahleninduzierten soliden Tumors mehrere Jahrzehnte (CBEIR 1990). Während dieser Zeit ist ein Individuum vielen verschiedenen Umweltfaktoren ausgesetzt, die ebenfalls zu malignen Veränderungen führen können.

Die Strahlendosis, welcher man berufs-, medizinisch- oder nur umweltbedingt ausgesetzt ist, ist geringer als die Dosis, welche nach den Atombombenabwürfen auftrat. Aus diesem Grund ist es nötig, die zuverlässigen Daten von höheren Dosen auf niedrige Dosen zu extrapolieren. Das führende Modell für die Abschätzung des Krebsrisikos ist bis heute das *linear no-threshold*-Modell (LNT) (Brenner et al. 2003, Preston 2003) (Abb. 2.12).

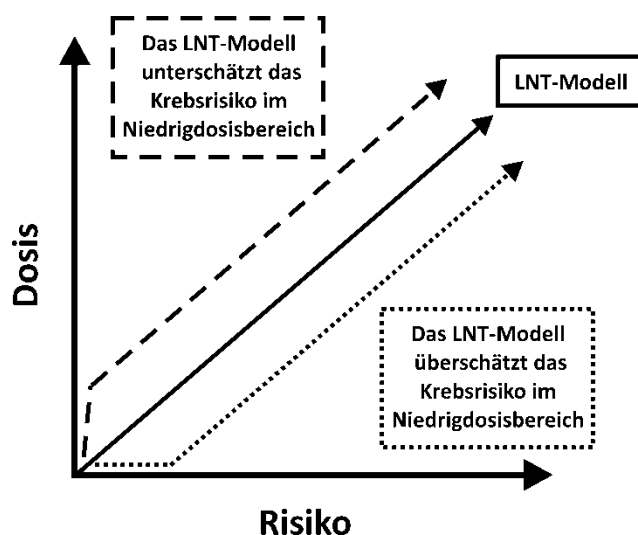


Abb. 2.12: Schematische Darstellung des linear no-threshold-Modells (LNT-Modell)

Das LNT-Modell nimmt eine lineare Beziehung zwischen Dosis und Krebsrisiko an, sodass jede Dosis potenziell krebserregend ist. Verschiedene Phänomene wie Hormesis, *Adaptive Response*, *Bystander-Effekt* oder *Low-dose hyper-radiosensitivity* lassen jedoch auch Modelle zu, nach welchen das LNT-Modell das tatsächliche Krebsrisiko über- oder unterschätzt (nach Brenner et al. 2003).

Dieses Modell geht davon aus, dass das Krebsrisiko linear mit der Dosis ansteigt und keinen Schwellenwert besitzt. Diesem Modell folgend müsste auch die niedrigste Dosis als potentiell krebserregend gelten. Epidemiologische Studien zur Überprüfung dieses Modells kamen jedoch teilweise zu recht unterschiedlichen Ergebnissen. So wertete z. B. eine neue Studie u. a. die Bildung der fünf wichtigsten Tumoren der Atombombenüberlebenden mit applizierten Dosen

von 20 mSv aus und berücksichtigte dabei eine Latenzzeit von 5 Jahren nach Bestrahlung (Dropkin 2007). Das Ergebnis war ein über das auf der Grundlage des LNT-Modells zu erwartende Maß hinausgehende Auftreten von Tumoren, sodass nach dieser Studie das Krebsrisiko bei Dosen von 20 mSv von dem LNT-Modell unterschätzt worden wäre.

Andererseits weisen beobachtete Phänomene darauf hin, dass es einen Dosiswellenwert geben könnte, unter welchem kein Krebsrisiko besteht. Während man früher davon ausging, dass nur direkt von Strahlung getroffene Zellen eine Strahlenantwort zeigen, häufen sich die Beobachtungen, dass auch nicht direkt betroffene Zellen ein adaptives Verhalten zeigen oder strahleninduzierte Schäden nach Niedrigdosen aufweisen. Dies bezeichnet man als *Non-targeted-Effect*. Zu diesen *Non-targeted-Effects* gehört u. a. *Adaptive Response* (AR). Das Prinzip von AR ist, dass durch die Administration einer niedrigen „*priming*“ oder „*conditioning dose*“ im Bereich von 10 bis 500 mGy eine adaptive Wirkung erreicht wird. Diese vermindert die schädigende Wirkung einer darauffolgenden höheren „*challenging dose*“ bei allen Zellen, z. B. in Form einer verbesserten DSB-Reparatur (Tapio & Jacob 2007). Dieses Phänomen wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* für Hoch- (Gajendiran et al. 2001, Sawant et al. 2001) und für Niedrig-LET-Strahlung (Shadley & Wiencke 1989, Azzam et al. 1994) nachgewiesen. Die hierbei verwendeten Untersuchungsmethoden schlossen u. a. Tierüberlebensexperimente (Yonezawa et al. 1990, Ito et al. 2007), Messung chromosomaler Aberrationen (Shadley & Wiencke 1989, Wolff 1998), Bildung von Mikrokernen (Shadley & Wiencke 1989, Azzam et al. 1994, Wolff 1998, Venkat et al. 2001) sowie DSB-Reparaturmessungen mit ein (Gajendiran et al. 2001).

Ein anderes Prinzip, die Hormesis, geht ebenfalls von einer adaptiven Reaktion des Organismus bei Dosen unter 100 mGy aus, die sich in einer verbesserten Reparatur oder Verhinderung von DNA-Schäden äußert. Der Unterschied zu *Adaptive Response* ist hierbei, dass dieser Schutzeffekt je nach Organismus, Zelltyp oder genetischer Konstitution das Krebsrisiko nach Bestrahlung sogar unter das Niveau des normalen Risikos verringert (Feinendegen 2005). Experimentelle und epidemiologische Studien stützen diese Theorie und sagen eine geringere Krebswahrscheinlichkeit nach niedrigeren Dosen voraus, als man durch lineare Extrapolation bei hohen Dosen entsprechend dem LET-Modell erwarten würde. Ein Beispiel hierfür sind die als „*healthy workers*“ bekannt gewordenen Nukleararbeiter, welche arbeitsbedingt einem kleinen Vielfachen der natürlichen Hintergrundstrahlung ausgesetzt sind. Die Krebsmortalität dieser Arbeiter erwies sich als 15 bis 20% geringer als die in der allgemeinen Bevölkerung (Kendall et al. 1992).

Nach Applikation von Niedrigdosen wurden jedoch auch gegenteilige Beobachtungen gemacht, die ein gesteigertes Krebsrisiko in diesem Dosisbereich vermuten lassen. Hierzu gehört beispielsweise der *Bystander-Effekt*, ein adaptiver Effekt, welcher ebenfalls zu den *Non-targeted-Effects* zählt. Hierbei zeigen nicht von Strahlung betroffene Zellen z. B. via Kommunikation über *Gap-junctions* (Zell-Zell-Kanäle) mit anderen Zellen (Azzam et al. 2001, Shao et al. 2003) eben-

falls strahleninduzierte Antworten u. a. in Form von γ H2AX-Foci (Hu et al. 2006), Mikrokernen (Prise et al. 1998, Shao et al. 2003) oder Genmutationen (Zhou et al. 2000). Dieser Effekt scheint vornehmlich nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen niederenergetischer Röntgen- oder γ -Strahlung (Seymour & Mothersill 2000) oder hochenergetischer α -Strahlung (Zhou et al. 2000, Little et al. 2002) aufzutreten.

Ein weiteres Phänomen beschreibt den Umstand, dass Zellen in der G2-Phase bei niedrigen Dosen eine über das zu erwartende Maß hinaus gesteigerte Sensitivität aufzeigen - das sogenannte *Low-dose hyper-radiosensitivity*. Dieses Phänomen zählt ebenfalls zu den *Non-targeted-Effects*. In Überlebensexperimenten wurde hierbei beobachtet, dass Säugerzellen, die sich in der G2-Phase des Zellzyklus befinden (Marples et al. 2003), besonders sensitiv auf akute Dosen unterhalb von 200 bis 300 mGy reagieren (Joiner et al. 2001). Neueren Erkenntnissen zufolge ist dies auf ein ineffizientes Einsetzen des G2/M-Checkpoints zurückzuführen (Marples et al. 2003, Marples 2004, Wykes et al. 2006).

Bis heute ist nicht geklärt, wie sich die Dosis-Effekt-Kurve im Niedrigdosisbereich verhält. Aufgrund der gesteigerten Strahlenexposition in der medizinischen Diagnostik, bei bemannten Raumflügen, durch den beruflichen Kontakt mit Strahlung in Kernkraftwerken und bei der Beseitigung von radioaktiven Abfallprodukten ist es daher weiterhin von großem Interesse, zusätzliche Erkenntnisse über die Reaktion von Zellen und Organismen auf niedrige Strahlendosen zu erlangen.

2.6 DNA-Schäden und –Reparatur im Zusammenhang mit Zellalterung

Zellen sind ständig DNA-schädigenden Agenzien ausgesetzt. Zusätzlich häufen sich mit zunehmendem Alter Mutationen an, die zur Entartung oder Inaktivierung von Genen führen, die für das Überleben essentiell sind. Um diesen Effekten vorzubeugen, haben Zellen eine ausgeklügelte DNA-Reparaturmaschinerie und andere Mechanismen entwickelt.

Das Altern eines Organismus zeichnet sich u. a. dadurch aus, dass Zellen die Teilung einstellen und somit die Regenerationsfähigkeit der Gewebe eingeschränkt ist. Dieser Proliferationsstopp kann verschiedene Ursachen haben. Eine Ursache liegt darin, dass die Telomere sich in den meisten humanen Zellen mit der steigenden Anzahl an Replikationen durch das Fehlen des Enzyms Telomerase immer weiter verkürzen. Die Verkürzung der Telomere führt wiederum zur Aktivierung von Signalkaskaden, welche die Zelle in einen Ruhezustand übergehen lässt. Ein anderer Grund ist, dass durch oxidativen Stress verursachte DNA-Schäden in den Telomerregionen weniger effektiv repariert werden wie im restlichen Genom, was ebenfalls zu einem Verlust an DNA in diesen Regionen führt (von Zglinicki 2002).

Ein weiterer Punkt, der eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem Aspekt des Alterns spielt, ist eine mögliche Defizienz in der DNA-Reparatur. Diese kann zu einem erhöhten Level an

somatischen DNA-Schädigungen führen, welche wiederum in verschiedenen Endpunkten gipfeln. Dabei kann es zu Mutationen oder aufgrund einer fehleranfälligen Reparatur oder Replikation zu Problemen in der Transkription kommen.

Untersuchungen zum gehäuften Auftreten von Mutationen wurden bisher sowohl an Menschen als auch an Mäusen durchgeführt (Dempsey et al. 1993, Finette et al. 1994). Studien an Herzzellen gealterter Mäuse ergaben, dass Mutationen zu einer veränderten Genexpression führen (Bahar et al. 2006). Dabei fiel unter der Vielzahl an auftretenden Mutationen ein spezieller Mutationstyp, die genomische Umlagerung auf (Vijg & Dolle 2002). Diese entsteht durch misreparierte DSBs, sodass die Frage nahe liegt, ob das gehäufte Auftreten von Mutationen eventuell von einer weniger effizient und dadurch fehlerbehafteter arbeitenden Reparaturmaschinerie herrührt (Gorbunova et al. 2007). Gestützt wird diese Vermutung durch Studien, welche sich mit der Veränderung der DNA-Reparatur in Abhängigkeit vom Alter der Zellen beschäftigten. Diese beobachteten einen altersabhängigen Rückgang der Reparaturreffizienz (Mayer et al. 1989, Seluanov et al. 2004). Auch konnte außerdem beobachtet werden, dass γ H2AX-Foci in humanen und murinen Zellen älterer Spender akkumulieren (Sedelnikova et al. 2008). Da DSBs über HR und NHEJ repariert werden, ist die Erforschung dieser beiden Reparaturwege in Bezug auf die altersabhängige Reparatur von besonderem Interesse. Hierzu gibt es bereits erste Hinweise, die belegen, dass die NHEJ-Effizienz im Alter in bestimmten Zelltypen reduziert ist. Dies wurde an Neuronen im Gehirn untersucht (Vyjayanti & Rao 2006). In gealterten Fibroblasten konnte eine 4,5-fache Reduktion der NHEJ-Effizienz beobachtet werden (Seluanov et al. 2004).

Neben einer verminderten Effizienz verschiedener Reparaturwege wird auch eine altersabhängige anteilmäßige Verlagerung der von der Zelle genutzten Reparaturwege diskutiert. So wurde in alternden Drosophila-Fliegen beobachtet, dass HR-h, eine Form der Homologen Rekombination, welche ausschließlich das homologe Chromosom und nicht die Schwesterchromatide als Template für die Reparatur benutzt, zum dominierenden Reparaturweg wurde, während NHEJ und SSA (*single strand annealing*) hierin weniger häufig genutzt wurden als bei jüngeren Fliegen (Preston et al. 2006).

Ebenfalls diskutiert wurde die Akkumulation von Mutationen in mitochondrieller DNA als Folge von ROS, die im Alter vermehrt von Mitochondrien gebildet werden und die Langlebigkeit höherer Wirbeltiere einschränkt (Barja 2004).

Allgemein können diese durch fehlerhafte DNA-Reparatur verursachten somatischen DNA-Schädigungen zum Zelltod durch Apoptose, zu Zellveränderungen (in Form von Krebs im Alter) und zu Zellalterung (definiert als Zellen, die sich in verschiedenen Stadien der Dysfunktion befinden) führen. Diese Endpunkte markieren die Hauptkomponenten des sogenannten „alternden Phänotyps“ (Vijg 2000) und können neben der Dysfunktion der Telomere und dem

epigenetischen Ausschalten von Genen im Alter Gründe für das gehäufte Auftreten von Krebserkrankungen des Organismus sein (DePinho 2000).

2.7 Nachweisverfahren von DSBs

Zum Nachweis von DSBs haben sich in den vergangenen Jahrzehnten einige nachfolgend vorgestellte Verfahren etabliert. Diese beruhen auf unterschiedlichen Messprinzipien und sind im Nachweis von DSBs unterschiedlich sensitiv.

2.7.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM)

Seit mittlerweile einem Jahrzehnt wird γ H2AX als Marker für DSBs herangezogen (Rogakou et al. 1998). Hierbei macht man sich den Umstand zunutze, dass das Histon H2AX, eine Unterform von H2A, nach Auftreten eines DSBs im Bereich von mehreren Mbp um den Bruch herum zu γ H2AX phosphoryliert wird. Dieser DSB-Marker kann innerhalb weniger Minuten mit Hilfe von Fluoreszenzantikörpern mit der Technik der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM) in Form von deutlich sichtbaren Foci detektiert werden. Die maximale Ausprägung der Foci wird hierbei nach 10 bis 30 min erreicht.

Foci, die nach IR oder radiomimetrischen Substanzen entstehen, werden als IRIFs (*ionizing radiation induced foci*) bezeichnet (Shiloh 2003). Als Folge eines auftretenden DSBs werden auch noch zahlreiche weitere Proteine an die Bruchstelle rekrutiert. Zu den Proteinen, die zeitlich als erste an die Bruchstelle rekrutiert werden und dort in großer Zahl auftreten, gehören solche, die in die Schadenserkenkung und in die Aktivierung der Zellzyklus-Checkpoints involviert sind. Hierzu gehören in erster Linie die Komponenten des MRN-Komplexes, ATM, MDC1, 53BP1 und BRCA1 (Nelms et al. 1998, Kitagawa et al. 2004, Stucki & Jackson 2004, Bekker-Jensen et al. 2006, Schlegel et al. 2006). Die genannten Proteine kolokalisieren mit γ H2AX, da sie im gleichen Chromatinbereich akkumulieren und können während des gesamten Zellzyklus nachgewiesen werden (Bekker-Jensen et al. 2006).

Eine andere Gruppe von Proteinen sammelt sich nur in kleinen Bereichen innerhalb des Chromatinbereiches an, welcher γ H2AX-phosphoryliert ist. Hierzu gehören vor allem Proteine, welche erst später nach Bestrahlung durch die Entstehung einzelsträngiger DNA-Bereiche bei der Resektion induziert werden (z. B. während des HR-Reparaturprozesses) oder an der Entstehung und Stabilisierung dieser beteiligt sind. Dies sind z. B. Rad51, pRPA und ATR. Die von diesen Proteinen gebildeten „Microfoci“ treten aufgrund der Assoziation mit dem HR-Prozess nur in der S- und G2-Phase auf (Adams et al. 2006, Bekker-Jensen et al. 2006, Schlegel et al. 2006). Die Komponenten des MRN-Komplexes finden sich ebenfalls an einzelsträngigen Bereichen ein, was mit der Beobachtung einhergeht, dass der MRN-Komplex eine Rolle an der Entstehung einzelsträngiger Bereiche innehat (Jazayeri et al. 2006). Proteine wie z. B. Ku70/80, DNA-PK oder

Lig IV liegen am Ort eines DSBs in so geringer Anzahl vor, dass diese nicht mit dieser Methode nachgewiesen werden können.

Ein weiterer Vorteil der IFM ist, dass auf Einzelzellebene einzelne DSBs nachgewiesen werden können. Ein Fokus entspricht hierbei einem DSB (Rothkamm & Lobrich 2003). Dies eröffnet die Möglichkeit, auch nach niedrigen Dosen die Induktion und Reparatur von DSBs zu messen und macht diese Methode zu einem nützlichen Werkzeug für die Messung von Strahlenschäden nach z. B. radiologischen Untersuchungen (Lobrich et al. 2005, Geisel et al. 2008).

Aus dem zeitlichen Auftreten der Foci ließen sich bisher viele Rückschlüsse auf die Erkennung und Weiterleitung des Schadenssignals ziehen. Besonders hierzu beigetragen hat die neu aufgekommene Technik des *Life-Cell-Imaging* (LCI). Diese ermöglicht, diese Vorgänge in der lebenden Zelle zu beobachten. Hierbei werden Reparaturproteine mit fluoreszierenden Proteinen (z. B. GFP = *green fluorescent protein*) gekoppelt, sodass sich DSBs in der lebenden Zelle lokalisieren lassen (Lukas et al. 2005).

2.7.2 Chromosomale Analysen

Eine klassische Methode zur Messung von DSBs ist die Quantifizierung von Chromosomen-/Chromatidbrüchen. Die Chromosomen liegen die meiste Zeit des Zellzyklus in nicht-kondensierter Form vor. In der Prophase der Mitose kondensiert das Chromatin, und in der darauffolgenden Metaphase lagern sich die Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle an. Die präzise Aufteilung von Schwesterchromatiden in der Anaphase erfolgt durch den Aufbau eines bipolaren Spindelapparates. Dieser besteht primär aus Mikrotubuli. Diese sind sehr dynamische Strukturen, deren räumliche Organisation kritisch für die korrekte Funktion des Spindelapparates ist.

Von den Agenzien, die mit dem Spindelapparat wechselwirken, stellt Colchizin, welches aus der Pflanzengattung der Zeitlosen (*Colchicum*) gewonnen wird, ein klassisches Spindelgift dar. Es ist seit langem dafür bekannt, die Zellteilung zu hemmen (Eigsti & Dustin 1955). Colcemid (Democolcin) ist nahe damit verwandt, jedoch weniger giftig. Es inhibiert die Polymerisierung der Mikrotubuli mittels Bindung an der Grenzfläche zwischen α - und β -Tubulin (Rieder & Palazzo 1992, Wilson et al. 1999). Eine Alternative zu Colcemid stellt Nocodazol dar, welches an β -Tubulin bindet (Jordan et al. 1992). Beide Substanzen verhindern letztendlich die korrekte Ausbildung des Spindelapparates, wodurch die Chromosomen in der Äquatorialebene verbleiben. Nach entsprechender Präparation lassen sich in diesen mikroskopisch Chromosomenbrüche quantifizieren.

Bei der vorzeitigen Chromosomenkondensation (*premature chromosome condensation*, PCC) werden Chromosomen unabhängig von der Zellzyklusphase künstlich kondensiert. Diese Technik wurde erstmals vor fast 40 Jahren beschrieben (Johnson & Rao 1970). Die Fusion von

Testzellen mit mitotischen Zellen führte hierbei dazu, dass MPF (*maturation/mitosis-promoting factor*) von mitotischen auf nicht-mitotische Zellen übertragen wurde und die PCC einleitete (Darroudi et al. 1998a, Darroudi et al. 1998b). MPF ist ein Komplex aus p34cdc2 und Cyclin B (Maller et al. 1989) und bewirkt in seiner dephosphorylierten Form die Chromosomenkondensation (Moreno et al. 1989). Ein chemischer Weg zur Chromosomenkondensation beinhaltet die Anwendung von Calyculin A, welches die Aktivität der Protein-Phosphatase 1 und 2A (PP1 und PP2A) inhibiert. Dies bewirkt, dass cdc25 in seiner phosphorylierten aktiven Form vorliegt und MPF durch Dephosphorylierung aktiviert. Cyclin B kommt nur in der G2-Phase des Zellzyklus in großen Mengen vor. Dadurch werden durch Zugabe von Calyculin A hauptsächlich G2-Phase-Zellen kondensiert (Gotoh & Durante 2006). Der Vorteil der Analyse von G2-Zellen mittels PCC gegenüber der herkömmlichen Analyse von Metaphasechromosomen ist, dass in der G2-Phase bestrahlte Zellen vor der Analyse nicht den G2/M-Checkpoint überwinden müssen. Dadurch findet keine Selektion von Zellen durch den G2/M-Checkpoint statt.

Anhand der Quantifizierung von Chromatidbrüchen mittels PCC lässt sich wie in der IFM das Reparaturverhalten von Zellen beobachten. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass nicht jeder DSB in Form eines Chromosomenbruches sichtbar wird, sondern nur jeder dritte bis sechste. Die Mechanismen, aus denen sich diese Diskrepanz ergibt, sind hierbei noch nicht geklärt (Bedford & Goodhead 1989).

2.7.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE ist eine vielseitige Methode, welche sich für die Untersuchungen der DSB-Reparatur in verschiedenen Organismen und Zelltypen eignet. Sie wurde erstmalig dazu eingesetzt, Chromosomen von *S. cerevisiae* aufzutrennen (Schwartz & Cantor 1984, Carle & Olson 1985). Heute stellt sie eine Standardmethode zum Nachweis von DNA-Fragmenten dar, die durch DSBs entstanden sind (Birren et al. 1988, Lobrich et al. 1993). Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dieses Prinzip gleicht dem der konventionellen Gelelektrophorese, bei welcher ein elektrisches Feld angelegt wird, unter dessen Einfluss große DNA-Fragmente langsamer wandern als kleine. Bei der PFGE wird durch regelmäßige Änderung der Richtung des elektrischen Feldes eine zusätzliche Auftrennung erreicht, da sich kleinere DNA-Fragmente schneller umorientieren als große. Durch dieses modifizierte Verfahren können Fragmentgrößen bis hin zu 10 Mbp aufgetrennt werden. Größere Stücke sind einer Analyse nicht zugänglich, da sie bei der Elektrophorese nicht ins Gel wandern. Bei der konventionellen Gelelektrophorese ist die Auftrennung nur bis zu einer Fragmentgröße von <20 bis 50 kbp möglich.

Während der PFGE ist es erforderlich, die Zellen vor der Elektrophorese vollständig mittels Proteinase-Verdau zu lysieren. Dies geschieht, nachdem die Zellen in Agaroseblöckchen einge-

gossen wurden. Andere Zellaufschlussmethoden bergen die Gefahr einer zusätzlichen Fragmentierung der DNA durch Scherkräfte bei der Präparation. Die Lyse der Zellen sorgt dafür, dass die in den Zellen vorhandene DNA in hochreiner Form in den Blöckchen vorliegt. Diese werden danach in die Taschen des Gels eingesetzt.

Die PFGE wird nicht nur dafür eingesetzt, den initialen Schaden nach Bestrahlung zu messen, sondern auch die Reparatur (Kuhne et al. 2004). Hierfür sind nichtphysiologische Dosen von mehreren Gy notwendig, um eine genügend große Anzahl an DNA-Fragmenten zur Auftrennung zu erhalten. Die aufgetrennten Fragmente sind später als „Schmier“ im Gel sichtbar und können nach Färbung der DNA mittels Ethidiumbromid anhand des Fluoreszenzsignals ausgewertet werden.

Eine Variante der Methode ist die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente mittels Nukleotide, die mit ^3H oder ^{14}C markiert sind. Diese werden den Zellen vor dem Experiment zum Einbau in die DNA angeboten und später anhand der aus der Tasche herausgelaufenen Radioaktivität im Gel gemessen. Zur Quantifizierung der herausgelaufenen DNA-Fragmente wird allgemein der Quotient aus der aus der Tasche herausgelaufenen DNA und der Gesamt-DNA gebildet. Dies entspricht dem sogenannten FAR-Wert (*fraction of radioactivity released*).

2.8 Zielsetzung

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) sind die schwerwiegendsten Läsionen, die nach Bestrahlung auftreten können, da hierbei die genetische Information auf beiden DNA-Einzelsträngen unterbrochen wird. Werden DSBs nicht oder nur fehlerhaft repariert, kann es zur Entstehung von Mutationen und zur Entartung von Zellen kommen. Gerade im Niedrigdosisbereich von $<150\text{ mSv}$, der auch in der Radiodiagnostik eine wichtige Rolle spielt, wird die Frage, welchen Einfluss IR auf das Krebsrisiko hat, bis heute kontrovers diskutiert. Der Strahlenschutz orientiert sich dabei bisher am LNT (*linear no-threshold*)-Modell, welches besagt, dass das Krebsrisiko linear mit der applizierten Dosis ansteigt. Durch die Entwicklung sensitiverer Methoden in der Strahlenbiologie zum Nachweis von DNA-Schäden wurden jedoch Beobachtungen gemacht, die dem derzeit gültigen Modell widersprechen. Da Menschen täglich und auch im medizinischen Bereich niedrigen Strahlendosen ausgesetzt sind, ist es wichtig, die DNA-Reparatur in diesem Dosisbereich (und hier vor allem die Reparatur von DSBs) zu untersuchen.

2.8.1 Untersuchungen zur Auswirkung von Kontrastmittel auf die Entstehung und Reparatur von DSBs durch IR

Die diagnostische Strahlenexposition ist die größte vom Menschen geschaffene Quelle für Röntgenstrahlung im Alltag (UNSCEAR 2000). In der Röntgendiagnostik wie z. B. der Computertomographie (CT) werden zusätzlich vor der Bestrahlung Kontrastmittel (KM) injiziert,

welche durch eine erhöhte Absorption von Strahlung die Bildgebung unterstützen. Grund dafür ist, dass die im KM enthaltenen Elemente wie z. B. Jod aufgrund ihrer hohen Ordnungszahl (Z) und der damit verbundenen Steigerung des Photoeffekts eine verstärkte Röntgenstrahlabsorption aufweisen (Corde et al. 2004). Dies ist jedoch nur nach niedrigeren Photonenenergien der Fall, wie sie z. B. in der Röntgendiagnostik eingesetzt werden, da bei diesen Energien der Photoeffekt einen relativ hohen Anteil an den Absorptionsereignissen hat.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher die Wirkung von KM auf die Induktion und Reparatur von DSBs untersucht werden. Hierfür sollte zunächst die γ H2AX-Immunfluoreszenz-Mikroskopie, eine Methode, die den Nachweis einzelner DSBs in der Zelle erlaubt, in murinen Lymphozyten etabliert werden, um die Zuverlässigkeit und Sensitivität dieser Methode unter definierten Bedingungen zu validieren. Hierfür sollte das IF-Verfahren in murinen Lymphozyten etabliert werden. In der anschließenden KM-Studie sollte zunächst anhand von unterschiedlichen Zellsystemen ermittelt werden, ob es im Beisein von KM bei Bestrahlung mit IR verschiedener Photonenenergien zu einer initialen Erhöhung der Anzahl an DSBs kommt.

Bereits in früheren Arbeiten wurde beobachtet, dass sich die γ H2AX-IFM aufgrund ihrer Sensitivität zur biochemischen Messung niedriger Dosen eignet (Lobrich et al. 2005). Daher sollten die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse auf ihre Relevanz *in vivo* überprüft, und der Effekt des KMs in Patientenstudien *in vivo* untersucht werden. Hierfür sollte die Anzahl an DSBs mit Hilfe des γ H2AX-IF-Verfahrens in Lymphozyten von nativ bestrahlten CT-Patienten und solchen mit KM-Gabe vor CT bestimmt werden. Zur Abschätzung der bei den CT-Untersuchungen applizierten Dosen sollten die *in vivo* ermittelten Werte mit denen von *in vitro* mit definierten Dosen bestrahlten Lymphozyten der Patienten verglichen werden.

2.8.2 DSB-Reparatur nach niedrigen Dosen

In einer früheren Studie wurde beobachtet, dass in konfluenten Fibroblasten die DSB-Reparaturkapazität mit kleiner werdender Röntgendosis abnimmt und dass selbst nach langen Reparaturzeiten ein persistentes residuales Focilevel verbleibt (Rothkamm & Lobrich 2003). Da niedrige Dosen im Bereich weniger mGy täglich in der Röntgendiagnostik appliziert werden, ist es von besonderem Interesse, die physiologische Relevanz der verminderten Reparaturkapazität in diesem Dosisbereich auch in einem natürlichen System *in vivo* zu untersuchen.

Daher sollte im zweiten Teil der Arbeit die DSB-Reparatur nach niedrigen Dosen *in vivo* im Maussystem untersucht werden. Das murine System weist als Säugersystem ähnliche morphologische Eigenschaften und eine ähnliche DSB-Reparaturmaschinerie auf wie das humane. Darüberhinaus bietet es im Gegensatz zu Patientenstudien den Vorteil, dass Ganzkörperbestrahlungen durchgeführt werden können. Hierfür sollte in einem gemeinsamen Projekt mit der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in

Homburg/Saar das Verfahren der γ H2AX-IFM in verschiedenen murinen Organen etablieren werden. Um das Verfahren zu validieren, sollte als zweiter DSB-Marker 53BP1 eingeführt werden. Abschließend sollte die Reparaturkapazität nach verschiedenen Röntgendosen, einschließlich Niedrigdosen, in reparaturprofizienten Wildtyp-Mäusen gemessen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien und Geräte

Brutschränke	IGI50, Jouan
Computertomograph	4-Zeilen-Scanner, Typ MX8000 IDT, Philips Medical Systems, Eindhoven, Niederlande und 10- bzw. 64-Zeilen-Scanner, Somatom Sensation, Siemens, Deutschland
¹³⁷ Cäsium-Quelle	Typ OB29/4, STS Braunschweig
Deckgläser	Ø 12 mm und 24x60 mm, Roth
Elektronikrührer	Variomag®, H+P Labortechnik GmbH
Fluoreszenz-Mikroskop	Axioplan 2 und Axioobserver, Zeiss
Invers-Mikroskop	Eclipse TS 100, Nikon
Kryoröhrchen	Cellstar®, Greiner bio-one, 5 ml
Kühlzentrifuge	5810 R, Eppendorf
Linearbeschleuniger	Mevatrom MD, Siemens
Mikroskop-Kamerasystem	AxioCam MRm, Zeiss
Monovetten® mit Ammonium-Heparin	Sarstedt
Monovetten® mit EDTA K	Sarstedt
Multi-Adapter für S-Monovette®	Sarstedt
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Objektträger	SuperFrost®, 76x26 mm, Menzel-Gläser
Pulsfeld-Gelelektrophorese-System	Chef-DR® III, BioRad
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	SafeSeal Tubes, Roth
Röntgenröhre	MCN 165 / 796704, Phillips
Sterilwerkbänke	NapFlow, Napco; LaminAir, Holten
Tischzentrifugen	Heraeus Biofuge pico, Eppendorf 5415C
Transilluminator	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
Tro-Venaset® (Perfusion Set)	Troge Medical GmbH

Vortexer	Genie 2, Scientific Industries
Wipptisch	Fröbel Labortechnik
Zellkulturflasche, klein	TPP, 25 cm ²
Zellkulturflasche, groß	TPP, 75 cm ²
Zellkulturschalen	Nunc, 8,8 cm ² und 21,5 cm ²
6-Well-Platten	Nunc
Zentrifugenröhrchen	TPP, 15 ml und 50 ml

3.2 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Antikörper

3.2.1 Chemikalien

10x PBS	PBS Dulbecco Instamed-Pulver
Aceton	Roth
Agarose, Type VII	Sigma
Aphidicolin	Calbiochem, 1 mg/ml
Calyculin A	Sigma 100 µg/ml in DMSO
D-Mannitol	Sigma
Ethanol, reinst > 99,8%	Applichem
Ethanol, vergällt	Roth
Ethidiumbromid	Roth, 10 mg/ml
Formaldehyd	Roth, 37%
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
Gelatine	Sigma
Giemsa	Sigma Diagnostics, modified, (säurefrei für die Histologie) 0,4% (w/v) in Methanol
Imeron 300	Bracco, 0,612 g lomeprol/ml Lösung Jodkonzentration = 300 mg/ml
KCl	USB
<i>Low-melting-Point-Agarose</i>	Agarose Typ VII, Sigma

Lymphozytentrennmedium LSM 1077	PAA Laboratories GmbH, Ficoll 400
Methanol	Roth
Minimal Essential Medium (MEM)	Biochrom
Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Vectashield®
Mounting Medium with DAPI, Hard Set	Vector Laboratories, Vectashield®
Mounting Medium	Vector Laboratories, Vectashield®
Na ₂ -EDTA	Roth
NaCl	Roth
N-Laurosyl-Sarcosin	Merck
<i>Non-essential amino acids (NEAA)</i>	Biochrom
Penicillin-Streptomycin	Biochrom
PronaseE	Merck
<i>Pulsed Field Certified Agarose</i>	Bio-Rad Laboratories
<i>REAL Target Retrieval Solution (10x)</i>	DAKO
Rosswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI)	Biochrom
Salzsäure	Roth
Small DNA Low Melt Spezialagarose	Biozym
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Tween20	Sigma
Ultravist 300	Schering, 0,623 g Iopromid/ml Lösung Jodkonzentration = 300 mg/ml
Wasserstoffperoxid (30%)	Roth
Ziegenserum (goat serum, GS)	Biochrom

3.2.2 Lösungen

10x PBS; pH 7,45	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBS	1x PBS In MilliQ pH = 7,0 für Lymphozyten/Gewebe
PBS/FCS	1x PBS 1% FCS (hitzeinaktiviert) in MilliQ pH = 7,0 für Lymphozyten/Gewebe
PBS/GS	1x PBS 1% GS (hitzeinaktiviert) in MilliQ pH = 7,0
Einfriermedium	20% (v/v) Zellkulturmedium 20% (v/v) DMSO 60% FCS
Ethidiumbromidbad	1 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5x TBE
Lyse-Puffer	1% (w/v) N-Laurosyl-Sarcosin 1 mg/ml PronaseE 0,5 M Na ₂ -EDTA, pH 8
1x TBE-Puffer	44,5 mM Tris 44,5 mM Borsäure 1 mM Na ₂ -EDTA, pH 8
1x TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM Na ₂ -EDTA, pH 8
Trypsin-EDTA-Lösung	0,1% Trypsin 0,5 mM Na ₂ -EDTA, pH 8 in 1x PBS (pH = 7,45)
Mannitol	0,43 M in MilliQ

Gelatinelösung	0,1% Gelatin in MilliQ
Fixativ	Methanol (100%)/Essigsäure (100%) Im Verhältnis 3:1

3.2.3 Antikörper

Primärantikörper:

mouse-anti- γ H2AX (Ser 139)	Upstate (Millipore), IgG, 2 μ g/ml
Rb pAb to gamma H2A.X (phospho S139)	abcam, 1 mg/ml
anti-pATM Protein Kinase (pS1981) rabbit	Rockland (Biomol), 0,95 mg/ml
anti-53BP1, mouse monoclonal	Upstate (Millipore), IgG ₁ , 200 μ g/235 μ l
anti-53BP1 IHCrabbit	Bethyl, IgG, 0,1 ml
rabbit-anti-CENP-F	Santa Cruz, IgG, 200 μ g/ml

Sekundärantikörper:

Alexa Fluor [®] 488 goat-anti-mouse	Mo BiTec IgG, 2 mg/ml
Alexa Fluor [®] 488 goat-anti-rabbit	Mo BiTec IgG (H+L), 2 mg/ml
Alexa Fluor [®] 594 goat-anti-rabbit	Mo BiTec IgG, 2 mg/ml

3.3 Verwendete Zellen

Wildtyp-Zellen:

Als Wildtypzellen wurden HSF1-Zellen verwendet. Dies sind humane primäre Hautfibroblasten eines gesunden Spenders. Sie wurden von Dr. K. Dittmann (Eberhard Karls Universität, Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% *Non-essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg pro ml Streptomycin und 100 Units pro ml Penicillin.

Humane Lymphozyten:

Für die sofortige Verwendung von Blut wurde dieses steril aus der Armvene der Spender in Monovetten mit Ammonium-Heparin entnommen und bis zur Verwendung bei 37°C gelagert (maximal 10 min). Vor dem Verschicken von Blutproben erfolgte die Entnahme in Monovetten

mit EDTA K. Diese Proben wurden anschließend bei 4°C gelagert.

Murine Lymphozyten:

Das Blut wurde durch Punktion des linken Herzventrikels entnommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit einem Tropfen Heparin-Natrium überführt. Bis zur Verwendung wurde das Blut bei 37°C gelagert (maximal 10 min). Dies wurde von Frau Dr. Xiaorong Dong, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar, durchgeführt.

3.4 Verwendete Mausstämme und murine Organe

3.4.1 Verwendete Mausstämme

Die verwendeten Mausstämme wurden von Prof. Dr. Christian Rube, Strahlenbiologisches Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar, zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden laut Bestimmungen des Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung der Veterinärbehörde des Saarlandes in eigenen *Laminar Air Flow*-Systemen gehalten. Es wurden vier bis fünf Mäuse in einem Käfig untergebracht. Die Tiere lebten in einem Tages- und Nachtrhythmus von jeweils 12 h. Versorgt wurden die Mäuse mit spezieller Laborkost (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser. Die äußeren Bedingungen waren folgende: Raumtemperatur 22 ± 2 °C und Luftfeuchtigkeit $55 \pm 10\%$. Bei den Tieren fanden regelmäßige veterinärmedizinische Untersuchungen statt.

3.4.1.1 A-T-Mäuse

Homozygote A-T-Mäuse (129S6/SvEvTac-A-T-tm1Awb-/J, *homozygous recessive Atm-/-*) wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Main, USA) bezogen. Dieser Mausstamm besitzt eine trunkierende Mutation im ATM-Gen. Durch Insertion eines Vektors, welcher das *Neo Resistance*-Gen trug, wurde das ATM-Gen verändert und so in einen funktionslosen Zustand überführt. Den Mäusen wurde vor den Experimenten eine Woche Zeit gelassen sich zu akklimatisieren, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

3.4.1.2 SCID- und BALB/c-Mäuse

Es wurden zwölf Wochen alte männliche und weibliche SCID-Mäuse (CB-17/Icr-Prkdc scid/Crl) verwendet, die eine Mutation im *Prkdc*-Gen aufwiesen. Diese Mäuse besaßen einen sehr ausgeprägten Immundefekt, der sowohl die B- als auch die T-Zellen betraf. Für diesen autosomal rezessiven Gendefekt waren die SCID-Mäuse homozygot.

Weiterhin wurden zwölf Wochen alte BALB/c-Mäuse (BALB/cAnNCrl) verwendet, welche eine verminderte Expression der katalytischen Untereinheit der DNA-PK aufwiesen (Okayasu et al.

2000, Mori et al. 2001). Beide Mausstämme wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

3.4.1.3 C57BL/6-Mäuse

Als reparaturprofiziente Wildtyp-Mäuse wurden zwölf Wochen alte C57BL/6-Mäuse (C57BL/6NCrl) eingesetzt. Diese wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

3.4.2 Verwendete murine Organe

Die Betäubung der Mäuse sowie die Entnahme, Fixierung und Einbettung der Organe wurde von Frau Dr. Xiaorong Dong, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar durchgeführt. Nach der Bestrahlung der Mäuse und erfolgter Reparaturzeit wurden diese durch intraperitoneale Injektion von Rompun und Ketamin (1 ml Rompun und 0,75 ml Ketamin, verdünnt in 8,25 ml 0,9% Natriumchlorid-Lösung) betäubt. Anschließend wurden sie geöffnet und Blut, Gehirn, Herz, Lunge, Dünndarm und beide Nieren entnommen. Direkt im Anschluss erfolgte die Fixierung.

3.5 Zellkultur von Fibroblasten

3.5.1 Kultivierung von Fibroblasten

HSF1-Zellen wurden bei 37°C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil kultiviert. Zur Subkultivierung wurden die adhärent wachsenden Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurden sie anschließend für 5 bis 10 min bei 37°C mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Die Zellsuspension wurde in Medium aufgenommen und entsprechend einem Splitverhältnis von 1 zu 3 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Für die Bestrahlung von Zellen auf Deckgläschen (DG) wurde die Anzahl an Zellen pro ml mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und 200.000 Zellen in eine Zellkulturschale mit darin ausgelegten DG ausgesät. Anschließend wurden die Zellen 21 Tage (mit Mediumwechsel alle sieben Tage) wachsen gelassen, bis sie ein konfluentes Stadium erreicht hatten. 24 h vor dem Versuch wurden die DG einzeln in je eine Zellkulturschale überführt und mit frischem Medium bedeckt.

Für PFGE-Experimente wurden ebenfalls 200.000 Zellen in eine 25 cm² große Zellkulturflasche ausgesät und 21 Tage (mit Mediumwechsel nach sieben Tagen) wachsen gelassen, bis sie ein konfluentes Stadium erreicht hatten.

Für PCC-Experimente wurden 700.000 Zellen 48 h vor Beginn des Experiments in eine 75 cm² große Zellkulturflasche ausgesät, sodass sie sich zum Zeitpunkt des Experiments im exponentiellen Wachstum befanden.

Bei allen Experimenten mit Fibroblasten wurde überprüft, ob die Wachstumsgeschwindigkeit bis zum Erreichen des konfluenten Stadiums gleich bleibend gut war.

3.5.2 Kryokonservierung von Fibroblasten

Die Zellen wurden mittels Trypsin-ETDA-Behandlung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in wenige ml Medium aufgenommen. Durch Zählen in der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen für 8 min bei 300*g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,9 ml kaltem Medium pro einzufrierendem Aliquot aufgenommen und auf Eis gelagert. Die Suspension wurde mit der gleichen Menge an kaltem Einfriermedium gemischt und jeweils 1,8 ml in Kryoröhrchen gegeben. Anschließend wurden die Zellen langsam auf -80°C gekühlt und nach ein bis zwei Tagen in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie bis zum Auftauen lagerten.

3.5.3 Auftauen von Fibroblasten

Aus dem flüssigen Stickstoff entnommene Kryoröhrchen wurden 2 min bei 37°C aufgetaut und direkt in 5 ml warmes Medium überführt. Nachdem die Zellsuspension 8 min bei 300*g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt wurde, erfolgte die Überführung der Zellen in 10 ml frisches Medium in eine Zellkulturflasche. Diese wurde bei 37°C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil kultiviert.

3.6 Bestrahlung

3.6.1 Röntgenbestrahlung an der Röntgenröhre

Für die Bestrahlung der Zellen wurde eine Röntgenröhre mit einer Wolfram-Anode verwendet. Die Bestrahlung wurde bei einer Spannung von 90 kV durchgeführt. Für Dosen ab 500 mGy wurde eine Stromstärke von 19 mA eingestellt, für kleinere Dosen 6 mA.

Die humanen Lymphozyten wurden im Abstand von 72 cm zum Beryllium-Austrittsfenster mit einer Filterung von 1 mm Aluminium und 2 mm Kunststoff sowie einer Petrischale bestrahlt. Bei diesem Abstand ergab sich eine Dosisleistung von 212 mGy pro min für eine Stromstärke von 19 mA und 70 mGy pro min für eine Stromstärke von 6 mA.

Die Bestrahlung der humanen Fibroblasten wurde im Abstand von 30 cm zum Beryllium-Austrittsfenster mit einer Filterung von 1 mm Aluminium durchgeführt. Bei diesem Abstand ergab sich eine Dosisleistung von 1,96 Gy pro min für eine Stromstärke von 19 mA.

Die Dosisleistungen wurden durch Fricke-Dosimetrie sowie durch Messung mit einem PTW-Weichstrahlkammer-Dosimeter bestimmt. Bei PFGE-Experimenten wurde die Aluminiumplatte, die als Filter und als Trägerplatte für die Kulturflaschen diente, vorgekühlt.

Bei Bestrahlung auf Deckgläschen ist zu beachten, dass aufgrund der hohen Ordnungszahl des Materials Wechselwirkungen zwischen der Röntgenstrahlung und der Materie auftreten (Kegel et al. 2007). Die durch den Photoeffekt zusätzlich entstehenden Sekundärelektronen besitzen eine genügend hohe Reichweite, um die adhärenen Zellen zu schädigen, können jedoch durch Dosimeter oder mittels Fricke-Dosimetrie nicht detektiert werden. Die effektive Dosis ist somit bei Bestrahlung auf DG höher als bei Bestrahlung von Kunststoff-Zellkulturflaschen. Dieser Umstand wurde bei der Angabe der Dosis im Ergebnisteil berücksichtigt.

3.6.2 Röntgenbestrahlung am Linearbeschleuniger

Die verwendeten Mäuse wurden an einem Linearbeschleuniger bestrahlt. Vorher wurde die Isodosen-Verteilung der Ganzkörperbestrahlung mittels *ADAC Pinnacle Three Dimensional Treatment Planning System* evaluiert. Dies wurde von Herrn Dr. Martin Kühne, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt. Die Dosisverteilung zeigte, dass eine Isodosis von 95% den kompletten Körper jeder Maus bei der Bestrahlung umhüllte.

Die Mäuse befanden sich während der Bestrahlung in einem speziellen Plastikzylinder. Der Durchmesser des Zylinders betrug 20 cm, die Höhe 5 cm. Die Verwendung von Plastikmaterial, welches äquivalent zu Gewebe war (Dicke: 1,5 cm), hatte dabei den Zweck, eine akzeptable Dosisuniformität über den gesamten Körper zu erreichen. Die eingesetzte Photonenenergie betrug 6 MeV, die Dosisrate 2 Gy pro min. Die Distanz zwischen Bestrahlungsquelle und Haut der Mäuse (*source skin distance SSD*) betrug 99 cm, die Größe des Bestrahlungsfeldes 30 cm^2 .

3.6.3 Röntgenbestrahlung am Computertomographen (CT)

Die Patienten der Patientengruppe I erhielten ein Spiral-CT im Mehrschicht-Verfahren an einem 4-Zeilen-Scanner. Die Stromstärke betrug 150 bis 200 mA, die Stromspannung 120 kV und die Rotationszeit 0,5 bis 0,75 s. Die Schichtkollimation variierte zwischen 1 und 5 mm und der Pitch von 0,5 bis 1,25. Diese Parameter erbrachten CTDI_{vol} (*volumetric CT dose indices*) zwischen 10 und 14 mGy. Ein Thorax-CT in einer Phase mit oder ohne vorherige Gabe von KM wurde bei 26 der 27 untersuchten Patienten durchgeführt. Die Scanlängen lagen hierbei zwischen 285 und 395 mm. Das DLP (Dosis-Längen-Produkt), berechnet als Produkt aus der Scanlänge multipliziert mit dem CTDI_{vol} , lag zwischen 350 und 550 mGy*cm. Ein Patient bekam ein Thorax-Abdomen-

CT in einer Phase mit Kontrastmittel (KM)-Gabe (Scan-Länge 680 mm; $CTDI_{vol} = 13,7$ mGy; $DLP = 931$ mGy*cm). Die Dosimetrie erfolgte gemäß Gebrauchsanweisung von Philips mit einem Dosimeter (Solidose 400) mit einer DCT10 Ionisierungskammer (RTT).

Die Patienten der Patientengruppe II erhielten ebenfalls ein Spiral-CT im Mehrschicht-Verfahren, entweder an einem 10-Zeilen-Scanner oder einem 64-Zeilen-Scanner. Die Stromstärke betrug 100 mA, die Stromspannung 120 kV und die Rotationszeit 0,5 s. Die Schichtkollimation betrug 0,75 mm für den 10-Zeilen- und 0,6 mm für den 64-Zeilen-Scanner. Der Pitch lag bei 1,5 für den 10-Zeilen- und bei 1,2 für den 64-Zeilen-Scanner. Diese Parameter erbrachten $CTDI_{vol}$ zwischen 5 und 18 mGy, Scanlängen zwischen 300 und 345 mm und DLPs von 160 bis 640 mGy*cm.

3.6.4 γ -Bestrahlung an einer 137 Cäsium (Cs)-Quelle

Die Bestrahlung von Lymphozyten mit γ -Strahlung wurde mit einer 137 Cäsium-Quelle (Blutbank des Uniklinikums des Saarlandes, Homburg) durchgeführt. Das Radioisotop befand sich in einem Stab, der bei Bestrahlungsbeginn automatisch seitlich an die Bestrahlungskammer gefahren wurde. Dieser oszillierte während der Bestrahlung. Die Proben befanden sich in einem Behälter aus Stahlblech, welcher während der Bestrahlung rotierte. Somit wurden die Proben homogen aus allen Richtungen bestrahlt. Die Filterung bestand aus 1 mm Stahlblech. Die Dosisleistung konnte hier nur mittels Fricke-Dosimetrie ermittelt werden, da ein Einbringen einer Messkammer in das Gerät nicht möglich war. Die gemessene Dosisleistung betrug 3,5 Gy pro min und die Photonenenergie 660 keV.

3.7 Studien mittels IFM

Soweit nicht anders beschrieben, wurden Zentrifugations- und Waschschriffe sowie Inkubationen bei RT durchgeführt und Lösungen ebenfalls bei dieser Temperatur verwendet.

3.7.1 Fixierung von humanen Fibroblasten für die IFM

Um die auf DG kultivierten Fibroblasten zu fixieren, wurden diese in 2% FA für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die DG dreimal für je 10 min in PBS auf einem Wipptisch gewaschen. Nach einem zehnmütigen Permeabilisierungsschritt in 0,25% Triton in PBS/1%FCS bei 4°C wurden die DG dreimal in PBS/1%FCS gewaschen und danach maximal drei Tage in PBS/1%FCS bei 4°C gelagert.

3.7.2 Isolierung und Fixierung von humanen Blutlymphozyten für die IFM

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte nach Anleitung von PAA Laboratories mit Hilfe eines Lymphozytentrennmediums. Hierfür wurden 6 ml von mit RPMI-Medium verdünntem Blut (im

Verhältnis 1 zu 2) auf 6 ml des Lymphozytentrennmediums geschichtet und 20 min bei 1.200*g und 31°C ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die entstandene Plasmaphase, welche die Thrombozyten enthält, mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Interphase, welche Lymphozyten und Monozyten enthält, mit einer 1000 µl-Kolbenhubpipette vorsichtig abgenommen und in 2 ml RPMI-Medium (37°C) überführt. Nach einer erneuten zehnminütigen Zentrifugation mit 300*g und 31°C wurde das entstandene Lymphozyten-Pellet aufgelockert. Nach Zugabe von 2 ml PBS (37°C) und einer weiteren zehnminütigen Zentrifugation mit 240*g und 31°C wurde das Lymphozyten-Pellet erneut aufgelockert und in 200 µl PBS vorsichtig resuspendiert. Je 100 µl der Lymphozytensuspension wurde für 6 min auf gelatinisierte DG geschichtet und anschließend 30 min in Methanol (-20°C) fixiert. Nach einer einminütigen Permeabilisierung in Aceton (-20°C) wurden die DG dreimal für jeweils 10 min in PBS/1%FCS auf einem Wipptisch gewaschen und bis zur Immunfluoreszenz-Färbung bis zu drei Tage in PBS/1%FCS bei 4°C gelagert.

3.7.3 Isolierung und Fixierung von murinen Blutlymphozyten für die IFM

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte nach Anleitung von PAA Laboratories mit Hilfe des Lymphozytentrennmediums. Hierfür wurden 1800 µl von mit RPMI-Medium verdünntem Blut auf 1800 µl des Lymphozytentrennmediums geschichtet und 20 min bei 1.200*g ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die entstandene Plasmaphase mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Interphase mit einer 200 µl-Kolbenhubpipette vorsichtig abgenommen. Diese wurde in 1 ml PBS überführt und erneut für 10 min mit 300*g zentrifugiert. Das entstandene Lymphozyten-Pellet wurde aufgelockert und 1 ml PBS zugegeben. Nach einer weiteren zehnminütigen Zentrifugation mit 240*g wurde das Lymphozyten-Pellet aufgelockert und die Zellen durch tropfenweise Zugabe von 4% FA in PBS unter permanentem Vortexen fixiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min und einem erneuten Zentrifugationsschritt für 8 min mit 300*g wurde das Lymphozyten-Pellet aufgelockert. Danach erfolgte die Zugabe von 0,1% Tween20 in PBS/1%FCS mit anschließender Zentrifugation für 8 min mit 300*g. Nach einer Wiederholung dieses Schrittes wurde tropfenweise unter permanentem Vortexen 1,2 ml eiskaltes Methanol zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 300*g und 4°C für 10 min wurde 1 ml PBS zugegeben und nach einer Zentrifugation für 8 min mit 300*g das Lymphozyten-Pellet in 110 µl PBS vorsichtig resuspendiert. Die Lymphozytensuspension wurde auf DG geschichtet und nach 10 min für 30 min in Methanol (-20°C) inkubiert. Nach einer einminütigen Inkubation in Aceton (-20°C) wurden die DG dreimal für jeweils 10 min in PBS/1%FCS auf einem Wipptisch gewaschen und bis zur Immunfluoreszenz-Färbung bis zu drei Tage in PBS/1%FCS bei 4°C gelagert.

3.7.4 Fixierung und Präparation von Gewebeschnitten für die IFM

Jedes entnommene murine Organ wurde über Nacht in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Dehydrierungsvorgang mittels einer Ethanolreihe mit ansteigenden Konzentrationen und mittels Xylol (je 100%) wurden die Organe in Paraffin eingebettet und vor der IF-Färbung Schnitte von 4 μ M Dicke angefertigt.

Für die IF-Färbung von murinen Gewebeschnitten wurden die auf OT fixierten Gewebeschnitte in drei Xylol-Bädern (je 100%) jeweils 7 min inkubiert, um das Paraffin zu entfernen. Anschließend wurde die Restflüssigkeit auf einem Zellstofftuch ablaufen gelassen und je 5 min in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 90%, 80% und 70%) rehydriert. Die OT wurden zweimal in MilliQ geschwenkt und 1 h bei 95°C in *Daco REAL Target Retrieval Solution* inkubiert, um die durch das Paraffin vernetzten Antigenstrukturen zu öffnen. Nachdem die Objektträger in destilliertem Wasser geschwenkt waren, erfolgte ein einstündiger Blockschrift in PBS/1%GS.

3.7.5 IF-Färbung von humanen und murinen Zellen

Für die IF-Färbung von humanen Lymphozyten, humanen Fibroblasten und Mauslymphozyten wurden die DG mit den fixierten Zellen auf Parafilm in eine verschließbare feuchte Kammer gelegt und mit je 50 μ l Primärantikörperlösung beschichtet (Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Verwendete Antikörperkonzentrationen und -Inkubationsbedingungen

Zellart	Primärantikörper	Verdünnung	Inkubationszeit und Temperatur	Sekundärantikörper	Verdünnung	Inkubationszeit und Temperatur
Humane Lymphozyten	Mouse-anti- γ H2AX	1:800	Über Nacht bei 4°C	Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse	1:400	1 h bei RT
HSF1	Mouse-anti- γ H2AX	1:200	1 h bei RT	Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse	1:500	1 h bei RT
HSF1	rabbit-anti-CENP-F	1:200	1 h bei RT	Alexa Fluor®594 goat-anti-rabbit	1:500	1 h bei RT
HSF1	anti-53BP1, mouse	1:200	1 h bei RT	Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse	1:500	1 h bei RT
HSF1	anti-pATM, mouse	1:700	1 h bei RT	Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse	1:500	1 h bei RT
Murine Lymphozyten	Mouse-anti- γ H2AX	1:800	Über Nacht bei 4°C	Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse	1:400	1 h bei RT
Murines Gewebe	Mouse-anti- γ H2AX	1:800	Über Nacht bei 4°C	Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse	1:200	1 h bei RT
Murines Gewebe	anti-53BP1 IHC, rabbit	1:600	Über Nacht bei 4°C	Alexa Fluor®488 goat-anti-rabbit	1:200	1 h bei RT

Für murines Gewebe wurden die Antikörper in PBS/1%GS, für alle anderen Zellen in PBS/1%FCS verdünnt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die DG dreimal 10 min mit PBS/1%FCS gewaschen und mit jeweils 50 μ l Sekundärantikörperlösung beschichtet. Nach einer erneuten

Inkubationszeit in einer feuchten Kammer wurden die DG bei Dunkelheit viermal 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die DG auf Objektträger mit je 3 μ l Mounting Medium mit DAPI/Mounting Medium (Mischungsverhältnis 1 zu 6) gelegt und nach 30 min mit Nagellack versiegelt.

Für die Färbung von Gewebeschnitten wurden die OT in eine verschließbare feuchte Kammer gelegt, mit 200 μ l Primärantikörperlösung überschichtet und ein großes DG (24x60 mm) luftblasenfrei aufgelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die OT dreimal 10 min mit PBS gewaschen und mit jeweils 200 μ l Sekundärantikörperlösung beschichtet. Nach einer erneuten Inkubationszeit in einer feuchten Kammer bei Dunkelheit wurden die OT viermal 10 min mit PBS gewaschen und danach die Schnitte mit 70 μ l Mounting Medium mit DAPI Hard Set versiegelt. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

3.7.6 Quantifizierung von Foci und Anfertigung von Bildaufnahmen

Für die Untersuchung des Reparaturvermögens wurde die Anzahl an γ H2AX-, 53BP1- oder ATM-Foci herangezogen, welche ein Maß für die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ist. Bei allen Präparaten erfolgte die Auswertung per Auge mit 1.000facher Vergrößerung am Fluoreszenz-Mikroskop. Hierbei wurden mindestens 40 Foci und mindestens 40 Zellen ausgewertet.

Für die Auswertung von Lymphozyten wurden Monozyten anhand morphologischer Kriterien ausgeschlossen. Die restlichen Lymphozyten, welche für die Auswertung herangezogen wurden, bestanden wiederum aus verschiedenen Subpopulationen von Lymphozyten (z. B. B- und T-Lymphozyten und deren Subtypen).

Für die Bildaufnahmen von Zellkernen, die mittels IF gefärbt wurden, wurden Stapelaufnahmen in Z-Abständen von 200-300 nm angefertigt (je nach Wellenlänge). Dies erfolgte unter Zuhilfenahme der Axiovision 40 V 4.6.3-SP1-Software (Zeiss, Göttingen). Anschließend wurden die Aufnahmen mithilfe der Huygens 3.3.2p1 64b-Software (Scientific Volume Imaging, SVI, Hilversum, Niederlande) dekonvoliert.

3.8 Chromosomenstudien mit *premature chromosome condensation* (PCC)

3.8.1 Präparation von G2-Chromosomen

Direkt nach der Bestrahlung der exponentiell wachsenden Zellen wurde 3 μ g pro ml Aphidicolin sowie 50 ng pro ml Calyculin A zugegeben und die Zellkulturflaschen für 30 min bei 37°C inkubiert. Da sich mitotische Zellen abrunden und während der Waschschriffe leichter vom Boden der Zellkultur-Flasche lösen, wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA-Behandlung geerntet und alle Überstände gesammelt. Durch eine anschließende 20 minütige hypotonische Behandlung mittels 5 ml 75 mM KCl wurden die Zellen zum Aufquellen gebracht. Nach einer Zentrifugation

für 10 min bei 200*g und 4°C wurden die Zellen durch langsame Zugabe von 10 ml Fixativ unter permanentem Vortexen fixiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei RT und einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 200*g und 4°C wurden die Zellen erneut in 10 ml Fixativ gewaschen und für 1 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut für 10 min mit 200*g und 4°C zentrifugiert und zum dritten Mal in 10 ml Fixativ aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis und einer letzten Zentrifugation für 10 min mit 200*g und 4°C wurde der Überstand bis auf 0,5 bis 1 ml abgesaugt und die Zellsuspension in der Restflüssigkeit resuspendiert. Zur Präparation von Chromosomenspreitungen wurden 30 µl der Zellsuspension auf einen feuchten OT aufgetropft und bei RT luftgetrocknet. Vor der Färbung mit Giemsa wurden die OT für mindestens einen Tag bei RT gelagert.

3.8.2 Giemsa-Färbung

Zur einheitlichen Färbung der Chromosomen mit Giemsa-Lösung wurden die OT für 3 min in einer 3%igen Giemsa-Lösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Präparate zweimal in MilliQ gespült und entweder bei RT oder bei 50°C auf der Heizplatte luftgetrocknet. Die Lagerung der gefärbten OT erfolgte bei RT.

3.8.3 Auswertung der gefärbten Präparate

Die gefärbten OT wurden bei 100-facher Vergrößerung mit Hilfe des Moduls „MSearch“ der Software „Metafer“ (MetaSystems, Altlußheim) nach Chromosomenspreitungen abgesucht. Die Chromosomenspreitungen wurden anhand der gespeicherten Koordinaten relokalisiert, und mit der Software „Isis“ (MetaSystems, Altlußheim) wurden bei 630facher Vergrößerung Bilder aufgenommen. Die Quantifizierung der Chromatidbrüche erfolgte manuell. Bei allen Proben wurden insgesamt mindestens 100 Chromosomenspreitungen ausgewertet.

3.9 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

3.9.1 Isolierung genomischer DNA für PFGE

Vor der Bestrahlung wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA-Behandlung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und bei 4°C bis zur Bestrahlung gelagert. Nach der Bestrahlung wurde der Inhalt der Zellkulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt und für 10 min bei 300*g und 4°C zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in 50 µl PBS aufgenommen, mit 50 µl 1,4%iger *Low-Melting-Point-Agarose* (47°C) vermischt und in vorgekühlte Blockformer gegossen. Die Blockchen wurden bis zum Erstarren bei 4°C gelagert und anschließend für mindestens 30 min bei 4°C in Lyse-Puffer äquilibriert. Um die Zellen zu lysie-

ren, wurden die Blöckchen über Nacht bei 50°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte in 0,5 M EDTA bei 4°C.

3.9.2 Vorgang der PFGE

Vor der Gelelektrophorese wurden die Blöckchen viermal 30 min in 1xTE-Puffer gewaschen und anschließend in die Taschen eines 0,8%igen Agarose-Gels in 0,5xTBE eingesetzt. Diese wurden mit 0,8%iger *Low-Melting-Point*-Agarose (gelöst in PBS) verschlossen. Nach einer 30minütigen Äquilibration in 0,5xTBE-Laufpuffer wurde die DNA für 66 h bei einem Feldwinkel von 120°, einer elektrischen Feldstärke von 1,5 V pro cm und Pulszeiten von 50-5.000 s bei 14°C aufgetrennt. Die Laufbedingungen wurden dabei so gewählt, dass DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 10 Mbp aufgetrennt werden konnten.

3.9.3 Gelfärbung und –dokumentation

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele über Nacht in einem Ethidiumbromidbad bei Dunkelheit und RT gefärbt und anschließend für wenige Stunden in 0,5xTBE entfärbt. Die Aufnahme der Gelbilder erfolgte unter UV-Transillumination bei 302 nm mit einem digitalen Kamerasystem und der Software „I_{sis}“ (MetaSystems, Altlußheim). Um den FAR-Wert für die Proben zu erhalten, wurde pro Spur mit Hilfe des Auswertungssystems AIDA Image Analyzer V. 3.11 in jeder Spur der Quotient der aus der Tasche herausgelaufenen DNA und der Gesamt-DNA berechnet.

3.10 KM-Studien *in vitro*

Die beiden verwendeten Kontrastmittel (KM) wurden so zugegeben, dass die Jodendkonzentration in der jeweiligen Probe immer 33 mg pro ml betrug. Dies ist eine Konzentration, wie sie maximal in der Aorta nach KM-Gabe vorkommen kann. Dies wurde mittels Phantommessungen unter Standardbedingungen am CT gemessen (mündliche Mitteilung Herr Prof. Dr. Uder und Herr Dr. Michael Küfner, Radiologisches Institut des Universitätsklinikums in Erlangen).

3.10.1 *In vitro*-Experimente mit KM an humanen Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung

Für PCC-Experimente wurde den in Flaschen kultivierten konfluenten Zellen vor Bestrahlung das KM Ultravist® mit dem Wirkstoff Iopromid zugegeben und im Medium vor der Bestrahlung gut resuspendiert.

Für PFGE-Experimente wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA-Behandlung abgelöst. Danach erfolgte die Zugabe von Iopromid. Nachdem die Zellsuspension gut resuspendiert war, wurden die Zellen bestrahlt.

Für Experimente mit Fibroblasten wurde den auf DG fixierten Zellen die KM Iopromid oder das KM Imeron® mit dem Wirkstoff Iomeprol direkt vor Bestrahlung zugegeben. Iopromid wurde ebenfalls nach Bestrahlung eingesetzt und in weiteren Proben mit 0,5 und 5 Gy vorbestrahlt, bevor es nach Bestrahlung der Zellen zugegeben wurde.

3.10.2 *In vitro*-Experimente mit KM an humanen Lymphozyten nach Röntgen- und ¹³⁷Cs- γ -Bestrahlung

Für die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wurde frisch entnommenes Blut gesunder Spender zu je 3 ml in Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt, für die Bestrahlung mit ¹³⁷Cs- γ -Bestrahlung aufgrund anderer technischer Gegebenheiten während der Bestrahlung in 5 ml-Kryoröhrchen, und anschließend bestrahlt. Iopromid oder die Negativkontrolle Mannitol wurden entweder vor oder nach Bestrahlung zugegeben. Mannitol wurde 0,43 M eingesetzt, da KM bei 37°C diese Molarität besitzt. Anschließend wurden die Proben in kleine Zellkulturflaschen überführt und diese im Brutschrank bei 37°C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil für die Dauer der Reparaturzeit inkubiert. Für Reparaturzeiten ab 2,5 h wurden die Blutproben vor der Inkubation im Verhältnis 1 zu 2 mit RPMI-Medium verdünnt. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Lymphozyten isoliert und fixiert und für die spätere Auswertung der γ H2AX-Foci mittels IFM gefärbt.

3.11 Patientenstudien

Für die Patientenstudien wurde das Reparaturverhalten der Lymphozyten von drei Patientengruppen untersucht. Hiervon bestanden die ersten beiden Gruppen aus Patienten, die eine CT-Untersuchung erhielten. Die dritte Gruppe bestand zum einen aus Spendern, die in der Strahlentherapie wegen unterschiedlichen klinischen Indikationen untersucht wurden, und zum anderen aus Patienten mit gutartigen Erkrankungen bzw. gesunden Spendern. Die Studie wurde von der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt. Ausschlusskriterien für die Patientenuntersuchung waren vergangene oder derzeit vorhandene Erkrankungen an Leukämie oder an einem Lymphom, vergangene Strahlentherapien, Röntgenuntersuchung oder Szintigraphie innerhalb der letzten drei Tage und ein Alter von unter 18 Jahren. Vor der Blutabnahme wurden alle Patienten über den Inhalt der Studie informiert und von ihnen eine Einverständniserklärung unterschrieben.

3.11.1 *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen an Lymphozyten von CT-Patienten: Patientengruppe I

Die Patienten in der ersten Patientengruppe wurden vom Radiologischen Institut des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar zur Verfügung gestellt. Für die *in vitro*-Be-

strahlung wurde den Patienten vor der CT-Untersuchung Blut entnommen, wovon ein Teil als unbestrahlte Kontrolle diente. Aus diesem Teil wurden die Lymphozyten direkt isoliert. Das restliche Blut, welches vor der Untersuchung entnommen wurde, wurde im Verhältnis 1 zu 2 mit RPMI-Medium verdünnt und in große Zellkulturflaschen überführt. Nach einer zehnmütigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre und 5% CO₂-Anteil wurden die Flaschen zeitgleich zum Patienten in der Klinik mit verschiedenen *in vitro*-Dosen bestrahlt. Danach wurde das Blut für die Dauer der Reparaturzeit wieder in den Brutschrank überführt. Nach Ablauf der verschiedenen Reparaturzeiten wurde den Flaschen je 6 ml verdünntes Blut entnommen und daraus die Lymphozyten isoliert und fixiert. Die zeitgleich erhaltenen *in vivo*-Blutproben der Patienten wurden ebenfalls im Verhältnis 1 zu 2 verdünnt und daraus ebenfalls die Lymphozyten isoliert. Für CT-Untersuchungen mit KM wurde den Patienten Ultravist 300® mit dem Wirkstoff Iopromid injiziert. Hierbei lagen die Jodmengen zwischen 27 und 49 g (im Schnitt 34,9 g).

3.11.2 *In vivo*-Untersuchungen an Lymphozyten von CT-Patienten: Patientengruppe II

Die Patienten in der zweiten Patientengruppe wurden vom Radiologischen Institut des Universitätsklinikums in Erlangen zur Verfügung gestellt. Den Patienten wurde vor der CT-Untersuchung und 0,5 h danach Blut entnommen. Das vorher entnommene Blut diente als unbestrahlte Kontrolle. Das Blut wurde direkt nach der Entnahme 1 zu 2 mit RPMI-Medium verdünnt und in Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Anschließend wurde das Blut auf 4°C herunter gekühlt und noch am gleichen Tag gekühlt über Nacht verschickt. Nach Ankunft in der Abteilung Strahlenbiologie, TU Darmstadt, wurden die Lymphozyten isoliert und fixiert. Für CT-Untersuchungen mit KM wurde den Patienten Imeron® 300 oder 350 mit dem Wirkstoff Iomeprol injiziert. Hierbei betrug die applizierte Jodmenge entweder 28 g für Patienten, die am 64-Zeilen-Scanner bestrahlt wurden, oder 30 g für Patienten, die am 10-Zeilen-Scanner bestrahlt wurden.

3.11.3 *In vitro*-Untersuchungen an Lymphozyten: Patientengruppe III

Die Patienten in Patientengruppe III wurden von der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar zur Verfügung gestellt. Das entnommene Blut wurde direkt nach der Entnahme 1 zu 2 mit RPMI-Medium verdünnt. Nach einer zehnmütigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre und 5% CO₂-Anteil wurde das Blut bestrahlt und für die Dauer der Reparaturzeit wieder in den Brutschrank überführt. Nach Ablauf der verschiedenen Reparaturzeiten wurde je 6 ml verdünntes Blut entnommen und daraus die Lymphozyten isoliert und fixiert.

3.12 Behandlung humaner primärer Fibroblasten mit H₂O₂

Für die Behandlung humaner primärer Fibroblasten mit H₂O₂ wurden konfluente, auf DG kultivierte Zellen verwendet. Vor der Behandlung wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen zweimal mit sterilem 1xPBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem 1xPBS bedeckt, in welchem sich H₂O₂ mit einer Konzentration von 10 µM befand. Darin wurden die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert. Für eine Mock-Behandlung der Zellen wurden diese ebenso behandelt, jedoch ohne H₂O₂. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das 1xPBS entfernt, die Zellen zwei Mal mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit Zellkulturmedium bedeckt (37°C). Danach wurden die Zellen für 5 min im Brutschrank bei 37°C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre und 5% CO₂-Anteil vor der weiteren Behandlung inkubiert.

3.13 Statistische Auswertung und grafische Darstellung

Alle Daten wurden als Mittelwerte plus Standardfehler oder Standardabweichung angegeben. Eine Beschreibung hierzu findet sich in den jeweiligen Bildunterschriften. Eine statistische Auswertung der Daten wurde für die Patientenstudien in Kap. 4.2 und 4.3 durchgeführt. Hierfür wurde für eine statistische Auswertung der Daten entweder ein einseitiger oder ein zweiseitiger T-Test angewendet. Welcher Test angewendet wurde, ist in den Bildunterschriften benannt. Hierbei wurden p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant angesehen. Sofern eine Signifikanz vorlag, wurde dies im Text erwähnt und in den Grafiken anhand von Sternchen angezeigt. Für die lineare Regression der Patientendaten von Patientengruppe I sowie für die Durchführung des T-Tests wurde Microsoft Excel 2007 (Redmond, Washington, USA) angewendet.

Für die grafische Darstellung der Daten wurde neben Microsoft Excel 2007 auch CorelDRAW Graphics Suite X3 (Corel Corporation, Ottawa, Canada) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von DSBs in murinen Lymphozyten mittels IFM und Anwendung der Methode auf klinische Fragestellungen

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) sind die schwerwiegendsten Läsionen, die nach Bestrahlung auftreten, da hierbei die genetische Information auf beiden DNA-Einzelsträngen unterbrochen wird. Wenn DSBs nicht oder fehlerhaft repariert werden, kann es zur Entstehung von Mutationen kommen. Seit einigen Jahren wird γ H2AX und eine Reihe weiterer Proteine der DSB-Schadensantwort, wie z. B. 53BP1, als Marker für den Nachweis von DSBs herangezogen (Rogakou et al. 1998, Bekker-Jensen et al. 2006). Diese DSB-Marker können innerhalb weniger Minuten mit Hilfe spezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM) in Form von deutlich sichtbaren Foci detektiert werden. Hierbei entspricht ein Fokus einem DSB. Dies ermöglicht es, auch nach niedrigen Dosen IR (ionisierende Strahlung) DSBs zu quantifizieren (Rothkamm & Lobrich 2003). In den letzten Jahren fand diese Methode deshalb auch in klinischen Studien Anwendung, in denen die entstandenen Strahlenschäden nach z. B. radiologischen Untersuchungen gemessen wurden. Hierbei werden vornehmlich niedrige Röntgendosen appliziert (Lobrich et al. 2005, Geisel et al. 2008).

In der Studie von Lobrich et al. (2005) wurden mittels IFM DSBs in Lymphozyten von Computertomographie (CT)-Patienten nachgewiesen. Hierbei wurden Röntgendosen von unter 20 mGy angewandt. Damit konnte zum ersten Mal *in vivo* die Anzahl der durch diagnostische Dosen an Röntgenstrahlung induzierten DSBs und deren Reparatur gemessen werden. Ein Problem bei der Messung von DSBs in Lymphozyten von CT-Patienten ist, dass während der Untersuchung nur ein Teil des Körpers, also auch nur ein Teil der Lymphozyten bestrahlt wird. Die bestrahlten Lymphozyten vermischen sich nach der Bestrahlung schnell mit unbestrahlten, sodass man sowohl initial als auch nach definierten Reparaturzeiten durch diesen Verdünnungseffekt nicht das wahre Schadenslevel messen kann. Außerdem besteht bei klinischen Studien das Problem, dass sich Patienten in ihrem genetischen Hintergrund unterscheiden, was einen Einfluss auf die gemessenen Effekte haben kann. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Sensitivität der IFM unter standardisierten Bedingungen validiert werden. Hierfür sollte in Zusammenarbeit mit dem Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar ein Mausmodell entwickelt werden, welches zum einen den Vorteil hat, dass hierbei eine Ganzkörperbestrahlung durchgeführt werden kann, ohne dass bei der Messung von Lymphozyten Verdünnungseffekte auftreten. Zum anderen besteht ein Vorteil in der Verfügbarkeit verschiedener Mausmutanten, welche definierte genetische Defekte in DSB-Reparaturproteinen aufweisen. Je nach Art der Mutation führt dies zu einer mehr oder weniger

stark ausgeprägten Strahlensensitivität, die eine eingeschränkte Reparaturfähigkeit von DSBs zur Folge hat. Die Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf die Zuverlässigkeit der Methode liefern.

4.1.1 *In vivo*-Nachweis der Induktion und Reparatur von DSBs in murinen Lymphozyten verschiedener Mausstämmen nach Röntgenbestrahlung mittels γ H2AX-IFM

Für die Messung von DSBs *in vivo* wurde zunächst die γ H2AX-Färbung in murinen Lymphozyten etabliert. Dafür wurden C57BL/6-Mäuse (Wildtyp-Mäuse, WT) mit 1 Gy bestrahlt und nach 10 min, 5 h oder 24 h das Blut der Tiere entnommen. Die Lymphozyten der Tiere wurden isoliert, auf Deckgläschen (DG) fixiert und für die γ H2AX-IFM gefärbt. Es ist zu erkennen, dass in Kernen nicht bestrahlter Zellen (K), außer wenigen spontanen Brüchen, keine weiteren DSBs in Form von γ H2AX-Foci auszumachen sind (Abb. 4.1). 10 min nach Bestrahlung mit 1 Gy haben sich durchschnittlich 12 Foci pro Zelle gebildet. Diese Anzahl nimmt mit zunehmender Reparaturzeit bis 24 h ab. Diese ersten Färbeergebnisse zeigten, dass die IFM prinzipiell in murinen Lymphozyten funktioniert. Um die Sensitivität der Methode zu testen, wurde diese anschließend in verschiedenen Mausstämmen angewandt.

In vitro konnte gezeigt werden, dass Zellen mit Defekten in den Kernkomponenten des NHEJ DSBs nur eingeschränkt reparieren, wobei je nach Defekt die Reparatur unterschiedlich ausgeprägt ist (Kuhne et al. 2004, Loblrich & Jeggo 2005). Deshalb wurde die DSB-Reparatur in Lymphozyten vier verschiedener Mausstämmen analysiert, wovon drei Mausstämmen unterschiedliche Mutationen in Komponenten der DSB-Reparatur besaßen. Es wurden reparaturprofiziente WT-Mäuse (C57BL/6-Mäuse), BALB/c-Mäuse mit einer verminderten Expression der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (DNA-PK_{CS}), A-T-Mäuse mit einem Defekt im ATM-Protein und SCID-Mäuse, die einen Defekt in der DNA-PK_{CS} aufweisen, verwendet. Es ist bekannt, dass diese Mutationen in den Mausstämmen je nach Defekt zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Strahlensensitivität führen (Biedermann et al. 1991, Okayasu et al. 2000, Kato et al. 2006). Hierbei wurden WT-Mäuse im Vorfeld als strahlenresistent, BALB/c-Mäuse als leicht strahlensensitiv, A-T-Mäuse als moderat strahlensensitiv und SCID-Mäuse als am strahlensensitivsten eingestuft.

Die Mäuse wurden an einem Linearbeschleuniger mit 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy bestrahlt, sodass durch die hohen Photonenenergien und den hierbei vornehmlich auftretenden Comptoneffekt eine homogene Bestrahlung und Dosisverteilung innerhalb jeder Maus ermöglicht wurde. Nach einer Reparaturzeit von 0,5 h, 2,5 h, 5 h, 24 h und 48 h wurde den Mäusen das Blut entnommen und nach Fixierung und IF-Färbung die Anzahl an γ H2AX-Foci als Marker für DSBs bestimmt. Für die Messung des Induktionswertes nach 5 min wurden bereits isolierte Lymphozyten verwendet und diese *in vitro* mit 90 kV-Röntgenstrahlung und mit einer Dosis von 1 Gy bestrahlt. Durch die niedrigere applizierte Dosis bei der Induktion wurde

gewährleistet, dass die Anzahl an auftretenden Foci sicher quantifizierbar ist. Der erhaltene Wert wurde anschließend in der Annahme, dass die Focianzahl linear mit der Dosis ansteigt (Rothkamm & Lobrich 2003), auf 2 Gy hochgerechnet.

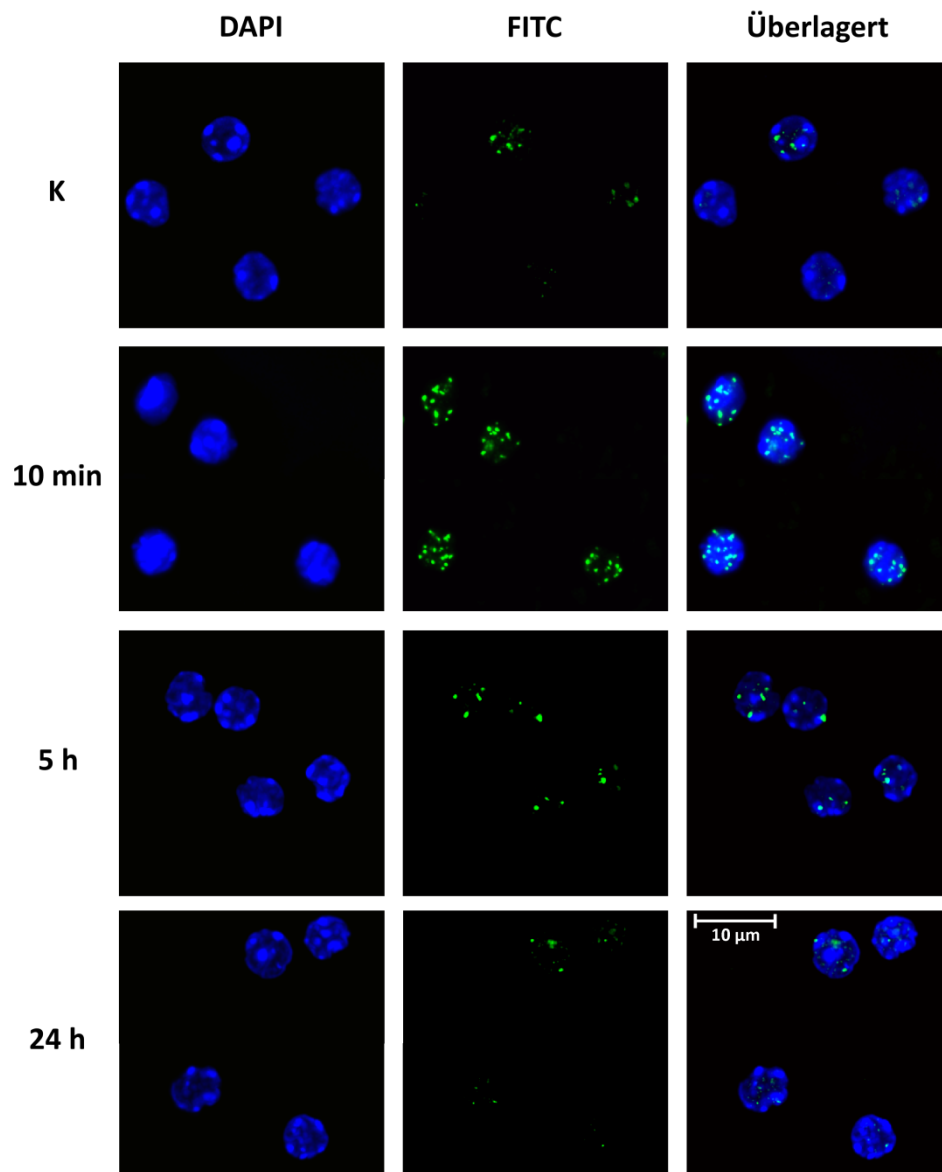


Abb. 4.1: Induktion und Reparatur von γ H2AX- Foci in murinen Lymphozyten nach 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 1 Gy *in vivo*

Aufnahmen mittels IFM muriner Lymphozyten bei 630facher Vergrößerung 10 min, 5 h und 24 h nach Bestrahlung mit 90kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 1 Gy. Zur Visualisierung der DSBs wurden die Zellen mittels FITC (Fluoresceinisothiocyanat), einem Reaktivfarbstoff, welcher gegen γ H2AX-Primärantikörper gerichtet war, markiert. Die DNA der Zellkerne wurde mit dem DNA-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt. In der Überlagerung ist zu erkennen, dass sich die DSBs in den Zellkernen befinden. Für die Bildausschnitte wurden innerhalb der Zellkerne mehrere Bildebenen fotografiert. Diese Ebenen wurden übereinander gelagert und dekonvoliert, sodass alle in den Zellkernen bestehenden Foci erfasst und klar dargestellt werden konnten.

Alle Mausstämmen wiesen ähnliche Induktionswerte von ca. 23 Foci pro Zelle auf (Abb. 4.2., Grafik rechts oben). Dies korreliert nicht Messungen, nach denen 1 Gy etwa 20 Foci pro Zelle induziert (Kegel et al. 2007). Alle Reparaturkinetiken verliefen biphasisch, d. h. sie waren in eine schnelle und eine langsame Kinetik gegliedert, was konsistent mit dem allgemeinen Modell für die Dynamik in Reparaturkinetiken ist (Iliakis 1991). Innerhalb der ersten 5 h nach Bestrahlung war in Lymphozyten von reparaturprofizienten WT-Mäusen ein rasches Absinken der Focianzahl um ca. 80% messbar. Danach flachte die Reparaturkurve ab und sank bis 48 h auf ca. 0,5 DSBs pro Zelle. In Lymphozyten von DNA-PK_{CS}-defizienten SCID-Mäusen waren sowohl nach der schnellen Phase der DSB-Reparatur, innerhalb welcher ca. 50% der Brüche repariert wurden, als auch nach der langsamen Phase deutlich höhere γ H2AX-Werte messbar als bei den anderen Mausstämmen. Nach 48 h waren bei diesem Mausstamm noch durchschnittlich 7 DSBs pro Zelle messbar, was 30% der induzierten Brüche entsprach. Die Lymphozyten von A-T-Mäusen zeigten bis 2,5 h eine ähnliche Reparaturkinetik wie die von WT-Mäusen. Nach längeren Zeiten zeigte sich jedoch ein Reparaturdefekt und 48 h nach Bestrahlung war noch ein Restschaden

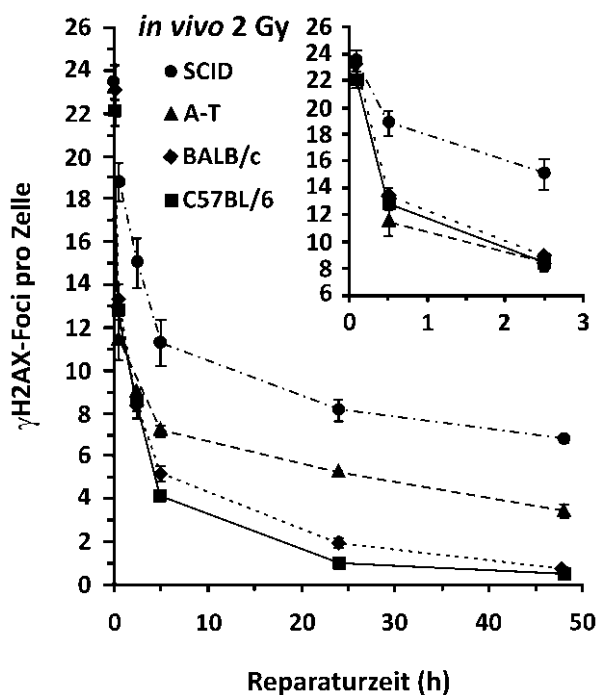


Abb. 4.2: Quantifizierung von γ H2AX-Foci in murinen Blutlymphozyten verschiedener Mausstämmen nach 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy *in vivo*

Reparaturprofiziente WT-Mäuse (C57BL/6), Mäuse mit einer verminderten Expression der DNA-PK_{CS} (BALB/c), Mäuse mit einem Defekt im ATM-Protein (A-T) und einem Defekt in der DNA-PK_{CS} (SCID) wurden mit 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy bestrahlt und die Anzahl an γ H2AX-Foci nach 0,5 h, 2,5 h, 5 h, 24 h und 48 h bestimmt. Für die Messung des Induktionswertes (5 min) wurden isolierte Lymphozyten von C57BL/6-, BALB/c- und SCID-Mäuse verwendet und diese mit 90 kV-Röntgenstrahlung und mit einer Dosis von 1 Gy *in vitro* bestrahlt. Die daraus resultierenden Fociwerte wurden auf 2 Gy hochgerechnet. Zur besseren Darstellung der Induktionen wurden die kurzen Reparaturzeitpunkte separat dargestellt (oben rechts). Die unbestrahlten Kontrollwerte betragen 0,45 Foci pro Zelle (C57BL/6), 0,68 Foci pro Zelle (SCID), 0,55 Foci pro Zelle (A-T) und 0,6 Foci pro Zelle (BALB/c) und wurden von den Reparaturwerten abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler über mindestens drei Experimente.

von 3 Foci pro Zelle zu messen. Verglichen mit den WT-Mäusen zeigten die Lymphozyten von BALB/c-Mäusen bis 5 h eine ähnliche Reparaturkinetik, wiesen nach 5 h und 24 h jedoch eine leicht verminderte DSB-Reparatur auf. 5 h nach Bestrahlung hatten BALB/c-Mäuse 25% mehr Brüche und nach 24 h doppelt so viele Brüche wie WT-Mäuse. Nach 48 h erreichten sie jedoch wieder WT-Niveau.

Zusammengefasst ließ sich die γ H2AX-IFM in murinen Lymphozyten erfolgreich etablieren. Die unterschiedliche Ausprägung der Strahlensensitivität spiegelte sich hierbei in Form eines unterschiedlichen Reparaturverhaltens der Mäuse nach Bestrahlung wider. Während SCID-Mäuse den größten Reparaturdefekt sowohl in der frühen, als auch der späten Reparaturphase zeigten, konnte der Reparaturdefekt von A-T-Mäusen erst nach längeren Reparaturzeiten detektiert werden. Selbst der geringere Reparaturdefekt leicht strahlensensitiver BALB/c-Mäuse war zu mittleren Zeitpunkten messbar, sodass sich die Methode als sehr sensitiv erwies. Die ermittelten Daten korrelieren mit bisherigen *in vitro*-Studien und der dort gefundenen unterschiedlichen Ausprägung verschiedener Mutationen in den Kernkomponenten des NHEJ (Blocher et al. 1991, Okayasu et al. 2000, Rothkamm et al. 2003, Kuhne et al. 2004), liegen in der Induktion gegenüber Messungen in humanen Zellen dagegen zu niedrig (Kegel et al. 2007).

4.1.2 *In vitro*-Experimente zum Einfluss von KM auf die Induktion und Reparatur von DSBs in humanen Lymphozyten nach Röntgen- und γ -Bestrahlung mittels γ H2AX-IFM

Nachdem durch die erfolgreiche Etablierung des IF-Verfahrens in murinen Lymphozyten die Methode validiert werden konnte, sollte es nun bei der Beantwortung klinischer Fragestellungen Anwendung finden. Die diagnostische Strahlenexposition ist die größte vom Menschen geschaffene Quelle für Röntgenstrahlung im Alltag (UNSCEAR 2000). Gerade bei CT-Untersuchungen werden vor der Bestrahlung zusätzlich Kontrastmittel (KM) injiziert, welche die Bildgebung unterstützen. Dies ist mit einer erhöhten Absorption von Strahlung verbunden. Der Grund für die erhöhte Strahlenabsorption liegt darin, dass die im KM enthaltenen Jodatome durch ihre hohe Ordnungszahl (Z) während der Strahlenabsorption eine Steigerung der Entstehung von Sekundärelektronen durch den Photoeffekt bewirken (Corde et al. 2004). Diese Sekundärelektronen könnten wiederum in die Zellen gelangen und die Entstehung von DNA-Schäden wie DSBs zur Folge haben. Dieser KM-Effekt spielt bei Photonenenergien eine Rolle, bei denen bei der Absorption der Strahlung der Photoeffekt einen großen Anteil an den Absorptionsprozessen hat (etwa 50% nach Photonenenergien von ca. 90 bis 120 keV). Die in der Röntgendiagnostik eingesetzten Photonenenergien liegen in diesem Bereich.

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Strahlenabsorption zu einem vermehrten Auftreten von DSBs in den vom KM umgebenen Zellen führt, wurden zunächst *in vitro*-Experimente mit hu-

manen Lymphozyten durchgeführt, da diese in späteren Patientenstudien ebenfalls verwendet wurden. Lymphozyten haben den Vorteil, dass sie leicht zugänglich sind und sich die Präparation und Färbung unkompliziert und effektiv durchführen lässt (Lobrich et al. 2005). Außerdem kommen diese Zellen bei einer radiodiagnostischen Bestrahlung direkt mit dem KM in Kontakt. Weiterhin befinden sich Lymphozyten vor der Stimulierung durch Krankheitserreger im G₀-Stadium des Zellzyklus, sodass dieser bei der Analyse nicht berücksichtigt werden muss.

Für die Experimente wurde gesunden Spendern Blut entnommen. Diesen Proben wurde KM mit dem Wirkstoff Iopromid (= KM 1) oder die Negativkontrolle Mannitol zugegeben (siehe Versuchsschema in Abb. 4.3). Mannitol ist eine Zuckerlösung mit ähnlichen viskosen und osmolaren Eigenschaften wie das verwendete KM. Es enthält jedoch keine Elemente mit hoher Ordnungszahl (Z). Die beiden Substanzen wurden entweder vor oder nach Bestrahlung zugegeben. Neben diesen Proben wurden auch Proben mitgeführt, die nur bestrahlt, aber ansonsten nicht behandelt wurden.

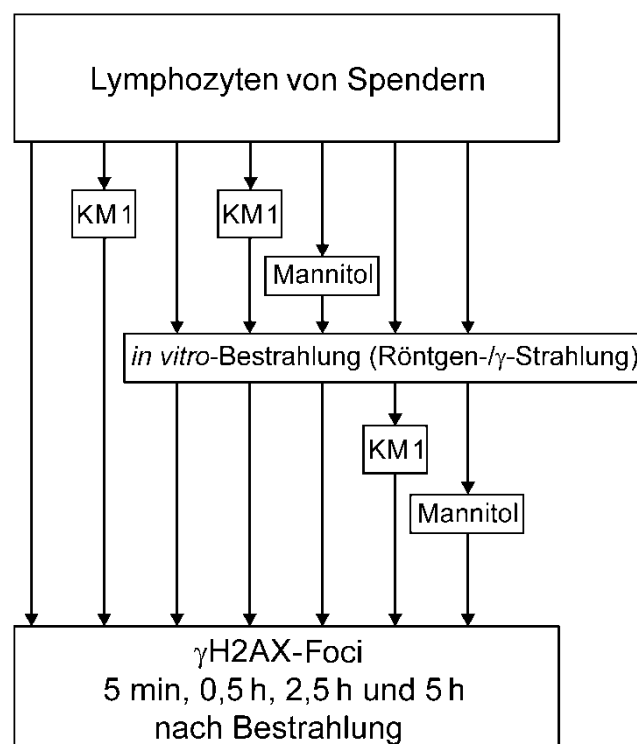


Abb. 4.3: Versuchsschema der *in vitro*-Experimente mit KM mit primären humanen Lymphozyten

Für die Lymphozytenexperimente wurde dem Blut von Spendern kein KM, KM 1 (Iopromid) oder Mannitol vor Bestrahlung zugegeben oder KM 1 oder Mannitol nach Bestrahlung zugegeben. Die Bestrahlung erfolgte entweder mit 90 kV-Röntgenstrahlung oder mit 660 kV-γ-Strahlung. Nach 0,5 h, 2,5 h und 5 h wurden die Lymphozyten aus dem Blut isoliert, fixiert und die Anzahl an γH2AX-Foci bestimmt. Für den Induktionszeitpunkt (5 min) wurden Lymphozyten behandelt und bestrahlt, welche bereits vorher aus dem Blut isoliert waren.

Um zu untersuchen, ob der KM-Effekt dosisabhängig ist, wurden zwei verschiedene Röntgendosen verwendet. Hierbei orientierte sich die Wahl der niedrigeren Dosis an Analysen mittels

γ H2AX-IFM nach CT-Untersuchungen (Lobrich et al. 2005). In dieser Studie wurde durch Vergleich der *in vivo*-Daten von der CT-Patienten mit *in vitro* gemessenen Werten festgestellt, dass sich die Anzahl an DSBs nach einem Thorax-CT mit einem Dosis-Längen-Produkt (DLP) von 500 mGy*cm mit der nach einer Dosis von 10 mGy *in vitro* vergleichen lässt. Das DLP ist eine radiodiagnostische Einheit, welche proportional zur applizierten Dosis und der bestrahlten Körperlänge ist ($DLP = CTDI_{vol} [mGy] * \text{Länge des bestrahlten Körpers [cm]}$). Aus diesem Grund wurde für die erste hier verwendete Dosis 10 mGy gewählt. Aus den gleichen Untersuchungen weiß man, dass eine Röntgendosis von 500 mGy im Schnitt acht bis zehn γ H2AX-Foci pro Zelle in Lymphozyten induziert, sodass diese als zweite Dosis ausgewählt wurde. Nach einer Reparaturzeit von 0,5 h, 2,5 h und 5 h wurden die Lymphozyten isoliert, fixiert und für die γ H2AX-IF gefärbt. Für die Messung des Induktionswertes (5 min) wurden die Lymphozyten bereits vor der Bestrahlung isoliert, um eine Reparatur während dem Isolierungsprozess zu verhindern.

Abb. 4.4 zeigt exemplarisch Aufnahmen von γ H2AX-Foci in Kernen von humanen Lymphozyten nach einer Dosis von 500 mGy und einer Reparaturzeit bis 5 h. Es ist zu erkennen, dass in Kernen nicht bestrahlter Zellen (K), außer einem spontanen Bruch, keine weiteren DSBs in Form von γ H2AX-Foci auszumachen sind. 5 min nach Bestrahlung mit 500 mGy haben sich durchschnittlich 9 Foci pro Zelle gebildet. Diese Anzahl nimmt mit zunehmender Reparaturzeit bis 5 h ab.

Die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle wurde für die unterschiedlichen Versuchsbedingungen ermittelt. Eine Bestrahlung mit 10 mGy induzierte hierbei 0,2 Foci pro Zelle, eine Dosis von 500 mGy 9,2 Foci pro Zelle (Abb. 4.5). Dies ist konsistent mit den Ergebnissen einer früheren Studie, die mit den gleichen Bestrahlungsbedingungen arbeitete (Lobrich et al. 2005) und damit, dass pro Gy Röntgenstrahlung etwa 20 Foci pro Zelle induziert werden (Kegel et al. 2007). Die Zugabe von Iopromid vor Bestrahlung mit 90 kV-Röntgenstrahlung führte zu einer Erhöhung der Focianzahl auf 0,36 γ H2AX-Foci pro Zelle nach Bestrahlung mit 10 mGy und auf ca. 15 γ H2AX-Foci pro Zelle nach Bestrahlung mit 500 mGy. Die Zugabe von KM vor Bestrahlung führte demnach dosisunabhängig zu einer Erhöhung der induzierten Focianzahl um ca. 60%.

Eine Analyse des Reparaturverhaltens nach einer Röntgendosis von 500 mGy ergab, dass bei allen Proben, denen nicht KM vor Bestrahlung zugegeben wurde, das Reparaturvermögen gleich war. 0,5 h nach Bestrahlung wurden 43% der Brüche in diesen Proben repariert, nach 2,5 h 65% und nach 5 h 84%. Nach 10 mGy sah das Reparaturverhalten ähnlich aus. 0,5 h nach Bestrahlung wurden 38% der Brüche in diesen Proben repariert, nach 2,5 h 67% und nach 5 h 82%. Auffällig war hierbei, dass nach 5 h ein residuales Focilevel von 0,05 Foci pro Zelle verblieb. Die Proben, denen vor der Bestrahlung KM zugegeben wurde, zeigten nach 500 mGy 8% mehr Brüche als die übrigen Proben. Nach 10 mGy betrug dieser Unterschied im Mittel 18%.

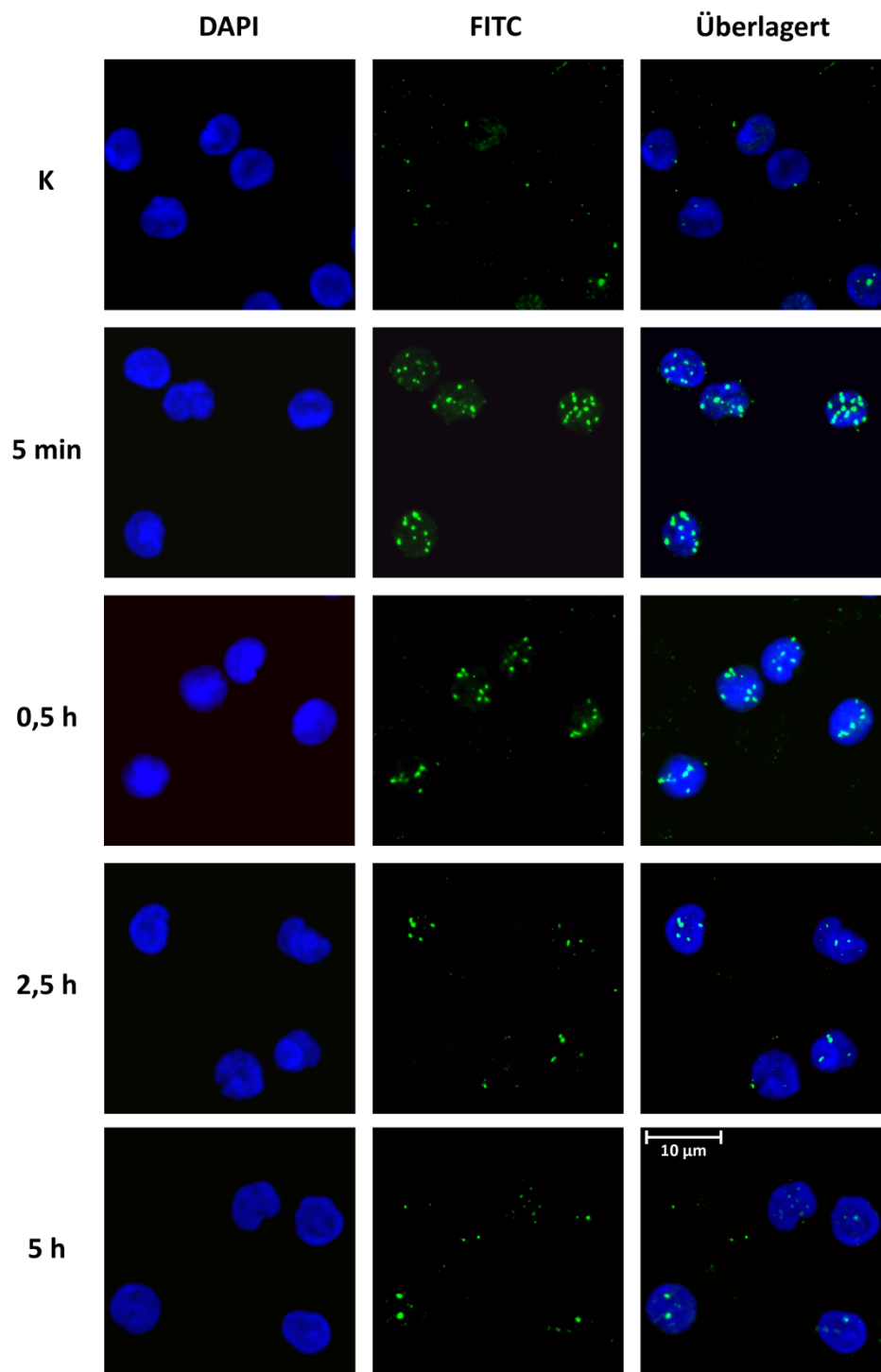


Abb. 4.4: Darstellung von γ H2AX-Foci in humanen Lymphozyten nach 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 500 mGy *in vitro*

IF-Aufnahmen humaner Lymphozyten bei 630facher Vergrößerung 5 min, 0,5 h, 2,5 h und 5 h nach Bestrahlung mit 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 500 mGy. Zur Visualisierung der DSBs wurden die Zellen mittels FITC, welches gegen γ H2AX-Primärantikörper gerichtet war, markiert. Die DNA der Zellkerne wurde mit DAPI angefärbt. In der Überlagerung ist zu erkennen, dass sich die DSBs in den Zellkernen befinden. Für die Bildausschnitte wurden innerhalb der Zellkerne mehrere Bildebenen fotografiert. Diese Ebenen wurden übereinander gelagert und dekonvolviert, sodass alle in den Zellkernen bestehenden Foci erfasst und klar dargestellt werden konnten.

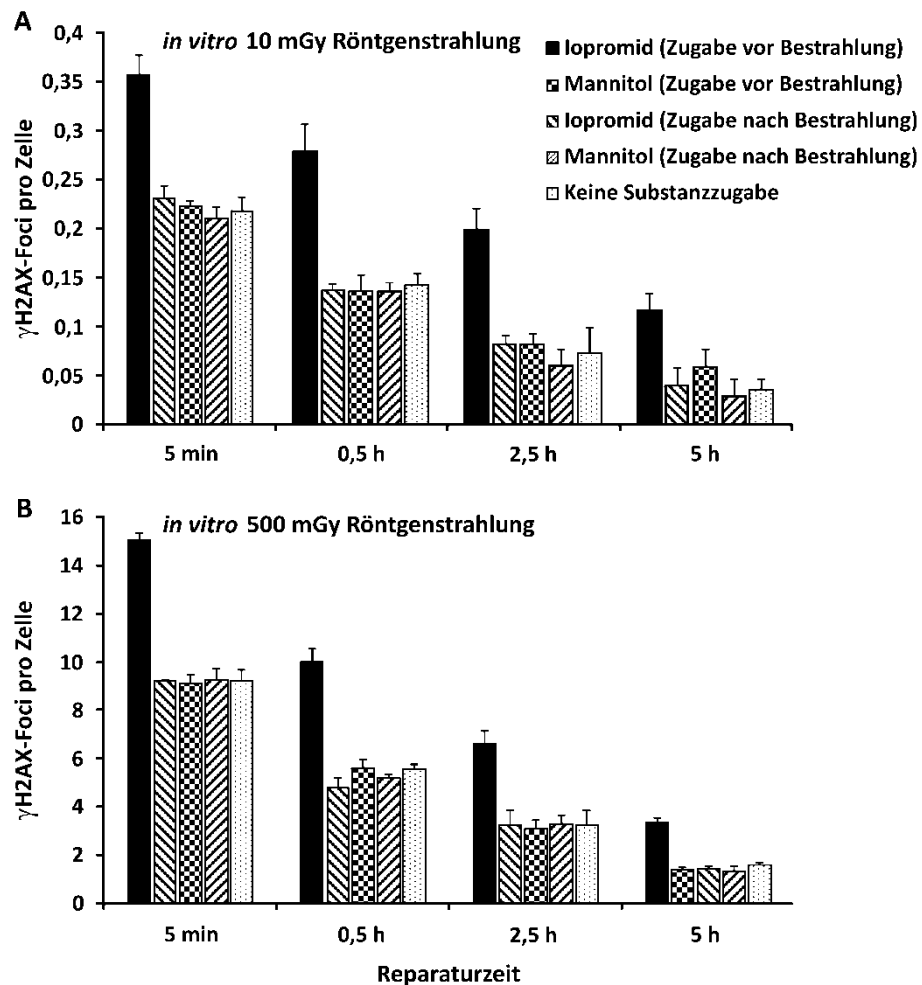


Abb. 4.5: Quantifizierung von γ H2AX-Foci nach KM-Gabe in humanen Lymphozyten nach 90 kV-Röntgenstrahlung und Dosen von 10 und 500 mGy *in vitro*.

Einfluss von KM auf die Anzahl an γ H2AX-Foci nach (A) 10 mGy und (B) 500 mGy 90 kV-Röntgenstrahlung. Dem Blut von drei gesunden Spendern wurde direkt vor oder nach der Bestrahlung KM mit dem Wirkstoff Iopromid oder die Negativkontrolle Mannitol zugesetzt. Weiterhin wurden Proben ohne Substanzzugabe mitgeführt. Nach 5 min, 0,5 h, 2,5 h und 5 h wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci bestimmt. Die Fociwerte von mit KM behandelten und unbehandelten Kontrollen (mit jeweils 0,05 bis 0,1 γ H2AX Foci pro Zelle) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler über drei unabhängige Experimente.

Zusammengefasst hatte ausschließlich eine Zugabe von KM vor Röntgenbestrahlung in Lymphozyten eine Erhöhung der Anzahl an induzierten DSBs zur Folge. Diese war bereits in der Induktion (5 min) zu erkennen. Eine Zugabe nach Bestrahlung hatte keinen Effekt. Proben, denen KM vor Bestrahlung zugegeben wurde, zeigten ein geringfügig schlechteres Reparaturverhalten als die übrigen Proben. Dies war nach 10 mGy ausgeprägter als nach 500 mGy.

Bei höheren Photonenenergien hat der Photoeffekt nur einen sehr kleinen Anteil an den Absorptionseignissen. Hierbei tritt vornehmlich der Comptoneffekt auf, welcher nur eine einfache Abhängigkeit von Z aufweist (Kiefer & Kiefer 2003). Deshalb wurde in den nachfolgenden Untersuchungen der gleiche Versuchsansatz mit höherenergetischer Strahlung durchgeführt.

Hierfür wurden die Blutproben der gleichen gesunden Spender an einer ^{137}Cs -Quelle mit 660 kV- γ -Strahlung bestrahlt.

Alle Proben wiesen 5 min nach Bestrahlung die gleiche Anzahl von ca. 7,8 γH2AX -Foci pro Zelle auf (Abb. 4.6). Dieser Wert lag etwa 15% niedriger als nach Röntgenbestrahlung mit der gleichen Dosis. Nach 0,5 h wurden in allen Proben etwa 29% der Brüche repariert, nach 2,5 h 47% und nach 5 h 73%. Das Reparaturvermögen war somit nach allen Zeitpunkten im Schnitt um 14% schlechter als nach Röntgenbestrahlung mit der gleichen Dosis.

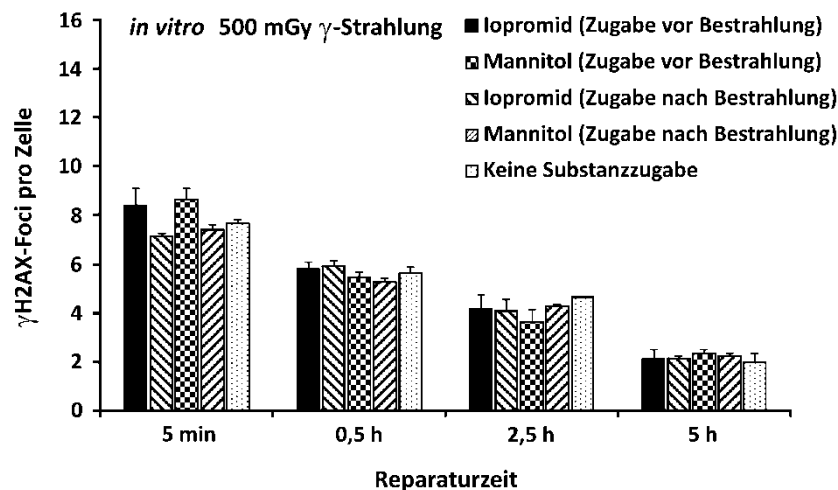


Abb. 4.6: Quantifizierung von γH2AX -Foci nach KM-Gabe in humanen Lymphozyten nach 660 kV- γ -Strahlung und einer Dosis von 500 mGy *in vitro*

Einfluss von KM auf die Anzahl von γH2AX -Foci nach 660 kV- γ -Strahlung und einer Dosis von 500 mGy. Dem Blut von drei gesunden Spendern wurde direkt vor oder nach der Bestrahlung KM mit dem Wirkstoff Iopromid oder die Negativkontrolle Mannitol zugesetzt. Weiterhin wurden Proben ohne Substanzzugabe mitgeführt. Nach 5 min, 0,5 h, 2,5 h und 5 h wurde die Anzahl an γH2AX -Foci bestimmt. Die Fociwerte von mit KM behandelten und unbehandelten Kontrollen (mit jeweils 0,05 bis 0,1 γH2AX Foci pro Zelle) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler über drei unabhängige Experimente.

Zusammengefasst hatte das Vorhandensein von KM während γ -Bestrahlung unabhängig vom Zugabezeitpunkt des KMs keinen Einfluss auf die Anzahl an γH2AX -Foci. Dies steht im Gegensatz zu den Versuchen mit 90 kV-Röntgenstrahlung und ist konsistent mit den physikalischen Theorien.

4.1.3 *In vitro*-Experimente zum Einfluss von KM auf die Induktion und Reparatur von DSBs in humanen Fibroblasten nach Röntgenbestrahlung mittels γH2AX -IFM

Nachdem der KM-Effekt in humanen Lymphozyten nachgewiesen werden konnte, wurden die Ergebnisse mit einem anderen Zelltyp validiert. Das Versuchsschema hierzu ist in Abb. 4.7 dargestellt. Für die Experimente wurde die humane WT-Fibroblastenzelllinie HSF1 verwendet. Diese wurde in konfluentem Wachstumszustand in Ab- oder Anwesenheit zweier verschiedener

jodhaltiger KM mit den Wirkstoffen Iopromid (= KM 1) oder Iomeprol (= KM 2) mit 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 1,5 Gy bestrahlt.

Eine Studie berichtet, dass ein erhöhtes Auftreten von DSBs nach Bestrahlung in Anwesenheit von KM nicht auf eine initiale DSB-Induktion, sondern auf durch die Bestrahlung entstehende zytotoxisch wirkende Spaltprodukte des KMs zurückzuführen ist (Joubert et al. 2005). Um dieser Beobachtung nachzugehen, wurden Proben mitgeführt, denen erst nach Röntgenbestrahlung KM zugegeben wurde. Dieses wurde vor der Zugabe mit 0,5 und 5 Gy bestrahlt. Nach 0,5 h, 2,5 h und 5 h wurden die Zellen für die anschließende Auswertung mit IFM fixiert und die Anzahl an γ H2AX- und 53BP1-Foci als zwei unabhängige Marker für DSBs bestimmt.

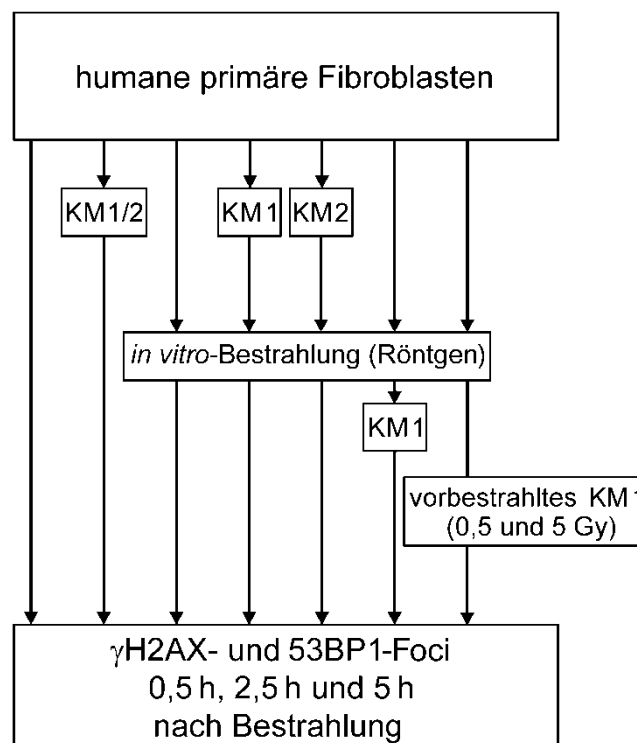


Abb. 4.7: Versuchsschema der *in vitro*-Experimente mit KM mit primären humanen Fibroblasten

Für die Fibroblastenexperimente wurde konfluent wachsenden Zellen kein KM, KM 1 (Iopromid) oder KM 2 (Iomeprol) vor Bestrahlung zugegeben oder unbestrahltes KM 1 nach Bestrahlung zugegeben. Zusätzlich wurde KM 1 mit 0,5 Gy oder 5 Gy vorbestrahlt und ebenfalls nach Bestrahlung zugegeben. Die Bestrahlung erfolgte mit 90kV-Röntgenstrahlung. Nach 0,5 h, 2,5 h und 5 h wurden die Fibroblasten fixiert und die Anzahl an γ H2AX- und 53BP1-Foci bestimmt.

In unbehandelten Proben wurden durch die Bestrahlung nach 0,5 h durchschnittlich rund 26 Foci pro Zelle induziert (Abb. 4.8). Dies traf für beide DSB-Marker zu. Das Vorhandensein von KM während der Röntgenbestrahlung führte im Falle von beiden KM zu einer Erhöhung der Anzahl an DSBs um ca. 40%. Die Proben, denen unbestrahltes oder vorbestrahltes KM nach Bestrahlung zugegeben wurde, wiesen die gleichen Werte auf wie unbehandelte Proben, so dass die Anwesenheit des KMs, ob vorbestrahlt oder nicht, keinen Einfluss auf die Entstehung von DSBs hatte. Der Reparaturverlauf der Proben, die mit KM vor Bestrahlung behandelt wur-

den, ist mit dem der restlichen Proben und für beide DSB-Marker vergleichbar. Nach 2,5 h wurden bei allen Proben und beiden Markern ca. 54% und nach 5 h 74% der Brüche repariert.

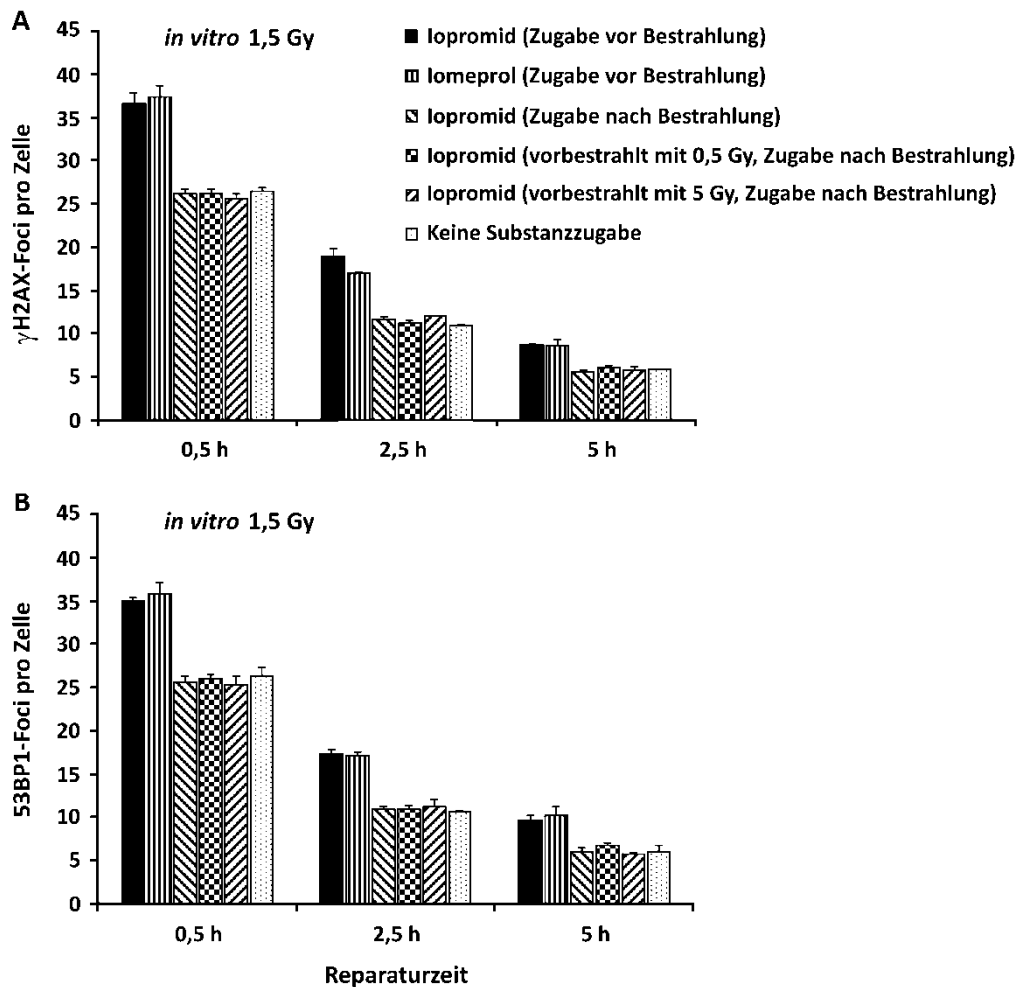


Abb. 4.8: Quantifizierung von γ H2AX- und 53BP1-Foci nach KM-Gabe in humanen Fibroblasten nach 90 kV-Röntgenstrahlung *in vitro*

Einfluss von KM auf die Induktion und Reparatur von γ H2AX- (A) und 53BP1-Foci (B) nach 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 1,5 Gy. Den Proben wurden zwei verschiedene jodhaltige KM mit den Wirkstoffen lompromid oder lomeprol direkt vor Bestrahlung, oder unbestrahltes bzw. mit 0,5 oder 5 Gy vorbestrahltes KM mit dem Wirkstoff lompromid nach Bestrahlung zugegeben. Die Fociwerte wurden nach 0,5 h, 2,5 h und 5 h bestimmt. Die Werte von mit KM behandelten und unbehandelten Kontrollen (mit jeweils 0,1 Foci pro Zelle für γ H2AX und ca. 0,5 Foci pro Zelle für 53BP1) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler über drei unabhängige Experimente.

Es konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass eine Bestrahlung mit 90 kV-Röntgenstrahlung in Anwesenheit zweier verschiedener jodhaltiger KM zu einer höheren initialen Anzahl an γ H2AX- und 53BP1-Foci als Marker für DSBs in primären humanen Fibroblasten führt. Diese Erhöhung betrug ca. 40%. Eine Zugabe von KM nach der Bestrahlung, ob vorbestrahlt oder nicht, hatte keinen Einfluss auf die Entstehung von DSBs. Proben, denen KM vor Bestrahlung zugegeben wurde, zeigten das gleiche Reparaturverhalten wie die übrigen Proben.

4.1.4 Nachweis des KM-Effekts nach Röntgenbestrahlung an humanen Fibroblasten mittels PCC und PFGE

Die IFM ist zwar ein sensitiver Nachweis für DSBs, detektiert diese aber indirekt über den Nachweis von DSB-Schadensproteinen (z. B. γ H2AX und 53BP1). Für den Nachweis des KM-Effektes wurden deshalb im Anschluss zwei weitere Methoden gewählt, die unabhängig vom IF-Ansatz auf direkte Weise das Ausmaß an DNA-Brüchen messen. Der erste Ansatz misst die Anzahl an Chromatidbrüchen mittels *premature chromosome condensation* (PCC). Hierfür wurden exponentiell wachsende humane WT-Fibroblasten (HSF1-Zellen) mit 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Dies erfolgte entweder ohne oder mit vorheriger Zugabe von KM mit dem Wirkstoff Iopromid. Um einen Einfluss möglicher Zellzykluseffekte auf die Ergebnisse zu verhindern, wurde nach Bestrahlung Aphidicolin zugegeben. Diese Substanz inhibiert die für die Replikation benötigten Polymerasen und verhindert, dass Zellen aus der S-Phase in die G2-Phase progressieren. Um die Chromosomen in der G2-Phase zu kondensieren, wurde Calyculin A zugegeben. Diese Substanz inhibiert die Aktivität der Protein-Phosphatasen 1 und 2A (PP1 und PP2A), wodurch MPF (*maturation/mitosis-promoting factor*) aktiviert und damit die vorzeitige Chromosomenkondensation eingeleitet wird.

0,5 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen fixiert, auf Objektträger aufgetropft und mit Giemsa gefärbt (Abb. 4.9 A). Anschließend wurde die Anzahl an Chromatidbrüchen pro Zelle in den vorzeitig kondensierten G2-Zellen bestimmt. Eine Bestrahlung mit 2 Gy führte zu 11,5 Chromatidbrüchen pro Zelle (Abb. 4.9 B). Die Zugabe von KM mit dem Wirkstoff Iopromid vor Röntgenbestrahlung hatte eine Erhöhung der Anzahl an Chromatidbrüchen um ca. 50% auf 17 Brüchen pro Zelle zur Folge.

Aus der Literatur ist bekannt, dass nur jeder dritte bis sechste DSB zu einem Chromatidbruch führt (Cornforth & Bedford 1993). Die hier gemessenen 11,5 PCC-Brüche in G2-Zellen nach 2 Gy entsprechen somit ca. 34 bis 69 DSBs in Zellen der gleichen Zellzyklusphase. Mittels IF-Analyse wurden in unbehandelten G0-Zellen 0,5 h nach Bestrahlung mit 1,5 Gy ca. 26 Foci pro Zelle gemessen. Wenn man diese DSB-Anzahl von 26 Foci pro Zelle nach 1,5 Gy auf eine mit 2 Gy bestrahlte G2-Zelle hochrechnet, so würde man eine Induktion von 70 DSBs erwarten. Somit korrelieren die ermittelten 11,5 PCC-Brüche mit der oberen Grenze an zu erwarteten DSBs.

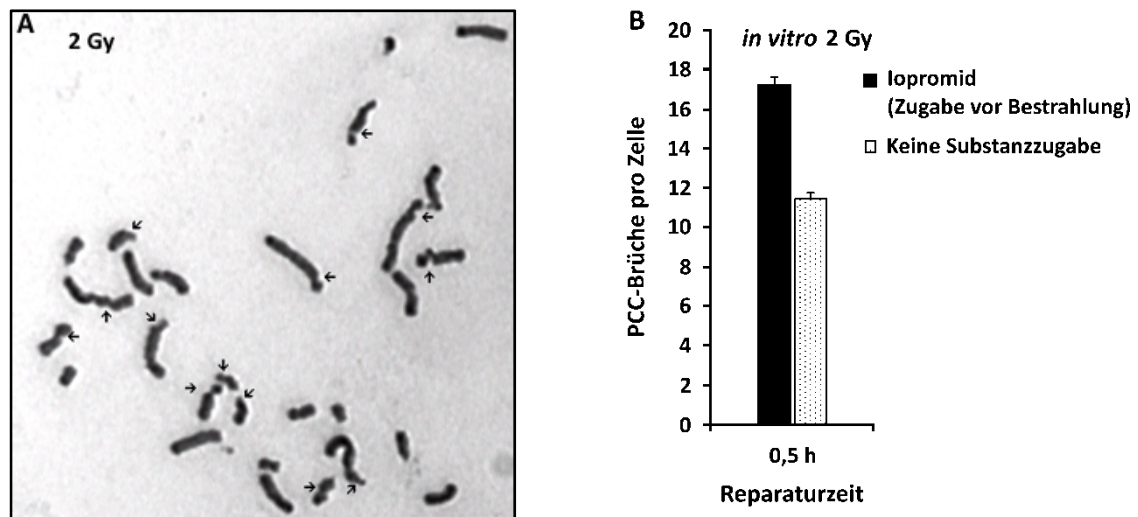


Abb. 4.9: Quantifizierung von Chromatidbrüchen mittels PCC-Analyse nach KM-Gabe in humanen Fibroblasten nach 90 kV-Röntgenstrahlung und 2 Gy *in vitro*

Repräsentativer Teil einer Chromosomenspreitung einer mit 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy bestrahlten Zelle (A). Die Chromatidbrüche sind mit Pfeilen markiert. Für die Quantifizierung der Chromatidbrüche (B) wurde den Proben entweder KM mit dem Wirkstoff Iopromid direkt vor Bestrahlung oder keine Substanz zugegeben. Anschließend wurde die Anzahl an PCC-Brüchen nach 0,5 h bestimmt. Die Anzahl an PCC-Brüchen von mit KM behandelten und unbehandelten Kontrollen (jeweils 0,9 PCC-Brüche pro Zelle) wurde abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler über 100 ausgewertete Zellen.

Der zweite Ansatz zur Messung von DSBs war die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE). Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente, die durch DSBs entstehen, in einem elektrischen Feld über ein Agarosegel aufgetrennt. Zur Quantifizierung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Verhältnis von aus der Tasche herausgelaufener DNA (sichtbar als Schmier, Abb. 4.10 A), zur Menge an in der Tasche befindlicher DNA berechnet und dieses Verhältnis als FAR-Wert angegeben (Abb. 4.10 B).

Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, dass nach der Bestrahlung keine Reparatur stattfinden konnte, sodass die initiale Anzahl an DSBs gemessen wurde. Humane WT-Fibroblasten (HSF1-Zellen) wurden mit 90 kV-Röntgenstrahlung und Dosen von 5, 10, 20 und 30 Gy bestrahlt und direkt nach Bestrahlung geerntet. Bei zwei weiteren Proben wurde vor der Bestrahlung mit 10 und 20 Gy KM mit dem Wirkstoff Iopromid zugegeben. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen lysiert, die DNA mittels PFGE aufgetrennt und nach der Färbung mittels Ethidiumbromid die FAR-Werte der einzelnen Spuren bestimmt. Es war zu erkennen, dass die FAR-Werte mit der Dosis anstiegen und die Induktionskurve bei höheren Dosen abflachte (Abb. 4.10 B).

Die Zugabe von KM bewirkte bei den entsprechenden Proben eine Erhöhung des FAR-Wertes. Hierbei war bei der mit 10 Gy bestrahlten Probe das Schadensniveau annähernd mit der mit 20 Gy bestrahlten Probe vergleichbar, während die mit 20 Gy bestrahlte Probe größer war als die 30 Gy-Probe aus der Induktionsreihe und eher auf dem Niveau einer 40 Gy-Induktionsprobe lag. Das KM hatte daher nach diesen Ergebnissen eine Erhöhung der DSB-Anzahl um ca. 100%

zur Folge, was höher ausfiel als bei den mit IFM und PCC erhaltenen Ergebnissen. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass diese Methode Unterschiede in der DSB-Anzahl nicht so sensitiv misst wie die beiden vorherig angewandten Methoden.

Insgesamt konnte mittels zweier methodischer Ansätze, welche unabhängig von der IFM direkt das Ausmaß an DSBs (PFGE) und Chromatidbrüchen (PCC-Analyse) messen, die mittels IFM erhaltenen Ergebnisse bestätigt und gemessen werden, dass die Anwesenheit von KM während 90 kV-Röntgenstrahlung eine Erhöhung der initialen Schadensantwort zur Folge hat.

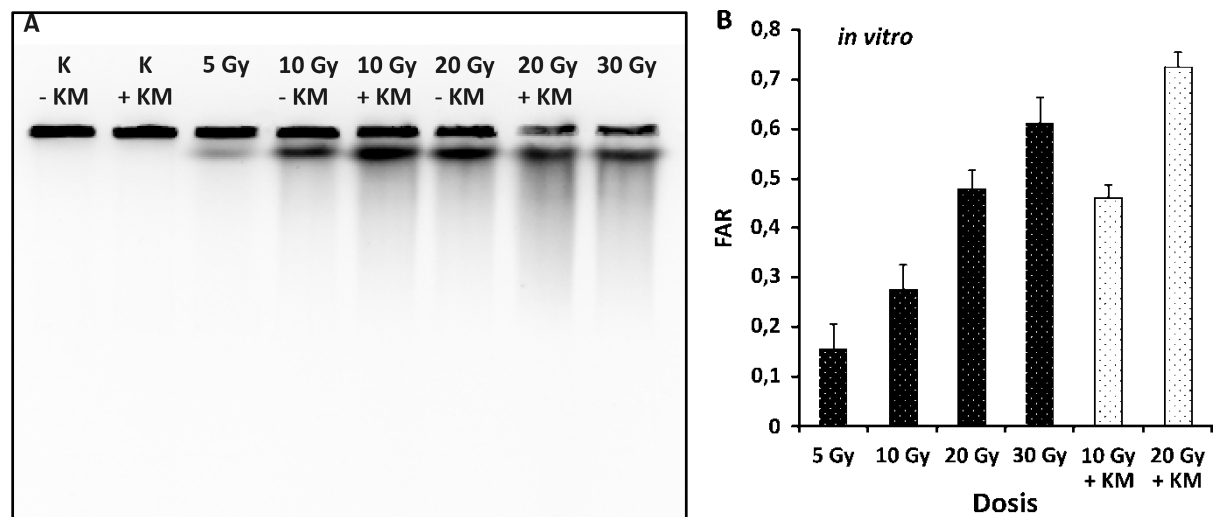


Abb. 4.10: Durchführung von PFGE zur Messung des KM-Effektes in humanen Fibroblasten nach 90 kV-Röntgenstrahlung und verschiedenen Röntgendosen

Ethidiumbromid-gefärbtes Pulsfeld-Gel konfluenter primärer Fibroblasten nach Bestrahlung in An- oder Abwesenheit von KM (A) und berechnete FAR-Werte in Abhängigkeit von der Dosis (B). Die FAR-Werte der mit Iopromid behandelten und unbehandelten Kontrollen (die FAR-Werte betragen jeweils 0,05) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler über mindestens drei Experimente.

Zusammenfassend konnte in allen *in vitro*-KM-Experimenten beobachtet werden, dass die Zugabe von KM vor Bestrahlung mit Röntgenstrahlung zu einer Erhöhung der initialen Anzahl an DSBs führt. Dies wurde sowohl in unterschiedlichen Zelltypen als auch mittels unterschiedlicher Methoden gezeigt. Eine Zugabe von KM nach Bestrahlung hatte keinen Einfluss auf die DSB-Entstehung. Während bei den Fibroblastenexperimenten die Proben, denen KM vor Bestrahlung zugegeben wurde, ein ebenso gutes Reparaturverhalten aufwiesen wie die übrigen Proben, zeigten die gleichen Proben bei Lymphozyten ein schlechteres Reparaturverhalten.

4.2 Untersuchung des KM-Effekts *in vivo* an humanen Lymphozyten

Nachdem erneut gezeigt werden konnte, dass γ H2AX ein sehr sensitiver DSB-Marker ist, der auch *in vivo* funktioniert, sollte der *in vitro* gemessene KM-Effekt auch *in vivo* an CT-Patienten untersucht werden. Hierfür wurde zuerst die Anzahl an γ H2AX-Foci in Lymphozyten von Patientengruppe I untersucht (Tab. 4.1). Diese Gruppe bestand aus 27 Individuen, welche eine Be-

strahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung an einem CT erhielten. Davon erhielten 26 Patienten ein Thorax-CT in einer Phase (d. h. das betreffende Körperareal wurde einmal gescannt) und ein Patient ein Thorax-Abdomen-CT, ebenfalls in einer Phase.

Tab. 4.1: Patientencharakteristiken und Untersuchungsparameter der Patientengruppe I

Patientengruppe I		
	nativ	mit KM
Patientencharakteristiken		
Anzahl (mittleres Alter, Altersverteilung)	14 (66,9 Jahre, 48-74)	13 (63,5 Jahre, 19-84)
Frauen (mittleres Alter, Altersverteilung)	2 (71 Jahre, 71-71)	3 (69 Jahre, 63-74)
Männer (mittleres Alter, Altersverteilung)	12 (66,3 Jahre, 48-74)	10 (61,9 Jahre, 19-84)
Patienten mit bösartiger Erkrankung	1	5
Patienten mit gutartiger Erkrankung	13	8
Untersuchungsparameter		
CT-Typ	14 Thorax-CTs	12 Thorax-CTs, 1 Thorax-Abdomen-CT
mittleres CTDi/vol (Verteilung)	13,3 mGy (12,3-13,8)	13,1 mGy (10,3-13,7)
Mittleres DLP (Verteilung)	470 mGy*cm (425-547)	480 mGy*cm (350-528 + ein Patient mit 931)
mittlere verabreichte Jodmenge (Verteilung)	keine	34,9 g (27-49 g)

4.2.1 *In vivo*- und *in vitro*-Nachweis der Induktion und Reparatur von DSBs in humanen Lymphozyten der Patientengruppe I mittels γ H2AX-IFM

Zunächst wurde die DSB-Induktion und das Reparaturverhalten der Patientengruppe I untersucht. Vor der Bestrahlung wurde allen Patienten der Patientengruppe I Blut entnommen, welches als unbestrahlte Kontrolle diente (siehe Versuchsaufbau, Abb. 4.11). Zu definierten Zeitpunkten nach der CT-Untersuchung wurde wieder Blut entnommen und die Anzahl an γ H2AX-Foci in den Lymphozyten bestimmt. Da in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, dass nach einer CT-Untersuchung des Thorax die maximale Anzahl an DSBs nach 0,5 h erreicht wird

(Lobrich et al. 2005), wurden die ersten Datenpunkte *in vivo* nach 0,5 h gemessen. Die übrigen Reparaturzeiten endeten 1 h, 2,5 h und 5 h nach der CT-Untersuchung. Nach 1 h betrug die Anzahl der *in vivo*-Daten 25, da aus technischen Gründen zwei Datenpunkte ausgefallen waren.

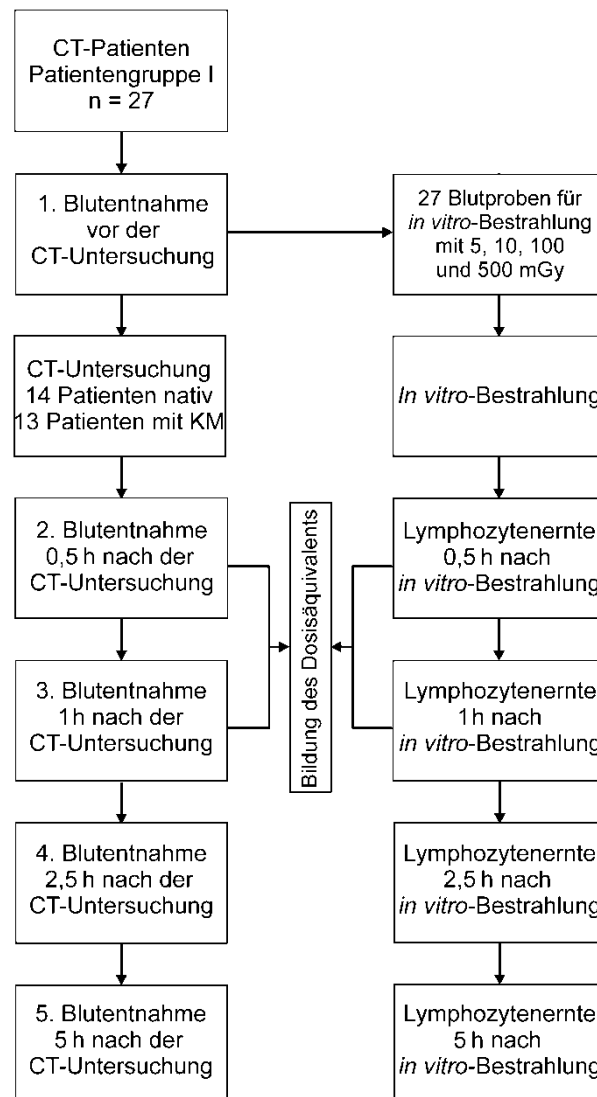


Abb. 4.11: Versuchsaufbau der CT-Patientenstudien mit Patientengruppe I

Schematischer Versuchsaufbau der CT-Patientenstudien mit Patientengruppe I. Den Patienten wurde vor dem CT Blut entnommen, welches zum einen als unbestrahlte Kontrolle diente und zum anderen auf *in vitro*-Proben aufgeteilt wurde. Diese wurden mit 90 kV-Röntgenstrahlung und Dosen von 5, 10, 100 und 500 mGy zeitgleich zur CT-Untersuchung der Patienten bestrahlt. Nach 0,5 h, 1 h, 2,5 h und 5 h wurde für die *in vivo*-Reparaturproben erneut Blut entnommen und diese Lymphozyten zusammen mit den *in vitro*-bestrahlten Lymphozyten isoliert, fixiert und gegen γ H2AX gefärbt.

Zunächst wurde die gemessene Focianzahl *in vivo* gegen das DLP aufgetragen (Abb. 4.12). Das DLP ist eine radiodiagnostische Einheit, welche proportional zur applizierten Dosis und der bestrahlten Körperlänge ist ($DLP = CTDI_{vol} [mGy] \cdot \text{Länge des bestrahlten Körpers [cm]}$). Es misst die kumulative Dosis (totale Energie), der ein Patient ausgesetzt ist. Diese Einheit berücksichtigt insofern sowohl die mittlere applizierte Ortsdosis innerhalb des Untersuchungsvolumens (= CT-Dosisindex, $CTDI_{vol}$), als auch die Länge des abgescannten Körpers.

Es war zu erkennen, dass trotz ähnlicher DLP-Werte die Focianzahl zwischen den Patienten stark streute. Die Streuung machte nach 0,5 h einen Faktor von 3 aus, die mittlere induzierte Focianzahl pro Zelle lag hierbei zwischen 0,1 und 0,22. 1 h nach Bestrahlung war die Streuung ähnlich hoch, die Werte lagen zwischen 0,07 und 0,24 Foci pro Zelle. Nach Analyse der längeren Reparaturzeiten war zu erkennen, dass die Streuung sich verringerte. 2,5 h nach Bestrahlung schwankten die *in vivo*-Werte zwischen 0 und 0,1 Foci pro Zelle und 5 h nach Bestrahlung zwischen 0,03 und 0,05 Foci pro Zelle. Weiterhin war zu sehen, dass die erhaltenen γ H2AX-Foci pro Zelle *in vivo* mit zunehmender Reparaturzeit absanken.

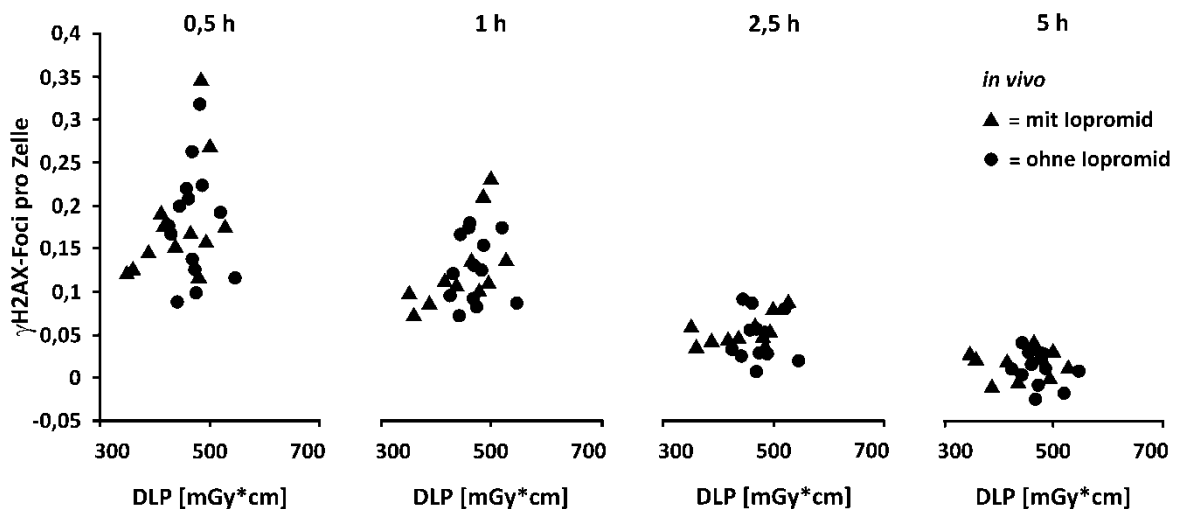


Abb. 4.12: Quantifizierung von γ H2AX-Foci nach KM-Gabe in humanen Lymphozyten nach 120 kV-Röntgenstrahlung am CT *in vivo*

Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci pro Zelle nach CT-Untersuchung *in vivo* von 27 CT-Patienten. Den Patienten wurde vor der Untersuchung Blut entnommen, welches als unbestrahlte Kontrolle diente. Weiterhin wurde 0,5 h, 1 h, 2,5 h und 5 h nach der Untersuchung Blut entnommen und die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle bestimmt. Diese wurde gegen das individuelle DLP der Patienten aufgetragen. Kreise symbolisieren Patienten, die nativ bestrahlt wurden; Dreiecke symbolisieren solche Patienten, denen KM mit dem Wirkstoff Iopromid vor der Bestrahlung zugegeben wurde. Ein Patient, dessen DLP 931 mGy*cm betrug, ist nicht dargestellt. Dessen Werte betragen nach 0,5 h 0,129, nach 2,5 h 0,049 und nach 5 h 0,008 Foci pro Zelle. Die Fociwerte der unbestrahlten Kontrollen jedes einzelnen Patienten (0,05 bis 0,1 γ H2AX-Foci pro Zelle) wurden vor der Auftragung der Daten abgezogen.

Um die *in vivo*-induzierten DSBs und deren Reparatur einschätzen zu können, wurde für jeden der 27 CT-Patienten parallel zur CT-Untersuchung die Induktion und Reparatur der Lymphozyten nach *in vitro*-Bestrahlung untersucht. Hierfür wurde von dem Blut, welches vor dem CT entnommen wurde, ein Teil auf verschiedene *in vitro*-Proben aufgeteilt und mit 5, 10, 100 oder 500 mGy 90 kV-Röntgenstrahlung bestrahlt. Diese *in vitro*-Proben enthielten demnach kein KM, da dem Patienten das KM nach der ersten Blutentnahme direkt vor der Untersuchung injiziert wurde. Die Bestrahlung der *in vitro*-Proben erfolgte zeitgleich zum Patienten in der Klinik. 0,5 h, 1 h, 2,5 h und 5 h nach der CT-Untersuchung bzw. der *in vitro*-Bestrahlung wurde den Patienten abermals Blut entnommen und die Lymphozyten daraus zusammen mit den *in vitro*-bestrahlten

Lymphozyten isoliert, fixiert und die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle bestimmt (Abb. 4.13 A und B). Die *in vitro*-Daten nach 5 und 10 mGy und 1 h Reparaturzeit resultieren von 25 CT-Patienten, da aus technischen Gründen bei zwei Patienten keine Auswertung vorgenommen werden konnte.

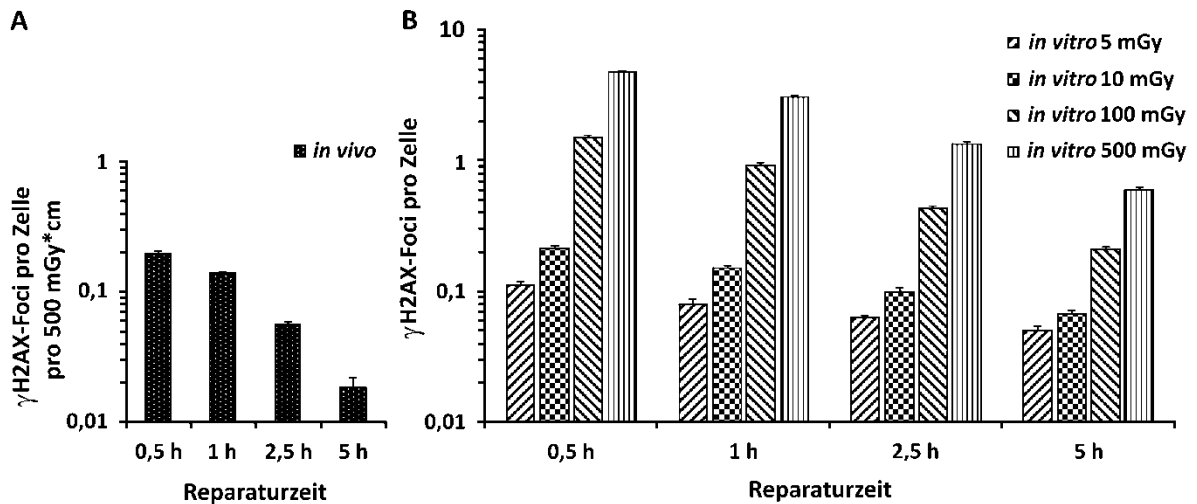


Abb. 4.13: Quantifizierung von γ H2AX-Foci pro Zelle pro 500 mGy in humanen Lymphozyten nach CT-Untersuchung mit 120 KV-Röntgenstrahlung *in vivo* und der Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle nach verschiedenen Dosen an 90 kV-Röntgenstrahlung *in vitro*

Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci pro Zelle pro 500 mGy*cm nach CT-Untersuchung mit 120 kV-Röntgenstrahlung *in vivo* (A) und Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle nach verschiedenen Dosen an 90 kV-Röntgenstrahlung *in vitro* (B) von 27 CT-Patienten. Den Patienten wurde 0,5 h, 1 h, 2,5 h und 5 h nach der Untersuchung Blut entnommen, die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle bestimmt und auf ein DLP von 500 mGy*cm normiert (A). Parallel zum Patienten wurden Blutproben, welche vor dem CT entnommen wurden, mit verschiedenen Dosen *in vitro* bestrahlt und nach den gleichen Reparaturzeiten die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle bestimmt (B). Die Focianzahl der individuellen unbestrahlten Kontrolle (0,05 bis 0,1 γ H2AX-Foci pro Zelle) wurde vorher jeweils abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Aus einer früheren Studie ist bekannt, dass die Anzahl an *in vivo* gemessenen DSBs linear mit dem DLP ansteigt (Lobrich et al. 2005). Um die Patienten untereinander vergleichen zu können, wurden die individuellen DLPs der Patientengruppe I deshalb auf ein DLP von 500 mGy*cm normiert und gemittelt (Abb. 4.13 A). Es ist zu erkennen, dass die Anzahl an DSBs *in vivo* 0,5 h nach Bestrahlung mit 0,2 Foci pro Zelle auf dem Niveau der mit 10 mGy bestrahlten *in vitro*-Probe lag. Dies ist konsistent mit Daten von Lobrich et al. (2005). Im Reparaturverlauf wurden *in vivo* nach 1 h ca. 30%, nach 2,5 h ca. 72% und nach 5 h 91% der Brüche repariert. Dieser Reparaturverlauf ähnelte sehr stark den Reparaturverläufen nach 100 mGy und 500 mGy *in vitro* (Abb. 4.13 B). Ein Vergleich der Induktionswerte der *in vitro*-Dosen untereinander ergab, dass nach 10 mGy mit 0,22 Foci pro Zelle ca. doppelt so viele DSBs induziert wurden wie nach 5 mGy. Eine lineare Extrapolation zu den beiden höheren Dosen sollte demnach 2 Foci pro Zelle nach 100 mGy und 10 Foci pro Zelle nach 500 mGy erbringen. Die gemessenen Werte wichen mit 1,46 Foci pro Zelle um 27% (für 100 mGy) und mit 4,8 Foci pro Zelle um ca. 50% (für 500 mGy) davon ab. In der Reparatur wurden nach niedrigen Dosen (5 mGy und 10 mGy

in vitro) 1 h nach Bestrahlung ca. 30% der Brüche repariert, nach 2,5 h 45% (nach 5 mGy) bis 54% (nach 10 mGy) und nach 5 h 55% (nach 5 mGy) bis 70% (nach 10 mGy). Nach niedrigen Dosen *in vitro* zeigten Lymphozyten demnach ein schlechteres Reparaturverhalten als nach höheren Dosen.

Die Patienten wurden entweder nativ, also ohne KM-Gabe bestrahlt, oder sie bekamen direkt vor der Untersuchung intravenös KM mit dem Wirkstoff Iopromid verabreicht. Von den 27 CT-Patienten wurden 14 Patienten nativ bestrahlt, 13 Patienten bekamen KM vor der Untersuchung. Da in den vorherigen Kapiteln gezeigt wurde, dass eine Bestrahlung in Anwesenheit von KM *in vitro* die Induktion von DSBs erhöht, wurden im Folgenden diese beiden Patientengruppen miteinander verglichen (Abb. 4.14). Hierfür wurden die *in vivo*-Werte aus Abb. 4.13 (A) in native Patienten und solche mit KM-Gabe vor CT-Untersuchung aufgeteilt und gemittelt. Nach 0,5 h wiesen beide Gruppen ca. 0,19 Foci pro Zelle auf, sodass die Zugabe von KM vor der CT-Untersuchung bei dieser Reparaturzeit im Gegensatz zu den *in vitro*-KM-Experimenten aus Kap. 4.1.2 bis 4.1.4 nicht zu einer höheren Induktion von γ H2AX-Foci führte. Mit zunehmender Reparaturzeit lagen die Werte nativ bestrahlter Patienten jedoch etwas niedriger als die von KM-Patienten. Die Größe der Fehlerbalken, die sowohl mit der Standardabweichung (Abb. 4.14 A) als auch mit Standardfehler dargestellt wurden (Abb. 4.14 B), weisen jedoch auf große interindividuelle Unterschiede zwischen den Patienten hin.

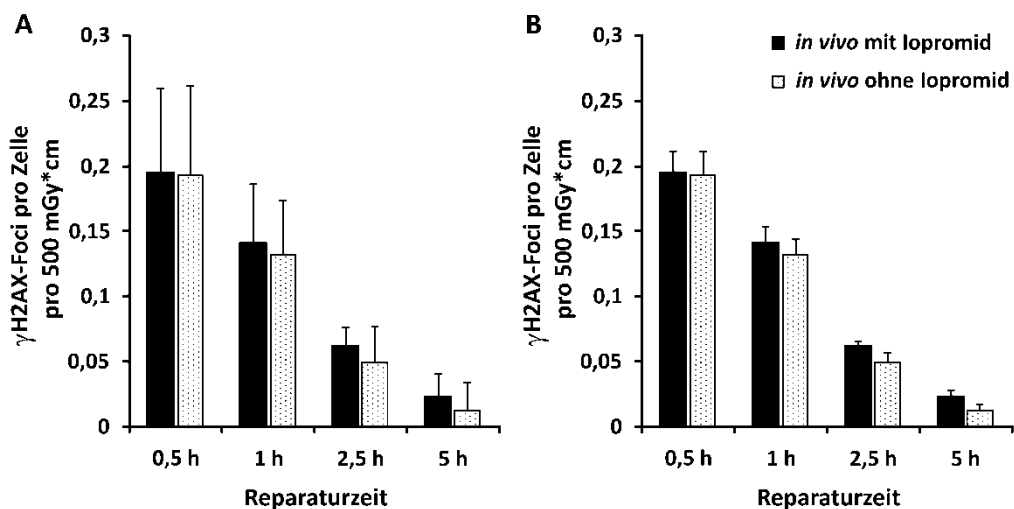


Abb. 4.14: Quantifizierung von γ H2AX-Foci pro Zelle pro 500 mGy*cm in humanen Lymphozyten nach CT-Untersuchung bei nativ bestrahlten Patienten und solchen mit KM-Gabe *in vivo*

Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci pro Zelle pro 500 mGy*cm nach CT-Untersuchung *in vivo*. Die in Abb. 4.13 A gezeigten Werte wurden für A und B in Patienten mit KM-Administration vor CT-Untersuchung und in nativ bestrahlte Patienten unterteilt und die Werte gemittelt. Die Daten mit KM resultieren von 13, die Daten ohne KM von 14 CT-Patienten. Die Focianzahl von unbestrahlten Kontrollen (0,05 bis 0,1 γ H2AX-Foci pro Zelle) wurde abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung für A und den Standardfehler für B.

Deshalb wurden im Folgenden die *in vitro*-Werte der Patienten einer genaueren Betrachtung unterzogen. Da die DSB-Anzahl der *in vivo*-Daten nach 0,5 h und 1 h mit den 5 und 10 mGy

in vitro-Daten vergleichbar waren (Abb. 4.13 A und B), wurden diese *in vitro*-Dosen herangezogen, um die DSB-Schadensantwort der beiden CT-Patientengruppen zu analysieren. Hierfür wurden die *in vitro*-Werte in native Patienten und solche mit KM-Gabe vor CT-Untersuchung aufgeteilt (Abb. 4.15). Die Aufteilung lässt erkennen, dass die Patientengruppe, welche nativ bestrahlt wurde, verglichen mit Patienten mit KM-Gabe vor CT, *in vitro* nach beiden Dosen eine leicht erhöhte DSB-Schadensantwort in Form von mehr DSBs pro Zelle aufwies. Dieser Unterschied war nach 5 mGy und einer Reparaturzeit von 0,5 h mit 16% am größten. Nach einer Dosis von 10 mGy betrug der Unterschied nach 0,5 h 14%, nach 1 h 23% und nach 5 h 38%.

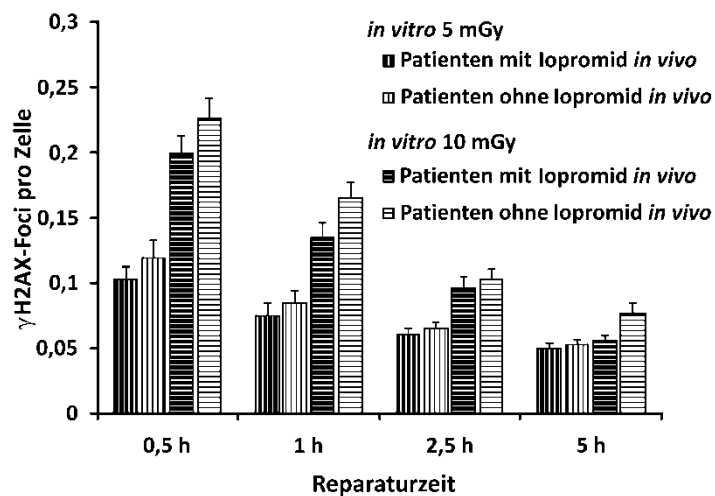


Abb. 4.15: Quantifizierung von γ H2AX-Foci pro Zelle in humanen Lymphozyten nativ bestrahlter Patienten und solchen mit KM-Gabe *in vivo* nach 90 kV-Röntgenbestrahlung *in vitro*

Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci pro Zelle nach *in vitro*-Bestrahlung mit 90 kV-Röntgenstrahlung und Dosen von 5 und 10 mGy. Die in Abb. 4.13 gezeigten Werte wurden in Patienten mit KM-Administration vor CT-Untersuchung und in nativ bestrahlte Patienten unterteilt und die Werte gemittelt. Die Daten mit KM stammen von 13, die Daten ohne KM von 14 CT-Patienten. Die Focianzahl von unbestrahlten Kontrollen (0,05 bis 0,1 γ H2AX-Foci pro Zelle) wurde abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger T-Test angewendet.

Zusammenfassend konnten die von Loblrich et al. (2005) zuvor erzielten Ergebnisse bestätigt werden. Diese beinhalteten die Beobachtung, dass nach Vergleich der *in vivo*- mit den *in vitro*-Daten ein Thorax-CT mit einem DLP von 500 mGy*cm in der Induktion mit einer *in vitro*-applizierten Dosis von ca. 10 mGy vergleichbar ist. Dies konnte diesmal für jeden einzelnen Patienten aufgrund seiner persönlichen mitgeführten *in vitro*-Proben gemessen werden. Der Reparaturverlauf *in vivo* war hierbei mit dem nach 500 mGy *in vitro* vergleichbar. Beim Reparaturverlauf der *in vitro*-Proben zeigte sich, dass nach niedrigen Röntgendosen das Reparaturverhalten im Gegensatz zu höheren Dosen und zu der Reparatur *in vivo* eingeschränkt war, sodass nach 5 h ein residuales Focilevel verblieb.

Ein Vergleich der initialen Anzahl an DSBs *in vivo* zwischen nativ bestrahlten Patienten und solchen mit KM-Gabe erbrachte keinen Unterschied. Im Vergleich der *in vivo*-Daten erwiesen sich die interindividuellen Unterschiede hierbei als relativ groß. Erst ab einer Reparaturzeit von 1 h

war ein leichter Unterschied darin zu erkennen, dass KM-Patienten eine erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci aufwiesen. Nach Vergleich der Reparatur *in vitro* nach Dosen von 5 und 10 mGy zeigte sich, dass die nativ bestrahlte Patientengruppe gegenüber der mit KM-Gabe eine leicht erhöhte Anzahl an DSBs pro Zelle aufwies.

4.2.2 Bildung der Dosisäquivalente von Patientengruppe I

Der Vergleich der beiden Gruppen (nativ bestrahlte Patienten und Patienten mit KM-Gabe) innerhalb der Patientengruppe I zeigte große interindividuelle Unterschiede im Reparaturvermögen auf, welcher möglicherweise die Detektion eines KM-Effektes *in vivo* beeinträchtigen könnte. Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit für die Auswertung der *in vivo*-Daten die individuelle DSB-Schadensantwort jedes einzelnen Patienten nach *in vitro*-Bestrahlung berücksichtigt. Hierfür wurden die individuellen *in vivo*-Werte jedes einzelnen Patienten auf seine persönlichen *in vitro*-Werte normiert. Da die *in vivo*-Werte nach 0,5 h und 1 h mit den beiden niedrigsten Röntgendosen vergleichbar waren, wurde für das Normierungsverfahren mittels linearer Regression über die 5 und 10 mGy-*in vitro*-Daten die individuelle Steigung für jeden Patienten ermittelt. Anschließend wurde der Quotient aus den *in vivo*-Werten und der Steigung gebildet. Dadurch konnte für jeden Patienten sein persönliches Dosisäquivalent gebildet werden. Dieses sagt aus, mit welcher *in vitro*-Dosis das *in vivo* gemessene Focilevel vergleichbar ist. Die erhaltenen Dosisäquivalente wurden in nativ bestrahlte Patienten und solche mit KM-Gabe aufgeteilt und gemittelt (Abb. 4.16 A und B). Die Werte sind sowohl mit Standardabweichung (4.16 A) als auch mit Standardfehler (4.16 B) dargestellt. Die ermittelten Dosisäquivalente nach 1 h resultieren aus den Daten von 24 Patienten, da aus technischen Gründen von drei Patienten einzelne Datenpunkte fehlen.

Die Daten zeigten, dass nach der Normierung zwar die interindividuellen Schwankungen erhalten blieben (Abb. 4.16 A), der Effekt des KMs jedoch nach Bildung des Dosisäquivalents zum Vorschein kam. Hiernach induzierte ein CT mit einem DLP von 500 mGy*cm ein durchschnittliches Schadenslevel, welches mit einer *in vitro*-Bestrahlung von 10 mGy korrespondierte. Hierbei korrespondierte ein CT mit vorheriger KM-Gabe mit einem Dosisäquivalent von 11 bis 12 mGy und eines ohne KM-Gabe mit einem Dosisäquivalent von 8 bis 9 mGy. Es war also eine Erhöhung der absorbierten Dosis durch das KM um 19% nach 0,5 h und um 39% nach 1 h festzustellen. Dieser Unterschied war nach 1 h signifikant ($p < 0,05$).

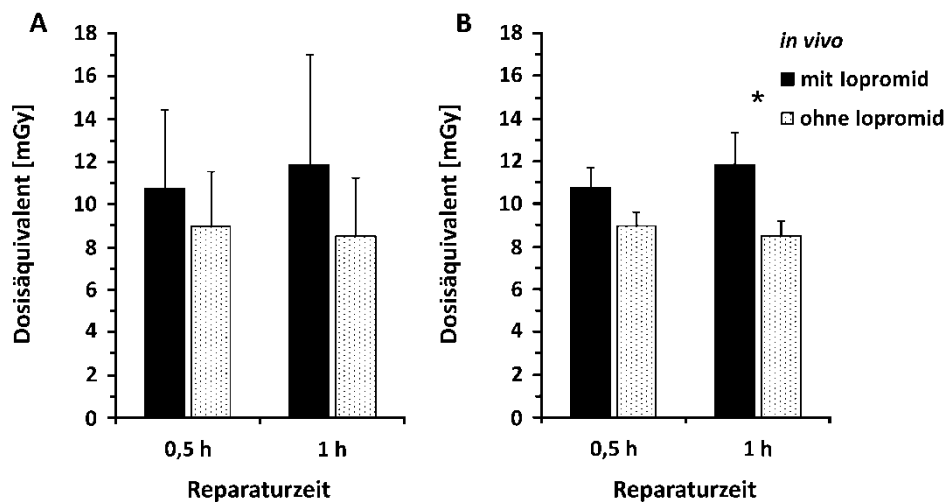


Abb. 4.16: Dosisäquivalente nativ bestrahlter Patienten und solchen mit KM-Gabe nach CT-Untersuchung

In A wurden die Dosisäquivalente jedes einzelnen Patienten nach 0,5 h und 1 h berechnet. Hierfür wurden die *in vivo*-Daten auf ein DLP = 500 mGy*cm normiert und durch die individuelle Steigung dividiert. Diese resultierte aus Berechnung der linearen Regression über die 5 und 10 mGy-Werte der Patienten. Die Daten nach 1 h resultieren von 24 Patienten, da für drei Patienten kein Dosisäquivalent berechnet werden konnte. Die Fehlerbalken repräsentieren in A die Standardabweichung und in B den Standardfehler. Für die statistische Analyse in B wurde ein einseitiger T-Test angewendet. Signifikante Unterschiede wurden mit einem * gekennzeichnet.

Zusammengefasst war nach Berücksichtigung der individuellen DSB-Schadensantwort durch Normierung der *in vivo*-Werte auf die individuellen *in vitro*-Werte auch *in vivo* ein Effekt des KMs auf die mittlere induzierte Anzahl an DSBs zu beobachten. Dieser betrug im Mittel ca. 30%, wenn KM vor Bestrahlung zugegeben wurde.

4.2.3 Modifikation der Studie mit weiteren Patienten der Patientengruppe II

Da sich der *in vitro* beobachtete KM-Effekt in Patientengruppe I erst durch Normierung der *in vivo*-Daten auf die individuellen *in vitro*-Daten zeigte und die individuellen Schwankungen in der DSB-Schadensantwort sehr hoch waren, wurde in einer zweiten Patientenstudie dieser Effekt *in vivo* nochmals untersucht. An der Patientenstudie II nahmen zehn CT-Patienten teil, welche eine Bestrahlung mit 120 kV-Röntgenstrahlung an einem CT erhielten (Tab. 4.2).

Um interindividuelle Unterschiede im Reparaturverhalten möglichst klein zu halten, wurden die beiden Vergleichsgruppen diesmal so gewählt, dass sie die gleichen klinischen Indikationen und das gleiche durchschnittliche Alter hatten. Alle Patienten hatten gutartige Erkrankungen und waren in beiden Vergleichsgruppen durchschnittlich 62 Jahre alt. Der Altersunterschied zwischen dem jüngsten und ältesten Patienten in jeder Gruppe betrug höchstens 13 Jahre.

Fünf Patienten wurden nativ bestrahlt, weitere fünf erhielten vor der Bestrahlung KM mit dem Wirkstoff Iomeprol. Die Wahl des KM-Wirkstoffes ist klinikabhängig. Iomeprol enthält die gleiche Jodmenge wie Iopromid und zeigte in Kap. 4.1.3 einen ähnlich hohen KM-Effekt wie das

in der Patientengruppe I verwendete KM. Somit waren die Daten von Patientengruppe II mit denen von Patientengruppe I vergleichbar.

Tab. 4.2: Patientencharakteristiken und Untersuchungsparameter CT-Patienten der Patientengruppe II

Patientengruppe II		
	Nativ	mit KM
Patientencharakteristiken		
Anzahl (mittleres Alter, Altersverteilung)	5 (62,8 Jahre, 56-69)	5 (62,2 Jahre, 55-68)
Frauen (mittleres Alter, Altersverteilung)	2 (63,5 Jahre, 59-68)	1 (55 Jahre)
Männer (mittleres Alter, Altersverteilung)	3 (62,3 Jahre, 56-69)	4 (64 Jahre, 61-68)
Krebs	0	0
Gutartige Erkrankung	5	5
Untersuchungsparameter		
CT-Typ	5 Thorax-CTs	5 Thorax-CTs
mittleres CTDi/vol (Verteilung)	7,9 mGy (6-10)	8,7 mGy (5-18)
Mittleres DLP (Verteilung)	287 mGy*cm (217-345)	371 mGy*cm (165-636)
mittlere verabreichte Jodmenge (Verteilung)	-	28,8 g (28-30 g)

Den Patienten wurde vor der CT-Untersuchung Blut entnommen, welches als unbestrahlte Kontrolle diente und kein KM enthielt (siehe Versuchsaufbau Abb. 4.17). 0,5 h nach der CT-Untersuchung wurde den Patienten abermals Blut entnommen, die Lymphozyten isoliert, fixiert, anschließend die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle bestimmt sowie auf ein DLP von 500 mGy*cm normiert.

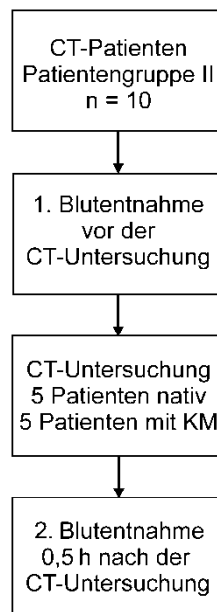


Abb. 4.17: Versuchsaufbau der CT-Patientenstudien mit Patientengruppe II

Schematischer Versuchsaufbau der CT-Patientenstudien mit Patientengruppe II. Den Patienten der Patientengruppe II wurde vor dem CT Blut entnommen, welches als unbestrahlte Kontrolle diente. 0,5 h nach Bestrahlung wurde für die *in vivo*-Reparaturproben erneut Blut entnommen und die Lymphozyten isoliert, fixiert und gegen γ H2AX gefärbt.

Die *in vivo*-Daten der Patienten wurden in native Patienten und solche mit KM-Gabe und gemittelt. Es zeigte sich, dass eine KM-Gabe vor Bestrahlung zu einer Erhöhung der initialen Focianzahl um 33% von 0,15 auf 0,2 Foci pro Zelle führte (Abb. 4.18). Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,05$) und korrelierte mit der mittleren Erhöhung in Patientengruppe I nach der Normierung (Abb. 4.16).

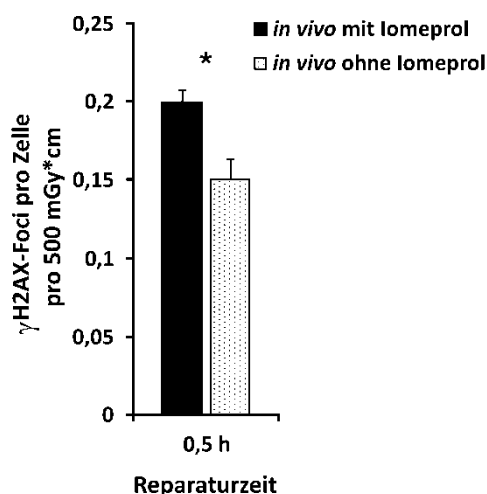


Abb. 4.18: Quantifizierung von γ H2AX-Foci pro Zelle pro 500 mGy*cm in Lymphozyten nach 120 kV-Röntgenstrahlung von nativ bestrahlten Patienten und solchen mit KM-Gabe *in vivo*

Die *in vivo*-Daten der Patientengruppe II resultieren aus den Werten von fünf nativ bestrahlten CT-Patienten und fünf mit KM-Gabe in Form von lomeprol vor der CT-Untersuchung. 0,5 h nach Bestrahlung wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci bestimmt. Die Werte der unbestrahlten Kontrollen (0,05 bis 0,1 γ H2AX-Foci pro Zelle) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Für die statistische Analyse wurde ein einseitiger T-Test angewendet. Signifikante Unterschiede wurden mit einem * gekennzeichnet.

Zusammenfassend wurde in einer weiteren Patientenstudie (Patientengruppe II), in welcher diesmal darauf geachtet wurde, dass sich die Patienten im mittleren Alter, in der Altersverteilung sowie in den klinischen Indikationen innerhalb jeder Gruppe gleichen, auch ohne Normierung der *in vivo*-Daten ein Effekt des KMs auf die Anzahl an DSBs *in vivo* nachgewiesen. Dieser korrelierte mit dem KM-Effekt in Patientengruppe I. In beiden Patientenstudien fiel der KM-Effekt geringer aus als in den durchgeführten *in vitro*-Experimenten mit Lymphozyten und Fibroblasten (vgl. Kap. 4.1.2 bis 4.1.4).

4.3 Untersuchung von Faktoren, die das Reparaturvermögen beeinflussen

Die Ergebnisse der KM-Studien hatten gezeigt, dass es zu interindividuellen Unterschieden in der DSB-Schadensantwort kommen kann. Daher wurden im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit Faktoren wie die klinischen Indikationen der Patienten, deren Alter und das Geschlecht untersucht, die das Reparaturvermögen beeinflussen können. Hierbei wurde die DSB-Reparatur von Patienten mit gutartigen Erkrankungen wie z. B. Herzerkrankungen, dem Reparaturvermögen von Patienten mit Krebserkrankungen gegenübergestellt. Weiterhin wurden Patienten über 60 Jahre mit solchen unter 60 Jahre und abschließend Männer mit Frauen verglichen. Dazu wurden zunächst die Daten der Patientengruppe I herangezogen und nach den entsprechenden Kriterien ausgewertet. Anschließend wurden die genannten Faktoren auch in einer neuen Patientengruppe, der Patientengruppe III, untersucht.

4.3.1 Unterscheidung der Patienten von Patientengruppe I nach verschiedenen Faktoren

Von allen in der Patientengruppe I untersuchten Patienten waren fünf Patienten unter 60 und 22 Patienten über 60 Jahre alt. Sechs Patienten hatten eine bösartige und 21 eine gutartige Erkrankung (Tab. 4.1). Weiterhin nahmen fünf Frauen und 22 Männer an der Studie teil. Die entsprechenden γ H2AX-Fociwerte wurden sowohl *in vivo*, als auch nach den verschiedenen angewandten Dosen *in vitro* gemittelt und in die unterschiedlichen Kategorien eingeteilt. Da kein offensichtlicher Unterschied in der mittleren Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle pro 500 mGy*cm zwischen nativ bestrahlten Patienten und solchen mit KM-Gabe vor CT-Untersuchung bestand (Kap. 4.2, Abb. 4.14), wurde die KM-Applikation beim Vergleich nicht berücksichtigt.

Nach Normierung und Aufteilung der *in vivo*-Daten auf ein DLP von 500 mGy*cm war zu erkennen, dass nach einer Reparaturzeit von 0,5 h und 1 h Patienten über 60 Jahre tendenziell höhere γ H2AX-Fociwerte aufwiesen als Patienten unter 60 Jahre (Abb. 4.19). Diese Erhöhung machte 20 bis 30% aus. Eine Unterscheidung nach der klinischen Indikation erbrachte 0,5 h nach Bestrahlung keine relevante Tendenz. Nach 1 h und 2,5 h zeigte die Patientengruppe mit

bösartigen Erkrankungen *in vivo* eine leichte Erhöhung in der γ H2AX-Focianzahl. Bei der Unterscheidung nach dem Geschlecht war zu erkennen, dass Frauen durchweg die Tendenz einer erhöhten DSB-Schadensantwort abhängig von der jeweiligen Reparaturzeit von 11% bis 38% gegenüber Männern aufwiesen.

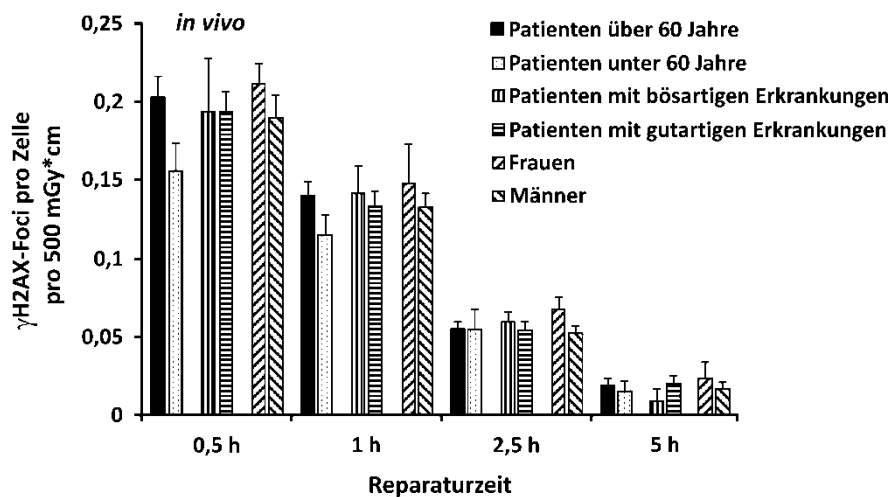


Abb. 4.19: Auftragung der *in vivo*-Daten der Patientengruppe I nach Alter, klinischer Indikation und dem Geschlecht

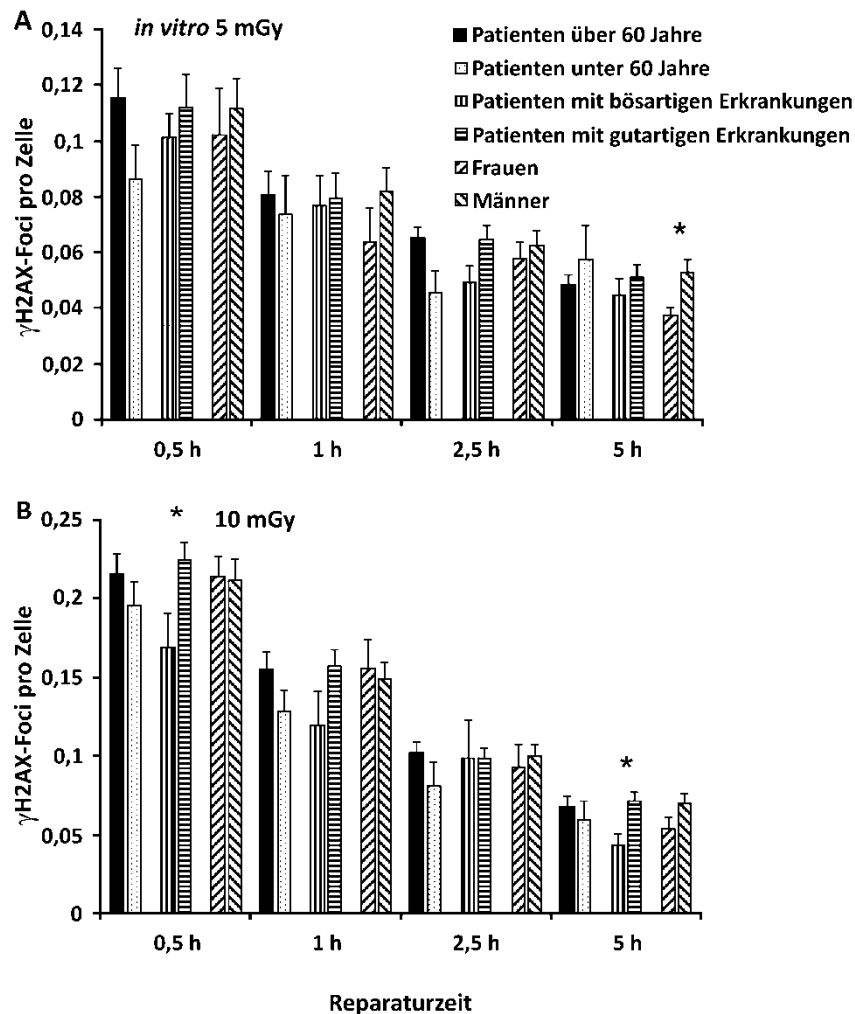
Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci pro Zelle pro 500 mGy*cm nach CT-Untersuchung der Patientengruppe I. Die *in vivo*-Daten nach 0,5 h, 1 h, 2,5 h und 5 h wurden nach dem Alter in Patienten über und unter 60 Jahre, nach der klinischen Indikation in Patienten mit einer bös- oder gutartigen Erkrankung und dem Geschlecht entsprechend in Frauen und Männer eingeteilt und gemittelt. Dabei waren 5 Patienten unter und 22 über 60 Jahre alt, 6 Patienten hatten eine bösartige- und 21 eine gutartige Erkrankung. Es nahmen 5 Frauen und 22 Männer an der Studie teil. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger T-Test angewendet.

Ein Vergleich der *in vitro*-Daten der Patientengruppe I zeigte, dass nach einer Dosis von 5 mGy Patienten über 60 Jahre nach einer Reparaturzeit von 0,5 h, 1 h und 2,5 h höhere Fociwerte aufwiesen als Patienten unter 60 Jahre (Abb. 4.20 A). Dieser Unterschied betrug bis zu 42% und war nach 0,5 h und 2,5 h am deutlichsten ausgeprägt. Patienten mit gutartigen Erkrankungen zeigten abweichend von der Auswertung der *in vivo*-Daten nach allen Reparaturzeiten eine erhöhte γ H2AX-Focianzahl von ca. 31% gegenüber den Patienten mit bösartigen Erkrankungen. Eine Unterscheidung nach dem Geschlecht erbrachte nach allen Reparaturzeiten höhere Fociwerte für Männer von bis zu 40,5%. Dies war nach 5 h signifikant.

Die 10 mGy *in vitro*-Daten zeigten, dass vergleichbar mit den 5 mGy-Werten Patienten über 60 Jahre bis zu 27% höhere Fociwerte aufwiesen als Patienten unter 60 Jahre (Abb. 4.20 B). Dies war nach allen Reparaturzeiten der Fall. Patienten mit gutartigen Erkrankungen wiesen nach 0,5 h, 1 h und 5 h höhere γ H2AX-Fociwerte auf als Patienten mit bösartigen Erkrankungen. Dieser Unterschied betrug bis zu 64% und erwies sich nach 0,5 h und 5 h als signifikant. Eine Unterscheidung der DSB-Schadensantwort nach dem Geschlecht ließ keine eindeutigen Tendenzen erkennen.

Nach einer Dosis von 100 mGy war ebenfalls die Tendenz erkennbar, dass Patienten über 60 Jahre nach allen Reparaturzeiten mehr γ H2AX-Foci pro Zelle aufwiesen als jüngere (Abb. 4.20 C). Der Unterschied war nach 100 mGy weniger ausgeprägt als nach 5 und 10 mGy und betrug maximal 15%. Ein Vergleich der klinischen Indikationen oder des Geschlechts erbrachte keine eindeutigen Tendenzen.

Die 500 mGy *in vitro*-Daten zeigten, dass sich das Verhältnis in der Anzahl an γ H2AX-Foci zwischen Patienten über und unter 60 Jahre umgekehrt hatte und jüngere Patienten nach allen Reparaturzeiten mehr Foci pro Zelle aufwiesen als ältere Patienten (Abb. 4.20 D). Dieser Unterschied betrug bis zu 24%. Weiterhin hatten Patienten mit gutartigen Erkrankungen nach allen Reparaturzeiten höhere Fociwerte als Patienten mit bösartigen Erkrankungen. Hier betrug der Unterschied bis zu 32% und war nach 2,5 h und 5 h signifikant. Ein Vergleich der Geschlechter miteinander ließ keine durchgängigen Unterschiede in der DSB-Schadensantwort erkennen.



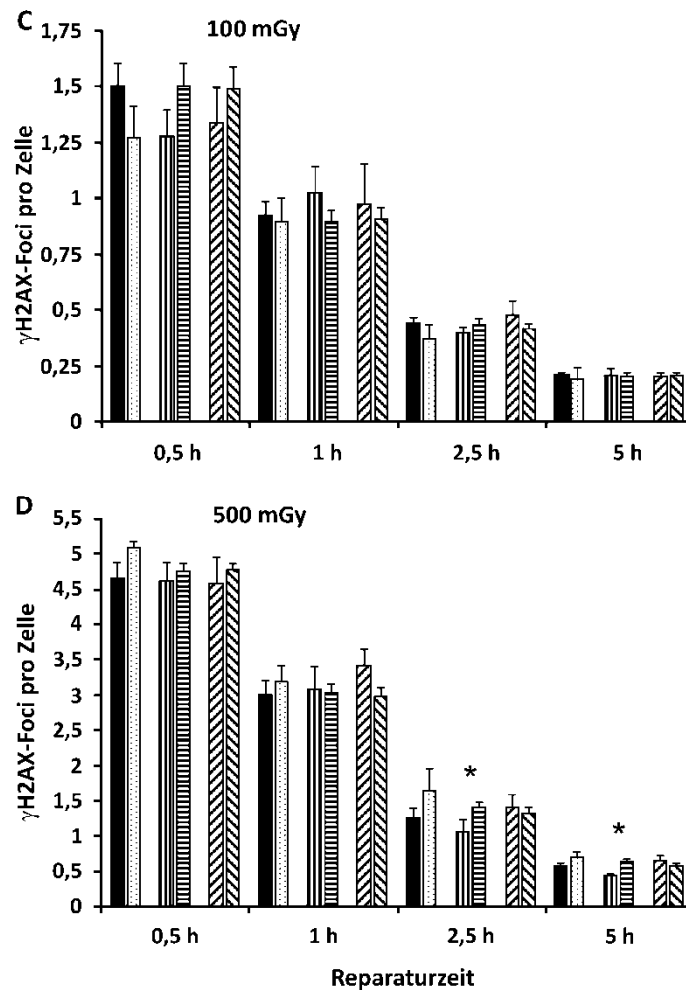


Abb. 4.20: Aufteilung der *in vitro*-Daten der Patientengruppe I nach Alter, klinischer Indikation und dem Geschlecht

Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci pro Zelle nach 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 5 mGy (A), 10 mGy (B), 100 mGy (C) und 500 mGy (D) *in vitro* der Patientengruppe I. Die *in vitro*-Daten nach 0,5 h, 1 h, 2,5 h und 5 h wurden dem Alter entsprechend in Patienten über und unter 60 Jahre, nach den klinischen Indikationen in Patienten mit einer bös- oder gutartigen Erkrankung und nach dem Geschlecht in Männer und Frauen aufgeteilt. 5 Patienten waren unter 60 und 22 über 60 Jahre alt, 6 Patienten hatten eine bösartige und 21 eine gutartige Erkrankung. Unter den Patienten gab es 5 Frauen und 22 Männer. Die Werte von unbestrahlten Kontrollen (0,05 bis 0,1 Foci pro Zelle) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger T-Test angewendet. Signifikante Unterschiede wurden mit einem * gekennzeichnet.

Zusammengefasst ergab eine Einteilung der Patientengruppe I in verschiedene Faktoren, dass Patienten über 60 Jahre sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bis 100 mGy tendenziell höhere γ H2AX-Fociwerte gegenüber jüngeren Patienten aufwiesen. Ein Vergleich zwischen den klinischen Indikationen ergab, dass Patienten mit gutartigen Erkrankungen *in vitro* tendenziell mehr Foci pro Zelle aufwiesen als Patienten mit bösartigen Erkrankungen. Ein Vergleich zwischen den Geschlechtern zeigte hingegen keine eindeutigen Tendenzen auf.

Problematisch für den Vergleich der Faktoren der Patientengruppe I war, dass die jeweiligen Anteile der Patienten innerhalb der einzelnen Gruppen recht unausgewogen waren. Von allen untersuchten Patienten waren nur 18,5% unter 60 Jahre alt. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe unter 60 Jahre betrug rund 43 Jahre, sodass der Altersunterschied zwischen Patienten unter und über 60 Jahre nur ca. 20 Jahre betrug. Auch im Vergleich der klinischen Indikationen und des Geschlechts gab es Ungleichgewichte. Der Anteil an Frauen machte lediglich 18,5% aus und der Anteil an Patienten mit bösartigen gegenüber Patienten mit gutartigen Erkrankungen ebenfalls nur 22,2%.

4.3.2 Weitere Patientenstudie zur Klärung des Einflusses verschiedener Faktoren auf das DSB-Reparaturverhalten *in vitro* mit Patientengruppe III

In Patientengruppe I zeichnete sich die Tendenz ab, dass das Alter einen Einfluss auf das DSB-Reparaturvermögen haben könnte. Aufgrund der inhomogenen Verteilung der verschiedenen Vergleichsgruppen waren jedoch keine klaren Ergebnisse über andere Faktoren wie klinische Indikationen oder das Geschlecht erkennbar. Deshalb wurde in einer weiteren Patientenstudie (Patientengruppe III, Tab. 4.3) das Reparaturverhalten wiederholt untersucht. Hierfür wurden zusätzlich zu verschiedenen Reparaturzeitpunkten auch Induktionswerte gemessen.

Die Patientengruppe III umfasste insgesamt 15 Individuen, welche nach den gleichen Faktoren wie bei Patientengruppe I miteinander verglichen wurden. Beim Vergleich von jungen mit älteren Patienten wurde diesmal darauf geachtet, dass sich das Durchschnittsalter der beiden Gruppen um mindestens 40 Jahre unterschied. Hierbei wurden 7 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 28 Jahren und einem Höchstalter von 36 Jahren 8 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 70 Jahren und einem Mindestalter von 57 Jahren einander gegenübergestellt.

Der größte Altersunterschied innerhalb der Gruppe bis 36 Jahre betrug zwölf Jahre. In der Gruppe mit einem Alter über 57 Jahre betrug der größte Altersunterschied 21 Jahre. 7 Patienten hatten eine bösartige und 8 eine gutartige Erkrankung (bzw. waren gesund). Der Einfachheit halber werden im Folgenden gesunde Probanden und Patienten mit gutartigen Erkrankungen als letztere zusammengefasst. Von allen Teilnehmern waren 5 Teilnehmer Männer und 10 Frauen.

Tab. 4.3: Übersicht über das Geschlecht, klinische Indikationen und das Alter der Patienten innerhalb der Patientengruppe III

Patientencharakteristiken	Patientengruppe III
Anzahl gesamt	15
Anzahl Patienten über 57 Jahre (mittleres Alter, Altersverteilung)	8 (70 Jahre, 57-77)
Anzahl Patienten bis 36 Jahre (mittleres Alter, Altersverteilung)	7 (28 Jahre, 24 bis 36)
Anzahl Frauen	10
Anzahl Männer	5
Anzahl Patienten mit bösartigen Erkrankungen	7
Anzahl Patienten mit gutartigen Erkrankung (bzw. gesund)	8
Anzahl Patienten über 57 Jahre mit bösartigen Erkrankungen (mittleres Alter, Altersverteilung)	4 (73 Jahre, 70-77 Jahre)
Anzahl Patienten bis 36 Jahre mit bösartigen Erkrankungen (mittleres Alter, Altersverteilung)	3 (32 Jahre, 30-36)
Anzahl Patienten über 57 Jahre mit gutartigen Erkrankungen (mittleres Alter, Altersverteilung)	4 (66,8 Jahre, 56-75)
Anzahl Patienten bis 36 Jahre mit gutartigen Erkrankungen (bzw. gesund) (mittleres Alter, Altersverteilung)	4 (25 Jahre, 24-26)
Anzahl Patienten über 57 Jahre – Frauen (mittleres Alter, Altersverteilung)	4 (74 Jahre, 69-77)
Anzahl Patienten bis 36 Jahre – Frauen (mittleres Alter, Altersverteilung)	6 (27,6 Jahre, 24-36)
Anzahl Patienten über 57 Jahre – Männer (mittleres Alter, Altersverteilung)	4 (65,8 Jahre, 56-70)
Anzahl Patienten bis 36 Jahre – Männer (Alter)	1 (30 Jahre)

Die erhaltenen 10 mGy *in vitro*-Daten wurden in die verschiedenen Faktoren aufgeteilt und gemittelt. Zunächst wurden Patienten ab 56 Jahre mit Patienten bis 36 Jahre verglichen. Patienten mit bösartigen Erkrankungen wurden solchen mit gutartigen Erkrankungen gegenübergestellt und außerdem das Reparaturverhalten von Männern und Frauen verglichen (Abb. 4.21). Dabei war deutlich ein altersabhängiger Unterschied in der Focianzahl zu erkennen. Dieser war

nach allen Reparaturzeiten signifikant ($p < 0,05$). In der Induktion wiesen ältere Patienten 17% mehr Foci auf als jüngere. Nach den verschiedenen Reparaturzeiten war der Unterschied in den Fociwerten größer. Patienten ab 57 Jahre wiesen bis zu 81% mehr Foci pro Zelle auf als die jüngere Patientengruppe. Dagegen gab es keine durchgängigen Unterschiede in der Induktion oder der Reparatur zwischen Patienten mit bösartigen und solchen mit gutartigen Erkrankungen oder zwischen Frauen und Männern.

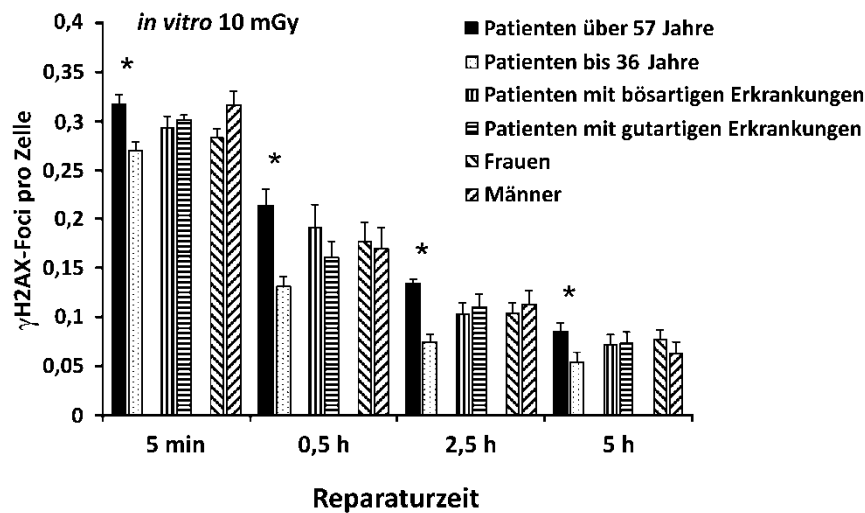


Abb. 4.21: Aufteilung der *in vitro*-Daten der Patientengruppe III nach Alter, klinischer Indikation und dem Geschlecht

Dargestellt ist die Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci pro Zelle nach 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 10 mGy *in vitro* der Patientengruppe III. Die *in vitro*-Daten nach 5 min, 0,5 h, 2,5 h und 5 h der Patienten wurden nach dem Alter in Patienten bis 36 und ab 57 Jahre, nach der klinischen Indikation in Patienten mit einer bös- oder gutartigen Erkrankung und nach dem Geschlecht eingeteilt. 8 Patienten waren ab 57 und 7 bis 36 Jahre alt, 7 Patienten hatten eine bösartige- und 8 eine gutartige Erkrankung. Unter den Patienten gab es 5 Männer und 10 Frauen. Die Werte von unbestrahlten Kontrollen (0,05 bis 0,1 Foci pro Zelle) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger T-Test angewendet. Signifikante Unterschiede wurden mit einem * gekennzeichnet.

Da sich das Alter nun als signifikanter Faktor herauskristallisierte, der die DSB-Schadensantwort beeinflussen kann, wurden die anderen Kriterien ebenfalls noch einmal überprüft. Hierfür wurde das Alter jeweils mit einbezogen, sodass es beim Vergleich der übrigen Kriterien (klinische Indikationen und Geschlecht) keinen Einfluss mehr hatte. Hierzu wurden 4 Patienten mit bösartigen Erkrankungen über 57 Jahre mit 4 Patienten mit gutartigen Erkrankungen über 57 Jahre verglichen. Darüber hinaus wurden 3 Patienten mit bösartigen Erkrankungen bis 36 Jahre mit 4 Patienten mit gutartigen Erkrankungen bis 36 Jahre einander gegenüber gestellt (Abb. 4.22 A). Ein Vergleich der Patienten mit unterschiedlichen klinischen Indikationen ergab hierbei nur 0,5 h nach Bestrahlung innerhalb der älteren Patientengruppe einen Unterschied von 22%. Weiterhin wurde mit dem gleichen Ansatz das Geschlecht als Faktor mit einbezogen und 4 Frauen über 57 Jahre mit 4 Männern über 57 Jahre verglichen. Außerdem wurde die Reparatur von γ H2AX-Foci von 6 Frauen bis 36 Jahre der Reparatur eines 30jährigen Mannes ge-

genüber gestellt. Hierbei wiesen ältere Frauen nach 0,5 h 28,5% und nach 5 h 48% mehr γ H2AX-Foci auf als ältere Männer (Abb. 4.22 B). Jüngere Frauen hatten nach allen Reparaturzeiten (0,5 h bis 5 h) 35 bis 50% mehr DSBs als der junge Mann. Beim Vergleich der Geschlechter miteinander muss allerdings beachtet werden, dass innerhalb der Patientengruppe III der Anteil an Männern und Frauen nicht ausgewogen war, sodass das Geschlecht als möglicher Faktor zur Beeinflussung des Reparaturvermögens noch einmal in einer größeren Gruppe mit einer ausgewogenen Anzahl an Frauen und Männern untersucht werden sollte.

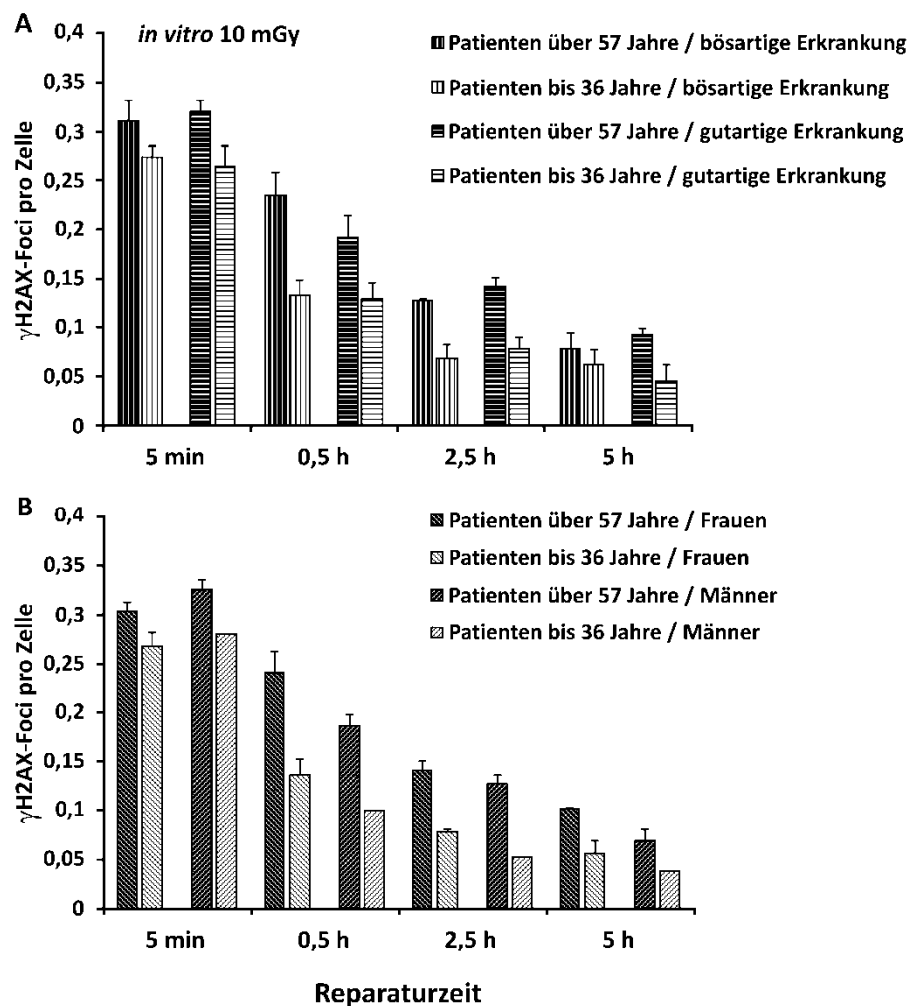


Abb. 4.22: Weitere stärker differenzierte Aufteilung der *in vitro*-Daten der Patientengruppe III nach klinischer Indikation und dem Geschlecht unter Berücksichtigung des Alters

Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci pro Zelle nach 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 10 mGy *in vitro* der Patientengruppe III. Die *in vitro*-Daten nach 5 min, 0,5 h, 2,5 h und 5 h der Patienten wurden unter Berücksichtigung des Alters nach der klinischen Indikation in Patienten mit einer bös- oder gutartigen Erkrankung (A) und nach dem Geschlecht eingeteilt (B). 8 Patienten waren über 57 und 7 unter 36 Jahre alt, 7 Patienten hatten eine bösartige- und 8 eine gutartige Erkrankung. Unter den Patienten gab es 5 Männer und 10 Frauen. Die Werte von unbestrahlten Kontrollen (0,05 bis 0,1 Foci pro Zelle) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Für die statistische Analyse zwischen Gruppen gleichen Alters aber unterschiedlicher Erkrankung oder Geschlechts wurde ein zweiseitiger T-Test angewendet.

Zusammengefasst konnten mit der dritten Studie mit Patientengruppe III, in welcher der Anteil an älteren und jüngeren Patienten sowie der Anteil an Patienten mit gutartigen und bösartigen Erkrankungen größtenteils ausgewogen war, die Beobachtungen aus der Patientenstudie I bestätigt und deutlicher nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass das Reparaturvermögen mit dem Alter grundsätzlich abnimmt. Außerdem war die Tendenz zu erkennen, dass Frauen ein schlechteres Reparaturvermögen aufweisen als Männer.

4.4 Anwendung eines Mausgewebemodells zur Untersuchung von Niedrigdosen

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von KM auf die DSB-Induktion und Reparatur nach CT-Untersuchungen. Hierbei hatte das KM einen großen Einfluss auf die Induktion, nicht jedoch auf die Reparatur von DSBs. Bei diesen Untersuchungen stellte sich weiterhin heraus, dass die Reparatur *in vitro* nach niedrigen Dosen eingeschränkt war. Diese Beobachtung ist konsistent mit einer früheren Studie, die sich mit der Reparatur von DSBs in konfluenten Fibroblasten nach niedrigen Dosen beschäftigte (Rothkamm & Lobrich 2003).

Da niedrige Dosen an Röntgenstrahlung in Bereichen von wenigen mGy täglich in der Röntgendiagnostik appliziert werden, ist es von besonderem Interesse, das Reparaturvermögen in diesem Dosisbereich auch *in vivo* zu untersuchen. Patientenstudien sind hierfür ungeeignet, da exponierte Personen bei der überwiegenden Zahl der Röntgenuntersuchungen lediglich eine Teilkörperbestrahlung erhalten, wodurch es bei der Untersuchung von Lymphozyten zu einer Vermischung von bestrahlten und nicht-bestrahlten Lymphozyten kommt. Dies würde letztendlich zu einer Unterschätzung der tatsächlich erhaltenen Strahlendosis, gemessen an der durchschnittlichen Anzahl an DSBs in Lymphozyten, führen und auch die gemessenen Reparaturwerte beeinträchtigen. Infolgedessen sollte der Nachweis von DSBs mittels IFM zunächst in Gewebezellen verschiedener Organe von Mäusen etabliert werden. Diese haben gegenüber Patientenstudien den Vorteil, dass sie ganzkörperbestrahlt werden können, sodass alle Zellen im Körper bei der Bestrahlung die gleiche Röntgendosis erhalten. Die Vorarbeit hierfür leistete das Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar bei verschiedenen Organen von WT-Mäusen (C57BL/6-Mäusen) (Rube et al. 2008a).

Darauf aufbauend sollte in einem gemeinsamen Projekt mit dem Strahlenbiologischen Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar die DSB-Reparatur nach verschiedenen Röntgendosen mittels IFM untersucht werden. Das Hauptaugenmerk sollte sich hierbei darauf richten, ob *in vivo* die Reparatur mit kleiner werdender applizierter Röntgendosis abnimmt. Ein Vorteil und eine der Voraussetzungen für diese Reparaturstudien in murinen Gewebezellen war die Tatsache, dass murine

Gewebezellen sehr niedrige Werte an spontan auftretenden DSBs aufweisen, sodass zusätzlich auftretende DSBs, die von niedrigen Röntgenstrahldosen verursacht werden, gut messbar sind. Um das Verfahren zu erweitern und die Ergebnisse zu validieren, sollte neben γ H2AX auch 53BP1 als zweiter Marker für DSBs in murinen Organen verschiedener Mausstämmen etabliert werden.

4.4.1 *In vivo*-Nachweis von DSBs über γ H2AX in verschiedenen murinen Geweben nach Röntgenbestrahlung mittels IHC

Für den Nachweis von DSBs nach Bestrahlung wurde zunächst vom Strahlenbiologischen Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar für verschiedene murine Organe immunhistochemisch (IHC) γ H2AX als Marker für DSBs angefärbt. Dies erfolgte mittels DAB (3,3'-Diaminobenzidin)-Färbung, welches ein braunes Endprodukt bildet. Hierfür wurden WT-Mäuse an einem Linearbeschleuniger mit 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy bestrahlt und nach 0,5 h das Gehirn, die Lunge, das Herz sowie der Dünndarm entnommen. Diese wurden anschließend fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Gewebeschnitte angefertigt und diese für die anschließende Färbung vorbereitet.

Für die IHC-Färbung wurde nach Blocken der endogenen Peroxidasen γ H2AX mit einem primären Antikörper markiert, gegen welchen ein biotinylierter Sekundärantikörper gerichtet wurde. Auf die Markierung der Gewebeschnitte mit einem Biotin-Avidin-Peroxidasekomplex folgte die DAB-Entwicklung. Die Zellkerne wurden abschließend mit Hematoxylin gegengefärbt (Rube et al. 2008b). Die Kerne neuronaler Zellen und Gliazellen der Endhirnrinde (alle Kerne im Bild) weisen im Gegensatz zu anderen Gehirnregionen konstant ein positives γ H2AX-Signal auf (Abb. 4.23). In der Lunge sind Zellkerne des Bronchialepithels (mit Pfeilen markiert) und des Alveolarepithels (als „A“ markiert) dargestellt. In der Lunge lag der Fokus bei der späteren Auswertung mittels IFM auf dem Bronchialepithel. Im Herz sind die Kerne der Herzmuskelzellen oval und liegen nicht alle in der gleichen Richtung, sodass nach dem Schneiden des Gewebes längs- und querschnittene Kerne zu sehen waren. Daher wurde darauf geachtet, dass bei der Auswertung nur längsgeschnittene Kerne mit vergleichbarer Fläche ausgewählt wurden (Beispiele in Abb. 4.23 mit Pfeilen markiert, siehe auch Beispielbild im Anhang). Im Dünndarm wurden die Epithelzellkerne der Mukosa ausgewertet. Die Oberfläche der Mukosa bildet Villi und Krypten aus. Hiervon wurden nur die Epithelzellkerne der Villi ausgewertet (in Abb. 4.23 mit Pfeilen markiert, siehe auch Abb. 4.24), da diese aus ausdifferenzierten G0-Zellen bestehen.

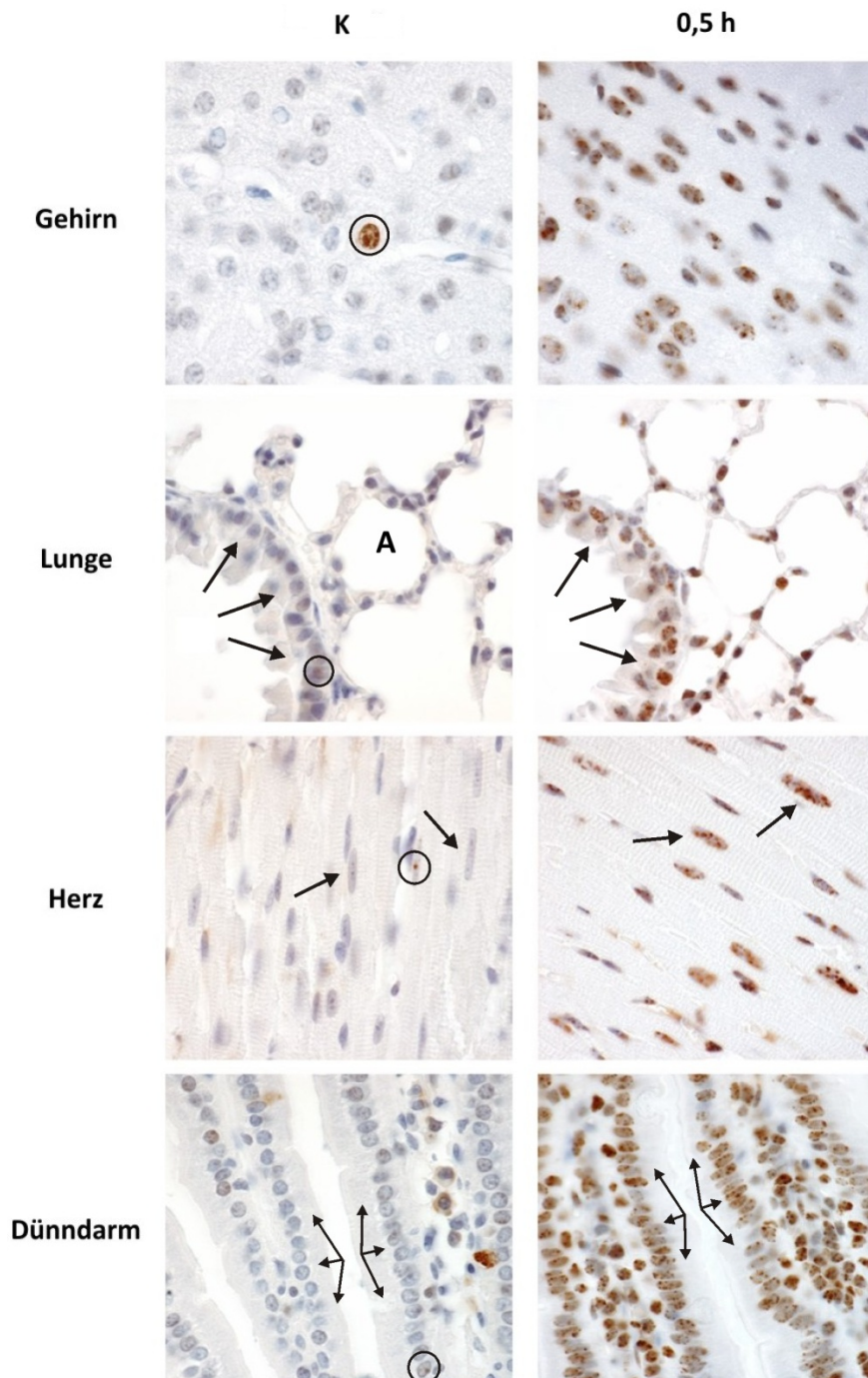


Abb. 4.23: IHC-Färbung von γ H2AX in verschiedenen murinen Gewebetypen nach 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy *in vivo*.

Die Bildausschnitte zeigen Beispiele für murine Gewebetypen, in welchen γ H2AX mittels DAB (3,3'-Diaminobenzidin)-Färbung angefärbt wurde. Die Zellkerne in der linken Spalte wurden nicht bestrahlt (**K**). Die Zellkerne in der rechten Spalte wurden mit 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Nicht-bestrahlte Kerne weisen kaum γ H2AX-Signale auf. 0,5 h nach Bestrahlung ist ein relativ homogenes γ H2AX-Signal (Braunfärbung) sichtbar. Für die spätere IFM wurden folgende Zellen ausgewertet: Die neuronalen Zellen und Gliazellen der Endhirnrinde des Gehirns (alle Kerne im Bild), die Zellkerne des Bronchialepithels der Lunge (mit Pfeilen markiert; A = Alveolarepithel), die längsgeschnittenen Kerne der gestreiften Herzmuskelfasern des Herzens (Beispiele mit Pfeilen markiert) und die Epithelzellkerne der Mukosa des Dünndarms, deren Oberfläche Villi und Krypten bilden. Hiervon wurden nur die Epithelzellkerne der Villi ausgewertet (mit Pfeilen markiert). Alle Bilder wurden mit 630facher Vergrößerung aufgenommen. Quelle in leicht veränderter Form: Rube et al. (2008b).

In unbestrahlten Zellkernen aller Organe treten nach der IHC-Färbung nur in wenigen Fällen braune Punkte auf, welche einen spontan auftretenden DSB repräsentieren (ein Beispiel pro Bild ist mit einem Kreis markiert). Im Gehirn ist dagegen ein Zellkern erkennbar, welcher eine gleichmäßige Färbung aufweist. Diese Zelle durchlief zum Zeitpunkt der Fixierung wahrscheinlich Apoptose. Nach Bestrahlung ist gegenüber den Kontrollproben in den meisten Zellkernen eine gleichmäßige Braunfärbung erkennbar. Diese ist auf viele DSBs zurückzuführen, die in den Kernen nach Bestrahlung induziert wurden.

Um sicherzustellen, dass in den genannten Bereichen nur ausdifferenzierte G0-Zellen mit gleichem DNA-Gehalt ausgewertet wurden, wurden zusätzlich Färbungen gegen Ki67, einem Marker für proliferierende Zellen, durchgeführt (beispielsweise Dünndarm, Abb. 4.24). Die Färbungen zeigen, dass die für die Auswertungen ausgesuchten Bereiche proliferations-inaktiv sind.

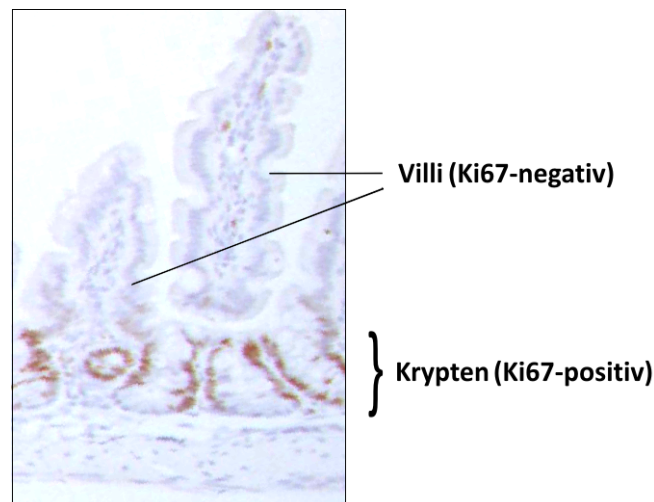


Abb. 4.24: Darstellung von murinen Villi und Krypten der Mukosa des Dünndarms nach Ki67-Färbung

In der Darstellung sind zwei Villi der Mukosa des Dünndarms der Maus dargestellt. Der Saum dieser Villi, welcher aus ausdifferenzierten Epithelzellen in der G0-Phase besteht, ist nach Färbung mit Ki67, einem Proliferationsmarker, negativ. Weiterhin sind Ki67-positive Krypten der Mukosa des Dünndarms dargestellt. Die braune Färbung zeigt an, dass sich in den Krypten proliferierende Zellen befinden. Das Bild wurde mit 100facher Vergrößerung aufgenommen und von Prof. Christian Rube, Strahlenbiologischen Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar, zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassend stellte die DAB-Färbung den ersten Schritt zum Nachweis von γ H2AX in murinen Geweben dar. Durch diese Färbung konnten zudem morphologische Erkenntnisse bezüglich γ H2AX-positiver Bereiche und deren Lage gewonnen werden, sodass sich bei der späteren IF-Färbung die Auswertung auf diese Bereiche beschränkte.

4.4.2 *In vivo*-Nachweis von DSBs in verschiedenen murinen Geweben nach mehreren Röntgendosen mittels γ H2AX-IFM

Nach erfolgreicher DAB-Färbung wurden die DSBs in den anschließenden Reparaturstudien mittels IFM quantifiziert. Beispiele für IF-Färbungen von γ H2AX in verschiedenen Organen sind Rube et al. (2008b) zu entnehmen. Dazu wurden WT-Mäuse am Linearbeschleuniger mit 6 MV-Röntgenstrahlung und Dosen von 1 Gy, 100 mGy und 10 mGy bestrahlt und nach Reparaturzeiten von 10 min, 5 h und 24 h das Gehirn, das Herz, die Lunge, die Niere sowie der Dünndarm entnommen, fixiert und für die γ H2AX-IFM gefärbt. Anschließend wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci bestimmt. Hierbei wurden neben den schon erwähnten Zellen im Gehirn, im Herz, in der Lunge und im Dünndarm auch die Tubuluszellen der proximalen und distalen Tubuli der Nierenrinde ausgewertet.

Die Induktion war nach einer Bestrahlung von 1 Gy und 10 mGy in allen Organen linear. Nach einer Bestrahlung mit 1 Gy wurden ca. sieben bis acht Foci pro Zelle induziert, nach 10 mGy 0,07 bis 0,09 Foci pro Zelle. Nach einer Bestrahlung mit 100 mGy lagen die Induktionswerte mit 0,5 bis 0,6 Foci pro Zelle ca. 30% niedriger als eine lineare Induktion erwarten ließe (Abb. 4.25 A). Ein Vergleich des Reparaturverlaufes in den verschiedenen Organen ergab, dass dieser für alle Organe sehr ähnlich war. Es traten somit keine gewebespezifischen Unterschiede im Reparaturvermögen auf (Abb. 4.25 B bis D). Diese Beobachtung bestätigt Daten aus früheren Untersuchungen mit Wildtypmäusen (Rube et al. 2008a).

Eine Messung der DSB-Reparatur nach 1 Gy ergab, dass nach einer Reparaturzeit von 5 h die Focianzahl bei allen Organen um etwa 77% reduziert war. Nach 24 h verblieben noch etwa sechs Prozent der ursprünglich induzierten DSBs (Abb. 4.25 B). Nach 100 mGy war die ursprünglich induzierte Focianzahl nach einer Reparaturzeit von 5 h um 68% vermindert. 24 h nach Bestrahlung waren noch etwa acht Prozent der ursprünglichen Foci vorhanden (Abb. 4.25 C). Für die Auswertung der Focianzahl pro Zelle nach einer Dosis von 10 mGy wurden nur das Herz, der Dünndarm und die Niere ausgewertet, da sich in diesen drei Organen alle Zellen in den ausgewerteten Bereichen zuverlässig gegen γ H2AX färben ließen. Dagegen existierten sowohl im Gehirn als auch in der Lunge vereinzelt Bereiche, die sich entweder nicht konstant oder gar nicht anfärben ließen. Da die Effekte nach niedrigen Dosen sehr klein sind, hätte somit die Gefahr bestanden, Zellen in γ H2AX-negativen Bereichen fälschlicherweise in die Auswertung mit einzubeziehen. Nach einer Bestrahlung mit 10 mGy war die γ H2AX-Focianzahl 5 h nach Bestrahlung nur um ca. 20% reduziert. Nach einer Reparaturzeit von 24 h verblieben noch ca. 74% der induzierten Brüche, sodass sich diese beiden Zeitpunkte nicht wesentlich in der Focianzahl voneinander unterschieden. Es konnte somit nach der niedrigsten Dosis eine verminderte DSB-Reparatur beobachtet werden. Außerdem verblieb sowohl nach 100 mGy als

auch nach 10 mGy 24 h nach Bestrahlung eine residuale Focianzahl, die ca. 0,05 Foci pro Zelle betrug, sodass nach beiden Dosen nicht auf Hintergrundniveau repariert wurde.

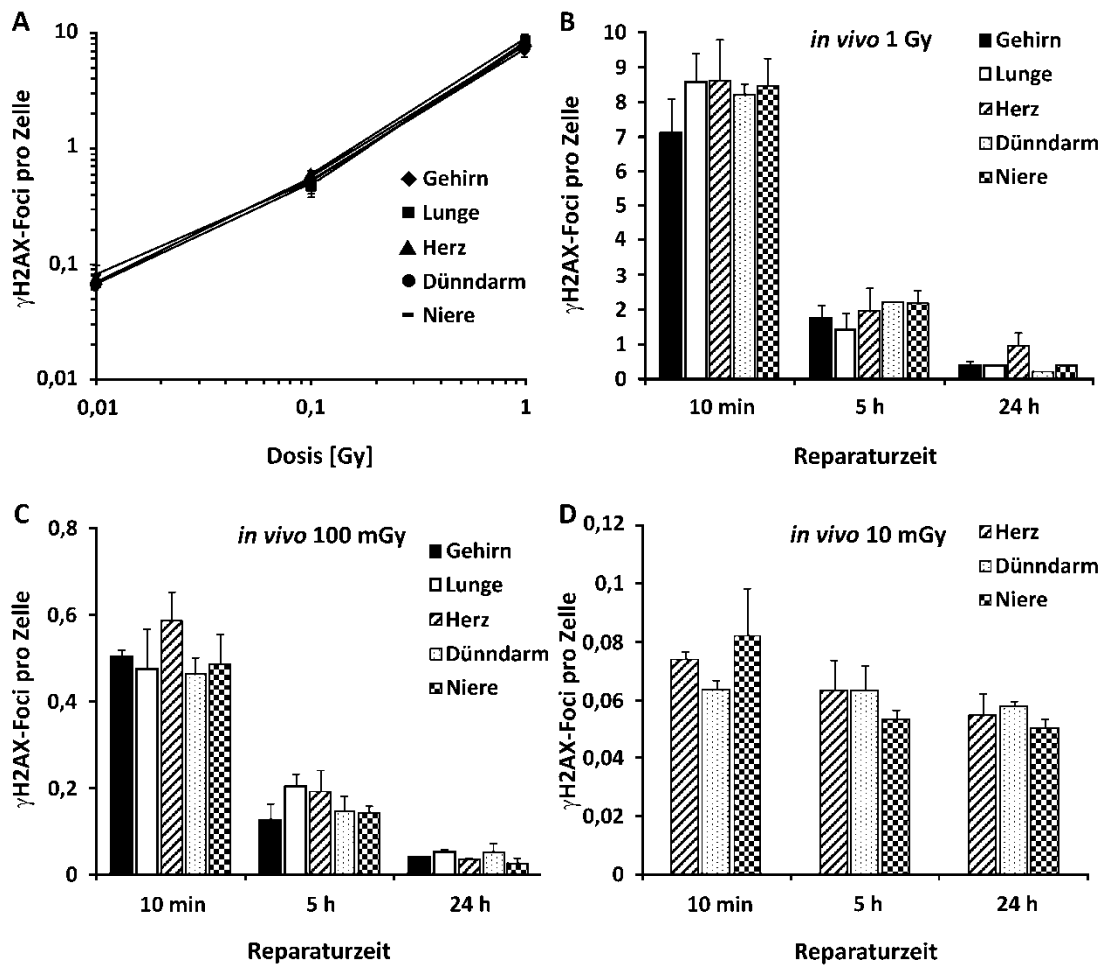


Abb. 4.25: Quantifizierung der Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci in verschiedenen murinen Gewebetypen nach 6 MV-Röntgenstrahlung und verschiedenen Dosen *in vivo*

Für die Quantifizierung der Anzahl an γ H2AX-Foci als Marker für DSBs nach 6 MV-Röntgenbestrahlung wurden Mäuse mit 1 Gy, 100 mGy und 10 mGy bestrahlt und die Induktion (**A**) sowie die Reparatur dieser Foci nach 5 h und 24 h gemessen (**B, C, D**). Für die Fehlerbalken wurde der Standardfehler über mindestens drei Experimente berechnet. Die Fociwerte von unbestrahlten Kontrollen ($\sim 0,04$ Foci pro Zelle) wurden für alle Organe abgezogen.

Zusammengefasst konnte mit diesem weiterentwickelten Ansatz zur Messung der Induktion und Reparatur von DSBs erstmalig *in vivo* bestätigt werden, dass nach einer niedrigen Röntgendosis eine deutlich verlangsamte DSB-Reparatur auftritt. Außerdem verblieb nach den beiden niedrigsten Dosen 24 h nach Bestrahlung ein residuales Focilevel an nicht-reparierten Brüchen. Dies ist konsistent zu den *in vitro*-Daten von Patientengruppe I und zu den *in vitro*-Studien von Rothkamm & Lobrich (2003). Die gemessene Focianzahl nach 10 mGy und 24 h unterschied sich zwar lediglich um ca. 0,05 Foci pro Zelle von unbestrahlten Proben, trotzdem konnten auf einen Blick bestrahlte von nicht-bestrahlten Proben unterschieden werden. Beispielbilder hierzu finden sich im Anhang, Seite 154 ff.

4.4.3 Nachweis der Kolo­kalisierung von γ H2AX und 53BP1 in verschiedenen murinen Geweben mittels IFM

Um die mittels DAB- und γ H2AX-IF-Färbung nachgewiesenen DSBs zu validieren, wurde 53BP1 als zweiter Marker für DSBs eingeführt (Abb. 4.26). Hierfür wurden WT-Mäuse an einem Linearbeschleuniger mit 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 1 Gy bestrahlt und nach 10 min und 5 h das Gehirn, die Lunge, das Herz, der Dünndarm sowie die Nieren entnommen und fixiert. Es ist zu erkennen, dass nicht-bestrahlte Kerne (K) nur vereinzelt einen 53BP1-Fokus aufweisen (linke Spalte). 10 min nach Bestrahlung sind mehrere Foci pro Kern sichtbar (mittlere Spalte). Nach einer Reparaturzeit von 5 h ist die Focianzahl sichtbar reduziert. Diese Beobachtung bestätigt Daten von Rübe et al. (2008b) mit γ H2AX in verschiedenen Organen von WT-Mäusen.

Nachdem die 53BP1-IF-Färbung ein ähnliches Bild ergeben hatte wie die gleiche Färbung von γ H2AX von Rübe et al. (2008b) und den schon gezeigten murinen Lymphozyten, wurden in einem ersten Ansatz zur Quantifizierung dieser Foci im murinen System die beiden Marker auf eine vorhandene Kolo­kalisierung überprüft. Hierfür wurden WT-Mäuse (C57BL/6-Mäuse), BALB/c-, A-T- und SCID-Mäuse an einem Linearbeschleuniger mit 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy bestrahlt, die Organe nach einer Reparaturzeit von 5 h fixiert und anschließend die Anzahl an γ H2AX- und 53BP1-Foci im Gehirn, in der Lunge, dem Herz und dem Dünndarm bestimmt (Abb. 4.27). Dabei ergaben sich nach Quantifizierung der Foci sehr ähnliche Werte für den Nachweis von γ H2AX- und 53BP1 in allen Mausstämmen und allen untersuchten Organen. Diese betragen für SCID-Mäuse in den Organen im Schnitt 8,5 bis 9, in A-T-Mäusen 6,5 bis 8, in BALB/c-Mäusen 5 bis 6 und in C57BL/6-Mäusen 4 bis 5 Foci pro Zelle.

Somit spiegelte sich zum einen parallel zu den Lymphozytendaten aus Kap. 4.1 der genetische Hintergrund der verschiedenen Mausstämmen in Form von Unterschieden in der Focianzahl im Gewebe wider. Zum anderen konnte durch die ähnlichen Werte der beiden Marker bestätigt werden, dass 53BP1 ebenso wie γ H2AX für die Quantifizierung von DSBs geeignet ist, da es nach dem Auftreten eines DSBs mit γ H2AX am Bruchort kolo­kalisiert.

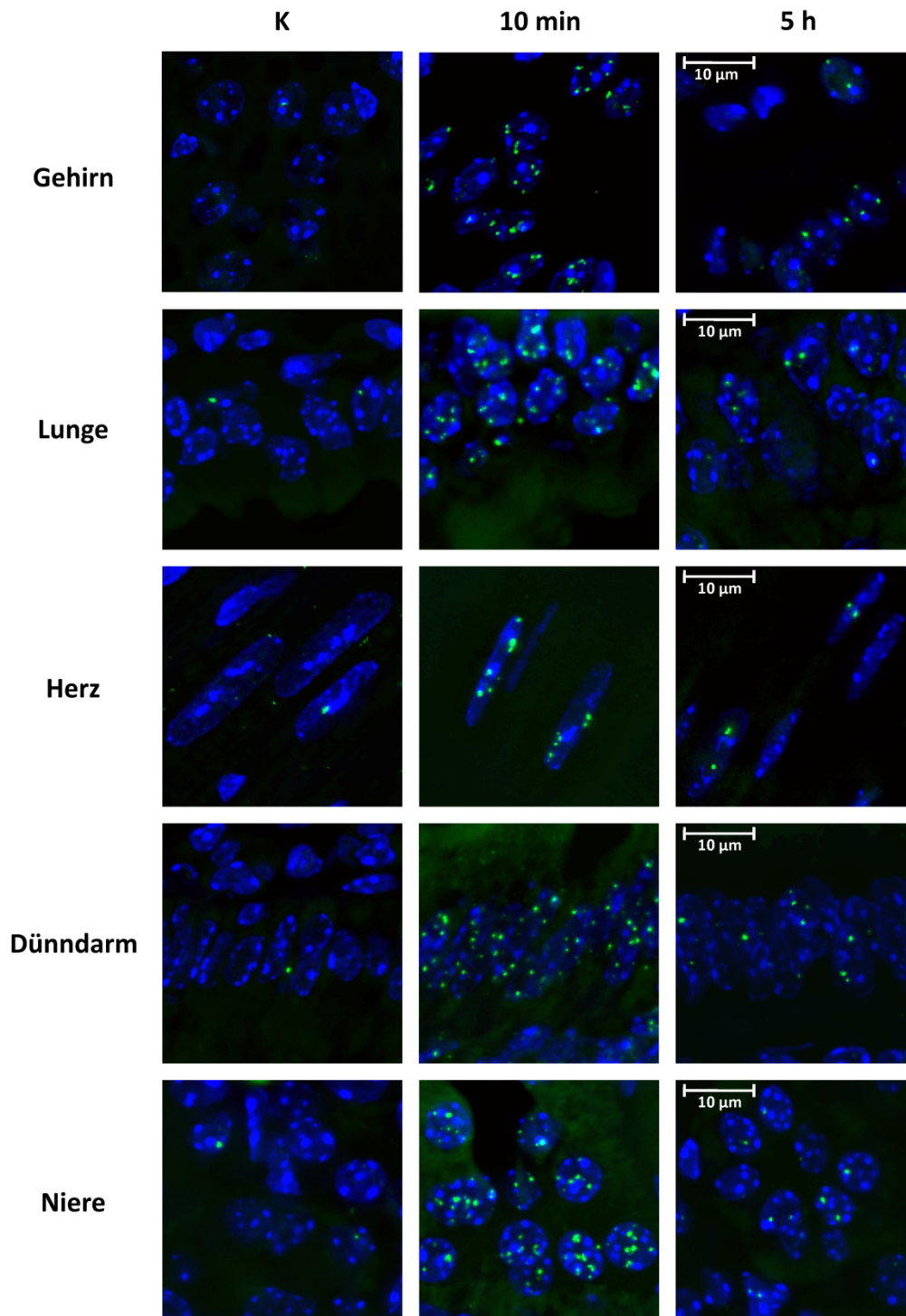


Abb. 4.26: 53BP1-IF-Färbung in verschiedenen murinen Gewebetypen nach 1 Gy Röntgenstrahlung *in vivo*

Die Aufnahmen zeigen Zellkerne verschiedener muriner Gewebetypen. Im Gehirn sind Kerne der neuronalen Zellen und Gliazellen der Endhirnrinde gezeigt, in der Lunge Kerne der Zellen des Bronchialepithels, im Herz Kerne der gestreiften Herzmuskelfasern und im Dünndarm Kerne der Epithelzellen der Villi der Mukosa. Zusätzlich wurden auch Tubuluszellkerne der Nierenrinde abgebildet. In allen Abbildungen wurden die DAPI-gefärbten Kerne (blau) mit den mittels FITC markierten 53BP1 (grün) überlagert. Die Zellkerne in der linken Spalte wurden nicht bestrahlt (K). Die Zellkerne in der mittleren und rechten Spalte wurden mit 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 1 Gy bestrahlt. Für die Bildausschnitte wurden innerhalb der Zellkerne mehrere Bildebenen mit 630facher Vergrößerung fotografiert. Diese Ebenen wurden übereinander gelagert und dekonvolviert, sodass alle in den Zellkernen befindlichen Foci erfasst und klar dargestellt werden konnten.

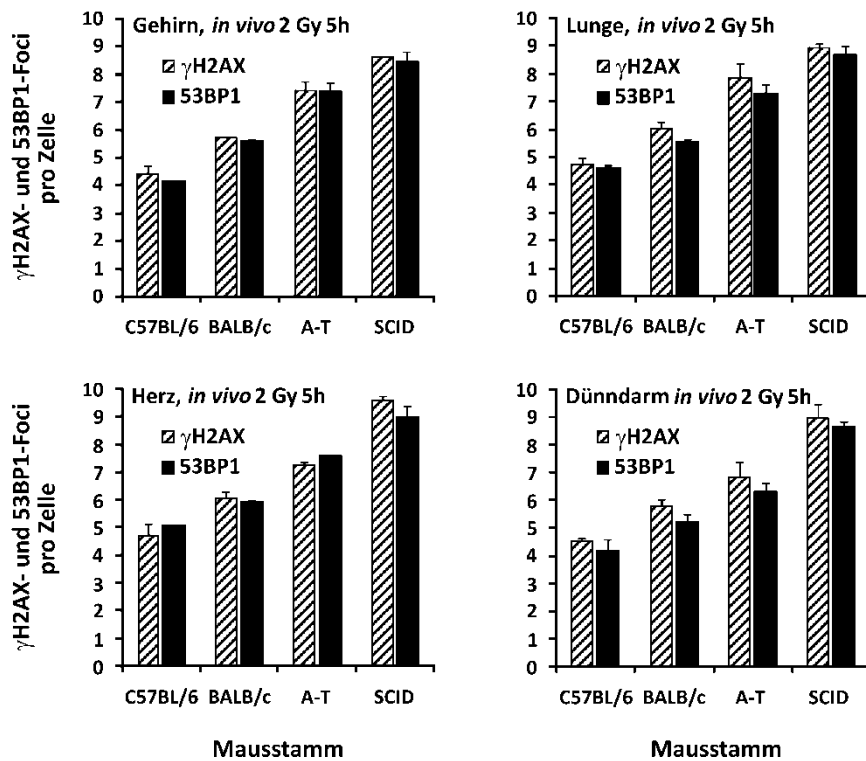


Abb. 4.27: Quantifizierung von γ H2AX und 53BP1-Foci in unterschiedlichen Geweben verschiedener Mausstämmen nach 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy *in vivo*

Aufgetragen ist die Anzahl an γ H2AX- und 53BP1-Foci in unterschiedlichen Gewebetypen von vier verschiedenen Mausstämmen nach *in vivo*-Bestrahlung. Für die IF-Analyse wurden WT-Mäuse (C57BL/6), Mäuse mit einer verminderten Expression der DNA-PK_{CS} (BALB/c), Mäuse mit einem Defekt im ATM-Protein (A-T) sowie Mäuse mit einem Defekt in der DNA-PK_{CS} (SCID) verwendet. Diese wurden mit 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy bestrahlt und die Anzahl an γ H2AX- und 53BP1-Foci nach 5 h bestimmt. Die Werte der unbestrahlten Kontrollen betragen ca. 0,04 Foci pro Zelle für C57BL/6-Mäuse, 0,68 Foci pro Zelle für SCID-Mäuse, 0,55 Foci pro Zelle für A-T-Mäuse und 0,6 Foci pro Zelle für BALB/c-Mäuse. Diese wurden vor dem Auftragen der dargestellten Werte abgezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler über drei Experimente.

4.4.4 *In vivo*-Nachweis von DSBs in verschiedenen murinen Geweben nach mehreren Röntgendosen mittels 53BP1-IFM

Nachdem das IF-Verfahren im Mausmodell in verschiedenen Gewebetypen erfolgreich etabliert wurde und hierbei der Nachweis selbst geringer Reparaturdefekte die Zuverlässigkeit der Methode bestätigt hatte, konnte dieser Ansatz auch nach niedrigen Dosen und Färbung von 53BP1 als weiterer Marker von DSBs angewendet werden. Hierfür wurde der gleiche Versuchsansatz durchgeführt wie in Kap. 4.4.2 für γ H2AX. Die Messung der Induktion ergab, dass diese nach einer Bestrahlung von 1 Gy und 10 mGy linear war (Abb. 4.28 A). Nach einer Bestrahlung mit 1 Gy wurden für alle Organe ca. 7 bis 8 Foci pro Zelle induziert und nach 10 mGy 0,08 bis 0,09 Foci pro Zelle. Nach einer Dosis von 100 mGy lagen die Induktionswerte mit 0,55 bis 0,6 Foci pro Zelle dagegen ca. 30% zu niedrig.

Die Messung der Reparaturkapazität nach den verschiedenen Dosen ergab, dass nach einer Dosis von 1 Gy und einer Reparatur von 5 h nach Bestrahlung die Focizahl um etwa 78% reduziert war. Nach 24 h verblieben noch etwa 4% der ursprünglich induzierten DSBs (Abb. 4.28 B). Nach einer Dosis von 100 mGy war die ursprünglich induzierte Focizahl 5 h nach Bestrahlung um 66% vermindert. 24 h nach Bestrahlung waren noch etwa 9% der ursprünglichen Foci vorhanden (Abb. 4.28 C). Nach einer Dosis von 10 mGy und einer Reparaturzeit von 5 h war die 53BP1-Focizahl um lediglich 37% reduziert. Nach einer Reparaturzeit von 24 h verblieben noch ca. 50% der induzierten Brüche (Abb. 4.28 D). Diese Daten sind mit den γ H2AX-Daten konsistent. Es konnte somit nach der niedrigsten Dosis eine verminderte DSB-Reparatur beobachtet werden. Außerdem verblieb nach Dosen von 100 mGy und 10 mGy und einer Reparaturzeit von 24 h eine residuale Focizahl, die ca. 0,05 Foci pro Zelle betrug, sodass nach diesen Dosen nicht auf Hintergrundniveau repariert wurde.

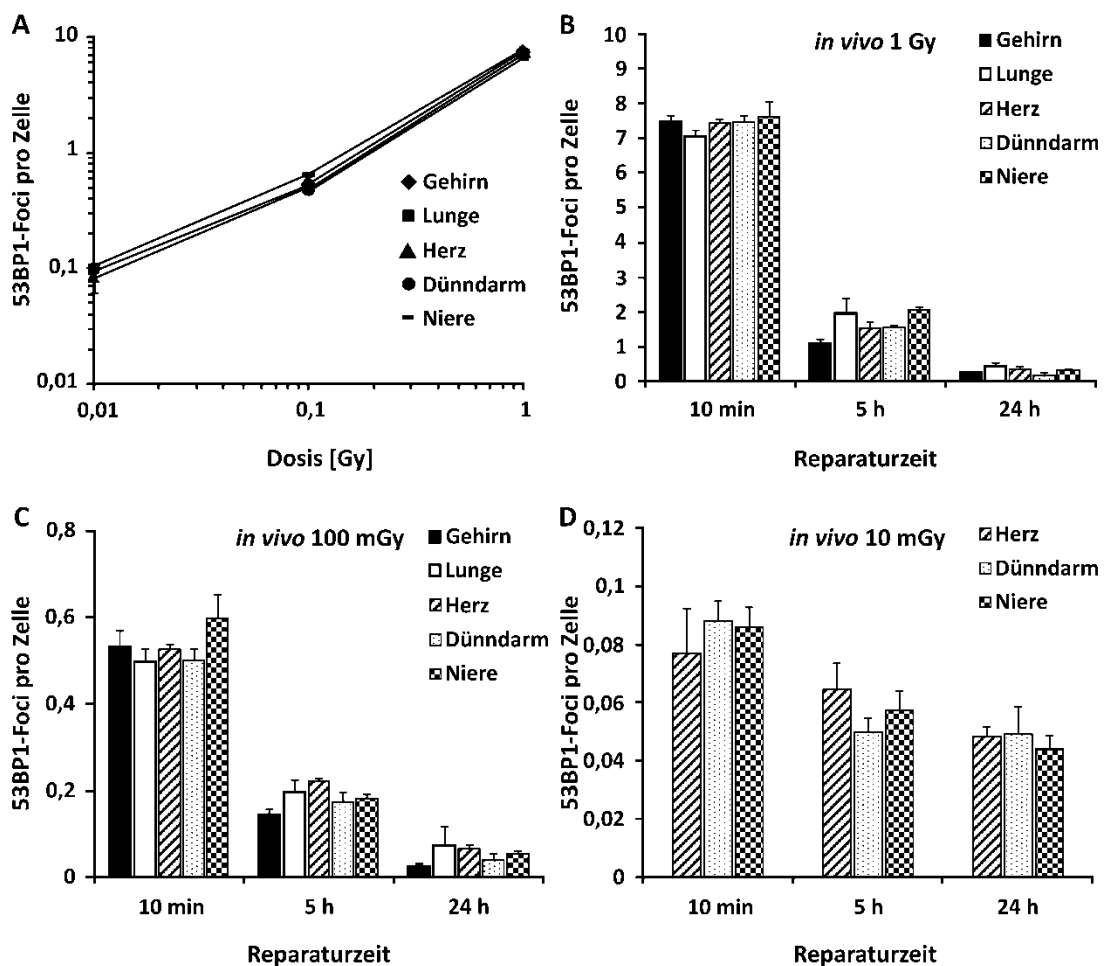


Abb. 4.28: Quantifizierung der Induktion und Reparatur von 53BP1-Foci in verschiedenen murinen Gewebetypen nach 6 MV-Röntgenstrahlung und verschiedenen Röntgendosen *in vivo*

Für die Quantifizierung der Anzahl an 53BP1-Foci als Marker für DSBs nach 6 MV-Röntgenbestrahlung wurden Mäuse mit 1 Gy, 100 mGy und 10 mGy bestrahlt und die Induktion (A) sowie die Reparatur dieser Foci nach 5 h und 24 h gemessen (B, C, D). Für die Fehlerbalken wurde der Standardfehler über mindestens drei Experimente berechnet. Die Fociwerte von unbestrahlten Kontrollen (ca. 0,04 Foci pro Zelle) wurden für alle Organe abgezogen.

Zusammengefasst konnte durch Quantifizierung von 53BP1-Foci als weiterer Marker von DSBs die zuvor in Kap. 4.4.2 mit γ H2AX erhaltenen Daten bestätigt werden. *In vivo* war nach einer niedrigen Röntgendosis die DSB-Reparaturkapazität eingeschränkt, während nach höheren Dosen in der gleichen Reparaturzeit deutlich mehr der induzierten Brüche repariert wurden. Außerdem verblieb nach den beiden niedrigsten applizierten Dosen und einer Reparaturzeit von 24 h nach Bestrahlung ein residuales Focilevel von 0,05 Foci pro Zelle an unreparierten Brüchen. Diese Daten bestätigen sowohl die *in vitro* der Lymphozyten von Patientengruppe I (Kap. 4.2.1), als auch die Daten aus den früheren Untersuchungen mit konfluenten WT-Fibroblasten (Rothkamm & Lobrich 2003).

Das in der Studie von Rothkamm & Lobrich (2003) verbleibende residuale Focilevel bestand auch nach Reparaturzeiten, die über 24 h hinausgingen. Daher wurde im neu etablierten Mausmodell überprüft, ob dies auch für physiologische Bedingungen zutreffend ist. Hierfür wurden WT-Mäuse am Linearbeschleuniger mit 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 100 mGy und 10 mGy bestrahlt und nach zusätzlichen Reparaturzeiten von 48 h und 72 h das Herz, der Dünndarm und die Nieren fixiert. Anschließend wurde die Anzahl an 53BP1-Foci in den bereits beschriebenen Zellen dieser Organe quantifiziert. Die Messungen ergaben, dass nach Bestrahlung mit 100 mGy die Anzahl an 53BP1-Foci, welche nach 24 h Reparatur bei neun Prozent der ursprünglichen Focianzahl lag, bis 72 h vollständig verschwanden (Abb. 4.29 A). Nach Bestrahlung mit 10 mGy sank die Anzahl an 53BP1-Foci, welche nach 24 h Reparatur bei 50% der ursprünglichen Focianzahl lag, bis 72 h auf 30% der induzierten Brüche ab (Abb. 4.29 B).

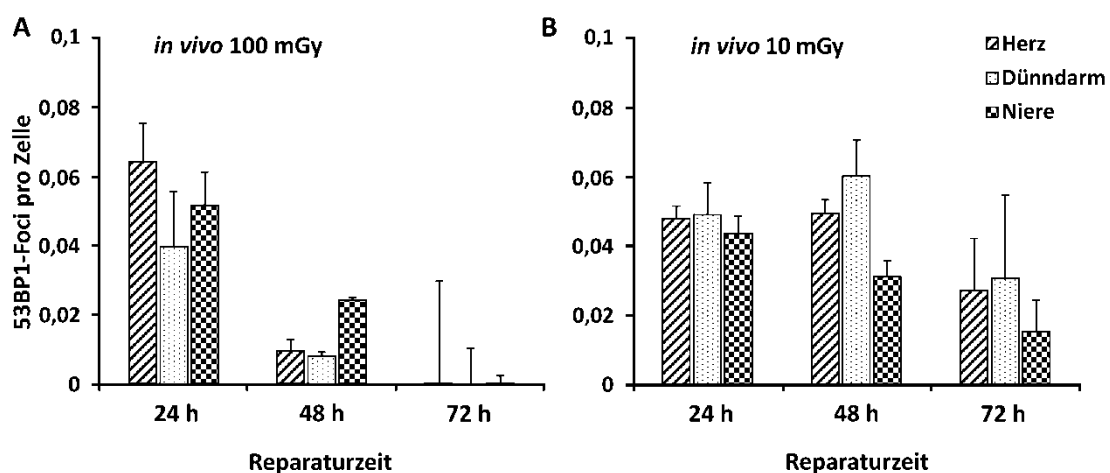


Abb. 4.29: Quantifizierung der Reparatur von 53BP1-Foci in verschiedenen murinen Gewebetypen nach 6 MV-Röntgenstrahlung und Dosen von 100 und 10 mGy *in vivo*

Für die Quantifizierung der Anzahl an 53BP1-Foci wurden WT-Mäuse mit 6 MV-Röntgenbestrahlung und einer Dosis von 100 mGy (A) oder 10 mGy (B) bestrahlt und die Reparatur dieser Foci nach 24 h, 48 h und 72 h gemessen. Die Daten nach 24 h resultieren aus mindestens drei und die übrigen Daten bis 72 h aus jeweils zwei Experimenten. Für die Fehlerbalken wurde für die 24 h-Punkte der Standardfehler und für die folgenden Reparaturzeitpunkte die Standardabweichung berechnet. Die Fociwerte von unbestrahlten Kontrollen (ca. 0,04 Foci pro Zelle) wurden abgezogen.

Insgesamt konnte in den Mausstudien beobachtet werden, dass auch *in vivo* die Reparaturkapazität nach einer niedrigen Dosis eingeschränkt ist. Außerdem konnte 24 h nach Bestrahlung ein residuales Focilevel gemessen werden. Nach längeren Reparaturzeiten waren nach einer Dosis von 10 mGy noch residuale Foci messbar, während nach 100 mGy alle induzierten Brüche verschwanden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Daten ab 48 h aus nur zwei Experimenten resultierten, sodass es weiterer Experimente bedarf, um diese Daten definitiv bestätigen zu können.

4.4.5 *In vitro*-Experimente zur DSB-Reparatur humaner Fibroblasten nach mehreren Röntgendosen mittels γ H2AX- und pATM-IFM

Da die *in vivo*-gemessenen Daten die Ergebnisse bisheriger *in vitro*-Studien mit Fibroblasten bestätigten (Rothkamm & Lobrich 2003), wurde in abschließenden Experimenten der Frage nachgegangen, warum nach Bestrahlung Brüche unrepariert verbleiben. Vorher sollten die Beobachtungen von Rothkamm & Lobrich (2003) mit einer neuen Versuchsreihe validiert werden. Hierfür wurden *in vitro* Experimente mit WT-Fibroblasten (HSF1-Zellen) durchgeführt und dabei zusätzliche Röntgendosen appliziert. Ergänzend zur Studie von Rothkamm & Lobrich (2003) wurden zwei verschiedene DSB-Marker angewandt. Da die Focianzahl für 53BP1 in unbestrahlten Kontrollen humaner Zellen ca. 0,5 Foci pro Zelle betragen (vgl. Kap. 4.1.), wurde neben γ H2AX als zweiter Marker für DSBs pATM statt 53BP1 gewählt.

Für die Experimente wurden konfluente WT-Fibroblasten mit 200 mGy, 80 mGy, 40 mGy, 20 mGy, 10 mGy und 2 mGy bestrahlt, nach 15 min, 2,5h, 5 h, 24 h, 48 h und 72 h fixiert und IF-gefärbt. Die Messung der Induktionen ergab, dass diese annähernd linear waren (Abb. 4.30). Eine Ausnahme bildeten die Dosen 2 mGy und 200 mGy, für welche die Werte leicht erhöht waren. Innerhalb von 24 h reduzierte sich die Anzahl an γ H2AX bzw. pATM-Foci bei einer Dosis von 200 mGy um ca. 95%. Während bei einer Dosis von 80 mGy dieser Anteil ebenfalls noch 90% bis 94% betrug, nahm der Anteil an reparierten DSBs bis 10 mGy sukzessive ab. Nach 40 mGy wurden 76% bis 82%, nach 20 mGy 66% bis 72% und nach 10 mGy 40% bis 50% der Brüche repariert. Nach 2 mGy fand bis 72 h nahezu keine Reparatur statt.

Bei Betrachtung der längeren Reparaturzeiten (24 bis 72 h) reduzierte sich die Focianzahl bei den drei höheren Dosen noch um maximal 50%, während sich die Anzahl an γ H2AX- bzw. pATM-Foci innerhalb des gleichen Zeitraums bei den drei kleineren Dosen nicht mehr stark veränderte. Nach 72 h betrug die Restfocianzahl bei den drei höheren Dosen noch 2 (200 mGy) bis 8% (40 mGy), während nach 20 mGy 23 bis 30% und nach 10 mGy 40 bis 50% der Foci verblieben.

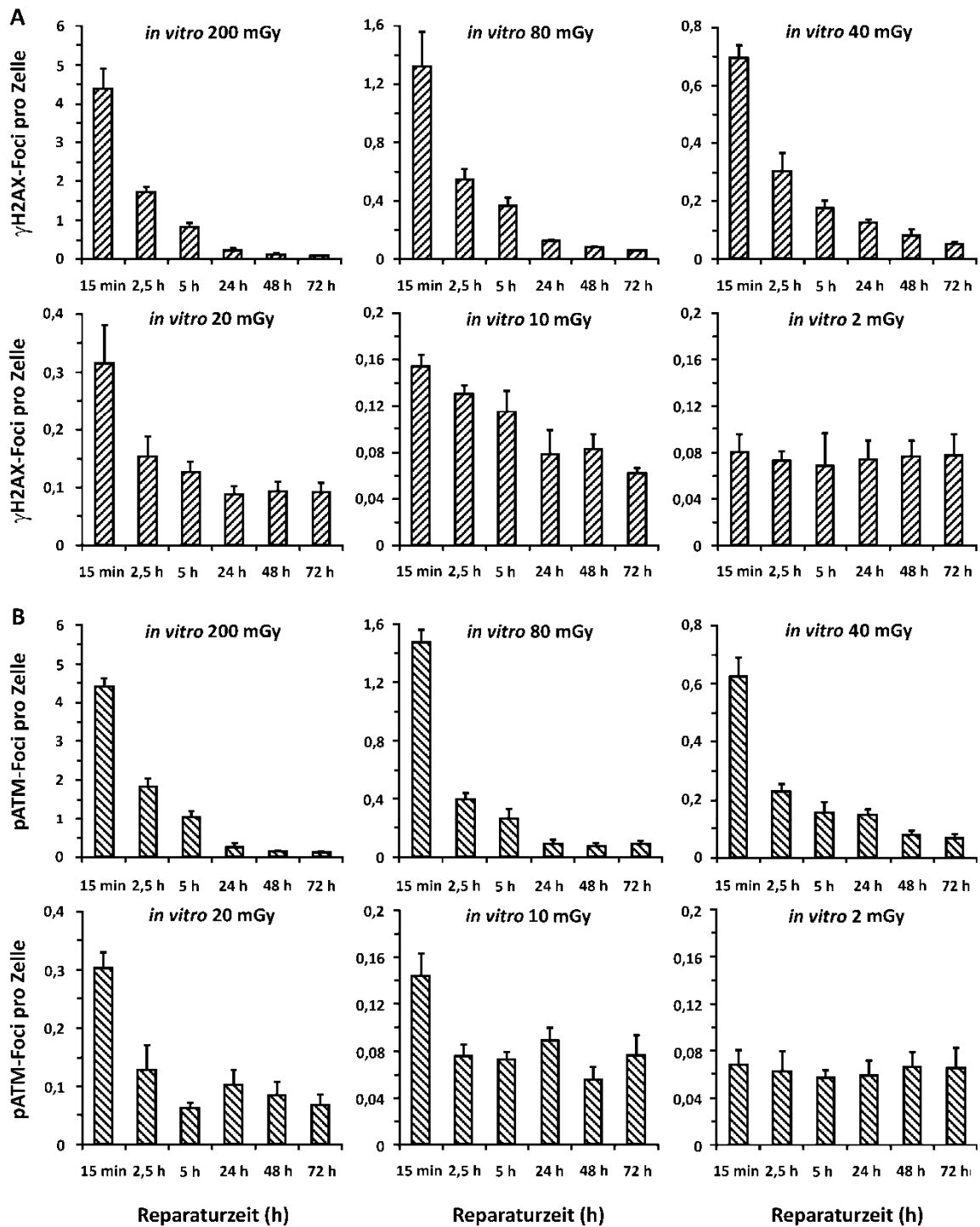


Abb. 4.30: Quantifizierung der Induktion und Reparatur von γ H2AX- und pATM-Foci in humanen primären Fibroblasten nach 90 kV-Röntgenstrahlung und verschiedenen Röntgendosen *in vitro*

In konfluenten primären WT-Fibroblasten (HSF1-Zellen) wurde die Anzahl an (A) γ H2AX- und (B) pATM-Foci nach 90 kV-Röntgenstrahlung und Dosen von 200, 80, 40, 20, 10 und 2 mGy bis 72 h gemessen. Anschließend wurde die Focianzahl nach 15 min, 2,5 h, 5 h, 24 h, 48 h und 72 h bestimmt. Die Fociwerte von unbestrahlten Kontrollen (ca. 0,1 bis 0,15 Foci pro Zelle für beide Marker) wurden abgezogen. Für die Fehlerbalken wurde der Standardfehler über mindestens drei Experimente berechnet.

Zusammengefasst konnten die Beobachtungen einer früheren Studie von Rothkamm & Lobrich (2003), dass die Reparaturkapazität in konfluenten Fibroblasten mit niedriger werdender Dosis abnimmt, mit einer feineren Abstufung der verwendeten Dosen sowie einem zusätzlichen Marker für DSBs, bestätigt werden. Außerdem konnte wiederholt beobachtet werden, dass nach allen Dosen ≥ 10 mGy die Reparatur nicht vollständig verlief und eine residuale Focianzahl von 0,05 bis 0,09 Foci pro Zelle verblieb. Diese Anzahl wurde auch nach 72 h nicht unterschritten. Nach einer Bestrahlung mit 2 mGy nahm die induzierte Focianzahl nicht mehr ab.

4.4.6 Behandlung humaner Fibroblasten mit H₂O₂

Nach der Bestrahlung humaner WT-Fibroblasten mit verschiedenen Röntgendosen konnte nicht nur wiederholt beobachtet werden, dass die Reparatur mit sinkender Dosis immer mehr abnahm, sondern auch, dass auch nach einer Reparaturzeit von 72 h noch ein Restfocilevel von ca. 0,05 bis 0,09 Foci pro Zelle verblieb. Studien zeigten, dass konfluente WT-Fibroblasten, denen es wieder erlaubt wurde zu proliferieren, alle induzierten DSBs vollständig reparierten (Rothkamm & Lobrich 2003). Studien mit Tumorzellen konnten im Gegensatz zu den Studien in primären konfluenten Zellen ebenfalls kein residuales Focilevel beobachten. Weiterhin war auch keine Verschlechterung der Reparaturkapazität mit niedriger applizierter Dosis zu messen (Asaithamby & Chen 2009). Eine Ursache hierfür kann darin liegen, dass Tumorzellen durch ihr hohes Proliferationsvermögen einen erhöhten oxidativen Metabolismus gegenüber primären Zellen aufweisen (Reitzer et al. 1979, Moreadith & Lehninger 1984). Durch die damit verbundene Entstehung von *reactive oxygen species* (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) und damit einhergehender DNA-Schäden könnte die Reparatur strahleninduzierter DSBs stimuliert werden. Aus diesem Ansatzpunkt heraus stellte sich deshalb die Frage, ob eine Erhöhung des oxidativen Levels in primären konfluenten Zellen zur Reparatur von residualen DSBs führt.

In einem ersten Versuchsansatz zur Klärung dieser Frage wurden primäre konfluente WT-Fibroblasten (HSF1-Zellen) vor 90 kV-Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 10 mGy mit 75 μ M H₂O₂ behandelt. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei dieser Konzentration zwar Einzelstrangbrüche (ESBs), jedoch keine DSBs induziert werden (Dahm-Daphi et al. 2000). Neben behandelten Proben wurden auch nicht-behandelte Proben mitgeführt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen nach einer Induktionszeit von 15 min und einer Reparaturzeit von 24 h fixiert und die Anzahl an γ H2AX-Foci bestimmt (Abb. 4.31).

Während unbehandelte Kontrollzellen 0,1 γ H2AX-Foci pro Zelle aufwiesen, was konsistent zu den bisherigen Fibroblastendaten war, ergab eine Messung nach Behandlung von unbestrahlten Zellen mit 75 μ M H₂O₂ und einer Induktionszeit von 15 min, dass diese Proben im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollzellen 33% mehr DSBs aufwiesen. Dies stand im Gegensatz zu Dahm-Daphi et al. (2000), die mit der gleichen Konzentration noch keine DSBs messen konn-

ten. Allerdings verwendeten sie zur Messung von DSBs die Methode der *Neutral gel electrophoresis*, welche weniger sensitiv ist als die IFM.

Eine Bestrahlung mit 10 mGy führte zu einer Focianzahl von 0,19 Foci pro Zelle, was in etwa dem Wert entsprach, der in Abb. 4.30 A mit der gleichen Dosis gemessen wurde. Nach einer vorherigen Behandlung mit 75 μM H_2O_2 betrug die Induktion 0,14 Foci pro Zelle, was etwa 23% niedriger war als der gemessene Wert in der Probe ohne H_2O_2 -Behandlung. Nach einer Reparaturzeit von 24 h konnte bei nicht-behandelten Zellen ein residuales Focilevel von 0,07 Foci pro Zelle gemessen werden, was etwa 38% der ursprünglich induzierten DSBs entsprach. Dies war konsistent mit den γH2AX - und pATM-Daten aus Abb. 4.30. Zellen, die vor der Bestrahlung mit 75 μM H_2O_2 behandelt wurden, reparierten dagegen auf Hintergrundniveau.

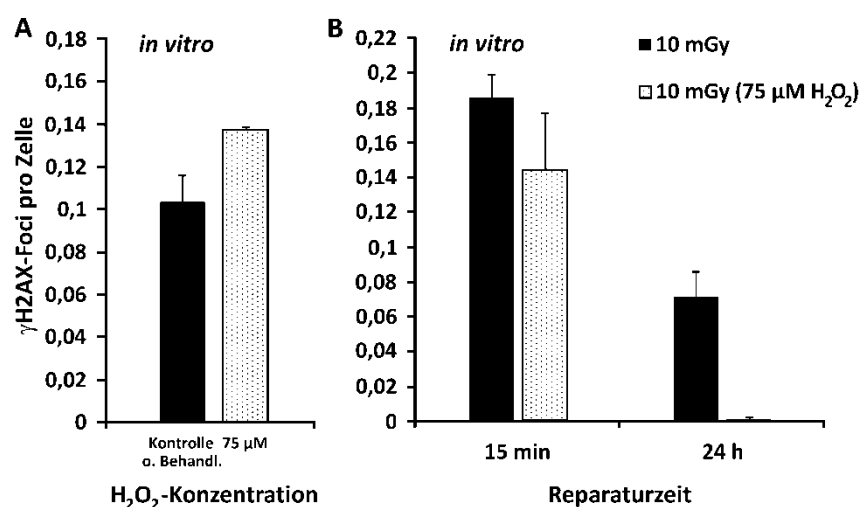


Abb. 4.31: Quantifizierung der Induktion und Reparatur von γH2AX -Foci in humanen primären Fibroblasten nach H_2O_2 -Behandlung alleine und nach anschließender *in vitro*-Bestrahlung mit 90 kV-Röntgenstrahlung

In konfluenten WT-Fibroblasten (HSF1-Zellen) wurde die Anzahl an γH2AX -Foci nach einer Induktionszeit von 15 min in unbestrahlten Zellen ohne vorherige Behandlung (= Kontrolle o. Behandl.) und nach Behandlung mit 75 μM H_2O_2 bestimmt (A). 24 h nach H_2O_2 -Behandlung war der resultierende Fociwert mit dem des 15 min-Wertes vergleichbar. Weiterhin wurden Proben mit 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 10 mGy bestrahlt und entweder nicht behandelt oder vor Bestrahlung mit 75 μM H_2O_2 behandelt (B). Die Fociwerte der unbestrahlten Kontrollen aus A wurden vor der Auftragung abgezogen. Für die Fehlerbalken wurde der Standardfehler über mindestens drei Experimente berechnet.

Ein Problem an diesem ersten Ansatz zur Messung der DSB-Reparatur nach Erhöhung des oxidativen Levels in der Zelle war, dass es bei der verwendeten H_2O_2 -Konzentration neben spontanen oder strahleninduzierten Foci auch zu anderen Fluoreszenzsignalen im Zellkern kam, die die Auswertung erschwerten. Ein Beispiel hierfür ist in Abb. 4.32 C zu sehen. Diese Fluoreszenzsignale (weiße Pfeile) variierten in Größe und Leuchtintensität und beeinflussten dadurch die gemessenen Fociwerte. In exponentiellen Zellen, die mit vergleichbaren Konzentrationen an H_2O_2 behandelt wurden, konnten mehrere distinkte Foci beobachtet werden, die sich in ihrem Erscheinungsbild nicht von spontanen oder strahleninduzierten Foci unterschieden (mündliche Mitteilung Andrea Beucher, Abteilung Strahlenbiologie, TU Darmstadt). Es war daher nicht aus-

zuschließen, dass die in konfluenten Zellen beobachteten Fluoreszenzsignale ebenfalls H_2O_2 -induzierte DSBs repräsentierten. Trotzdem wurden diese nicht in die Auswertung miteinbezogen.

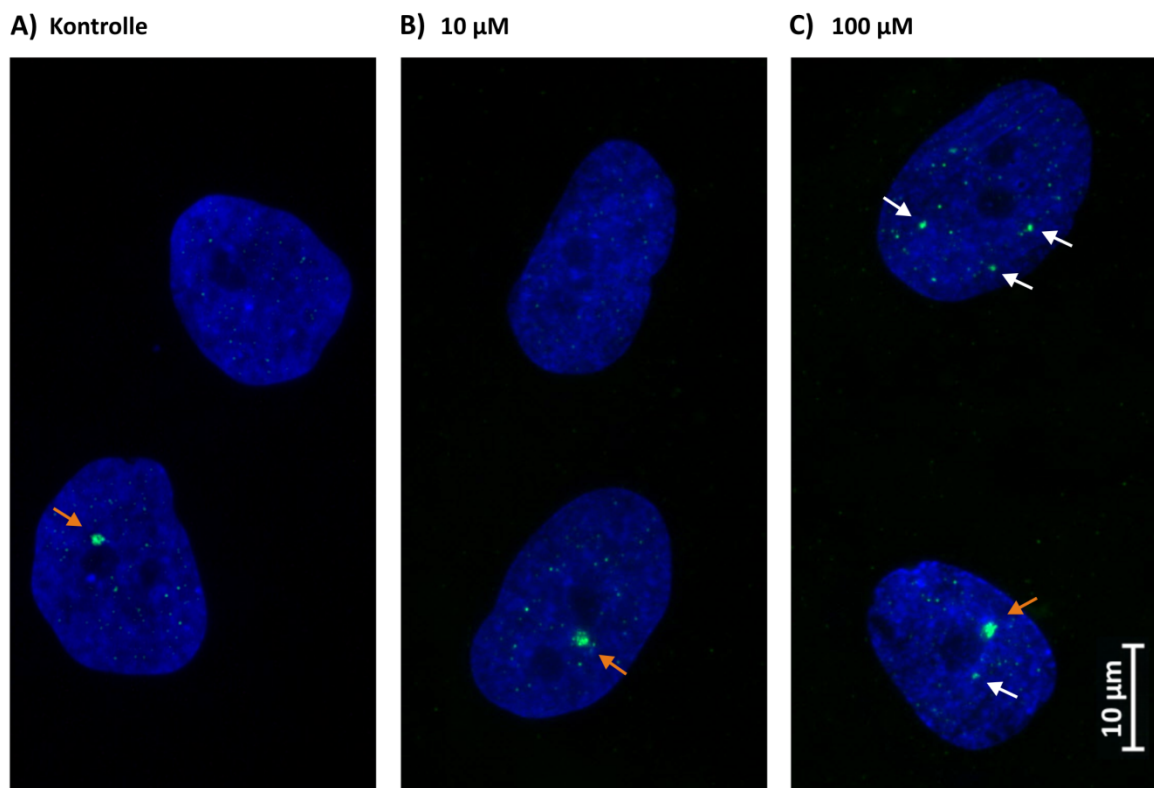


Abb. 4.32: Fluoreszenzsignale spontaner und H_2O_2 -induzierter Foci in humanen primären WT-Fibroblasten

Die Abbildungen zeigen das γH2AX -Fluoreszenzsignal unbestrahlter konfluenter WT-Fibroblasten (HSF1-Zellen) ohne H_2O_2 -Behandlung (A), 15 min nach Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ H_2O_2 (B) und nach Behandlung mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 (C). Die orangefarbenen Pfeile markieren spontan auftretende γH2AX -Foci, die weißen Pfeile markieren Fluoreszenzsignale, die nach H_2O_2 -Behandlung auftraten.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden zunächst verschiedene H_2O_2 -Konzentrationen an unbestrahlten konfluenten Fibroblasten ausgetestet, um zu bestimmen, ab welcher Konzentration eine sichtbare Erhöhung störender Fluoreszenzsignale und der gemessenen Focianzahl festzustellen war (Abb. 4.33). Um einen Einfluss der Versuchsbedingungen auf die Focianzahl auszuschließen, wurde neben einer unbehandelten Probe (= Kontrolle) auch eine Mock-behandelte Probe mitgeführt. Diese erfuhr die gleichen Behandlungsbedingungen wie die behandelten Probe, jedoch ohne Zugabe von H_2O_2 . Es war zu erkennen, dass bis zu einer H_2O_2 -Konzentration von $50 \mu\text{M}$ alle behandelten Proben das gleiche Fluoreszenzsignal aufwiesen wie die Kontrollprobe ohne Behandlung (vergleiche auch Abb. 4.32 A und B). Erste Fluoreszenzsignale, wie sie durch die weißen Pfeile in Abb. 4.32 C gezeigt sind, traten ab einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ auf. Eine deutliche Erhöhung der γH2AX -Focianzahl war ab einer Konzentration von $70 \mu\text{M}$ zu sehen, was konsistent mit den Daten in Abb. 4.31 ist. Aus diesen Ergebnissen heraus sollte für die nächsten Experimente eine Konzentration von unter $50 \mu\text{M}$ gewählt werden.

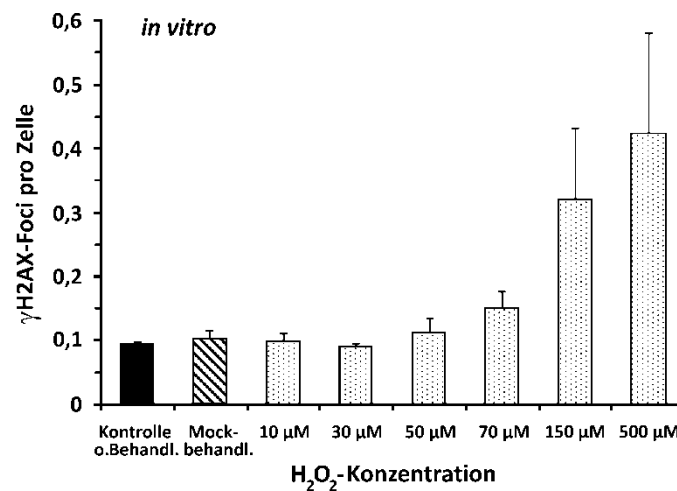


Abb. 4.33: Quantifizierung der Induktion von γ H2AX-Foci in humanen primären WT-Fibroblasten nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an H_2O_2

Konfluente primäre Fibroblasten wurden entweder nicht behandelt (= Kontrolle o. Behndl.), Mock-behandelt oder mit verschiedenen Konzentrationen an H_2O_2 behandelt. 15 min nach der Behandlung wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci gemessen. Für die Fehlerbalken wurde der Standardfehler über drei Experimente berechnet.

Für das folgende Experiment wurde eine Konzentration von 10 μ M gewählt. In einer Studie, die mittels dem *alkaline Comet-Assay* ESBs in exponentiellen Hühnerzellen maß, gingen die Autoren aufgrund früherer Messungen davon aus, dass eine Konzentration von 100 μ M etwa 30.000 ESBs induziert (Fisher et al. 2007). Wenn man von früheren Messungen ausgeht, welche ergaben, dass die Anzahl an ESBs linear mit der H_2O_2 -Konzentration ansteigt, (Dahm-Daphi et al. 2000), so lässt sich davon ausgehend extrapolieren, dass nach einer Konzentration von 10 μ M mehrere tausend ESBs induziert werden. Fisher et al. konnten bei einer Konzentration von 100 μ M mittels γ H2AX-IF-Analyse 30 min nach Behandlung etwa 6 DSBs pro Zelle messen. Dies ist konsistent zu Messungen mit der gleichen Konzentration in exponentiellen Fibroblasten (mündliche Mitteilung Andrea Beucher, Abteilung Strahlenbiologie, TU Darmstadt). Dahm-Daphi et al. (2000) konnten mittels dem *Alkaline unwinding assay* erst ab einer Konzentration von 25 μ M ESBs messen. Da sie jedoch nach einer Konzentration von 100 mM etwa 100 DSBs ermitteln konnten und von einem DSB:ESB-Verhältnis von 1:1000 ausgingen, sollten nach einer Konzentration von 10 μ M ebenfalls viele ESBs auftreten. Dies und die Tatsache, dass der *Alkaline unwinding assay* bei diesen Konzentrationen seine Sensitivitätsgrenze erreicht, lässt vermuten, dass eine H_2O_2 -Konzentration von 10 μ M ausreicht, um viele zusätzliche ESBs in der Zelle zu erzeugen.

Für das folgende Experiment wurden primäre humane WT-Fibroblasten (HSF1-Zellen) vor Bestrahlung mit 10 mGy entweder nicht behandelt, Mock-behandelt oder mit 10 μ M H_2O_2 behandelt. Anschließend wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci nach 15 min sowie nach 24 h gemessen. Nach Messung der Induktion war zu sehen, dass nicht behandelte und Mock-behandelte Zellen eine annähernd gleiche Focianzahl von ca. 0,15 Foci pro Zelle aufwiesen (Abb. 4.34). Dieser Induktionswert war konsistent mit den γ H2AX- und ATM-Daten (Abb. 4.30). Zellen, die mit H_2O_2

behandelt wurden, wiesen eine Induktion auf, die um 15% niedriger war. 24 h nach Bestrahlung konnte bei nicht behandelten und Mock-behandelten Zellen ein residuales Focilevel von 0,06 bis 0,07 Foci pro Zelle gemessen werden, was etwa 38,5 bis 45% der ursprünglich induzierten Focianzahl entsprach. Dies war ebenfalls konsistent mit den γ H2AX- und ATM-Daten. Eine Mock-Behandlung der Zellen mit den gleichen Versuchsbedingungen wie bei behandelten Zellen hatte demnach keinen Effekt auf das residuale Focilevel. Zellen, die mit 10 μ M H₂O₂ behandelt wurden, wiesen dagegen nur noch 4% der ursprünglich induzierten DSB-Anzahl auf.

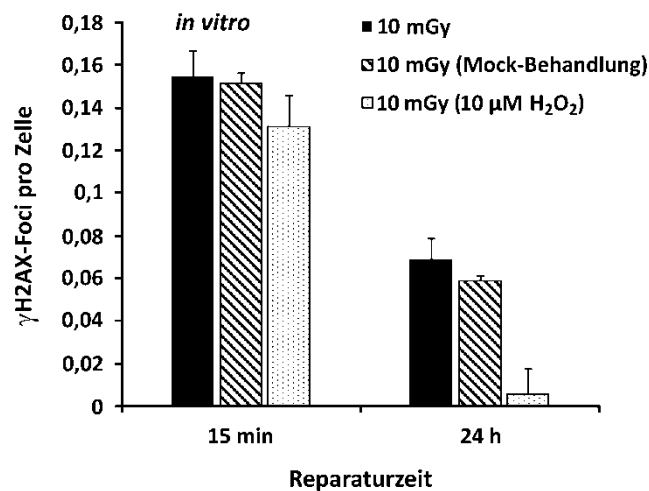


Abb. 4.34: Quantifizierung der Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci in humanen primären Fibroblasten nach H₂O₂-Behandlung und anschließender *in vitro*-Bestrahlung mit 90 kV-Röntgenstrahlung

Konfluente primäre WT-Fibroblasten (HSF1-Zellen) wurden mit 90 kV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 10 mGy bestrahlt und anschließend die Anzahl an γ H2AX-Foci nach 15 min und 24 h bestimmt. Die Zellen wurden vor Bestrahlung entweder nicht behandelt, Mock-behandelt oder mit 10 μ M H₂O₂ behandelt. Die Fociwerte der zugehörigen unbestrahlten Kontrollen (ca. 0,1 Foci pro Zelle, siehe Abb. 4.33) wurden abgezogen. Die Kontrollwerte nach 24 h waren mit denen nach 15 min vergleichbar. Für die Fehlerbalken wurde der Standardfehler über drei Experimente berechnet.

Zusammengefasst konnte beobachtet werden, dass in unbehandelten und Mock-behandelten primären konfluenten WT-Fibroblasten 24 h nach Bestrahlung mit einer niedrigen Röntgendosis weiterhin ein residuales Focilevel von ca. 0,06 bis 0,07 existierte. Eine vorherige H₂O₂-Behandlung dieser Zellen und die damit einhergehende Erhöhung des oxidativen Stresses in der Zelle hatte eine vollständige Reparatur der induzierten Focianzahl innerhalb von 24 h zur Folge.

5 Diskussion

5.1 Nachweis von DSBs in murinen Lymphozyten

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) sind die schwerwiegendsten Läsionen, die nach IR auftreten können. Seit wenigen Jahren werden DSB-Marker wie z. B. γ H2AX in der IFM für den Nachweis von DSBs in Form von Foci herangezogen (Rogakou et al. 1998, Bekker-Jensen et al. 2006). Durch die hohe Sensitivität dieser Methode ist es möglich, die Entstehung und Reparatur von DSBs auch nach radiologischen Untersuchungen zu messen (Lobrich et al. 2005, Geisel et al. 2008). In der Studie von Lobrich et al. (2005) wurden Röntgendosen von weniger als 20 mGy angewandt und damit erstmalig direkt nach der radiologischen Untersuchung *in vivo* der entstandene initiale DNA-Schaden in Form von einzelnen DSBs und die Reparatur dieser gemessen. Begrenzt wird die Anwendung der Methode beim Menschen jedoch dadurch, dass durch die vorwiegend angewandte Teilkörperbestrahlung bei der Messung von Lymphozyten Verdünnungseffekte auftreten, wodurch das Ergebnis unterschätzt wird. Außerdem besteht das Problem, dass sich Patienten in ihrem genetischen Hintergrund unterscheiden, was einen Einfluss auf die gemessenen Effekte haben kann.

Vor der Anwendung der Methode in klinischen Fragestellungen wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit zunächst das IF-Verfahren vor einem definierten genetischen Hintergrund validiert. Hierfür wurde ein Mausmodell entwickelt, welches zum einen den Vorteil hat, dass eine Ganzkörperbestrahlung durchgeführt werden kann, und zum anderen, dass verschiedene Mausmutanten mit definierten genetischen Defekten in DSB-Reparaturproteinen zur Verfügung stehen. Die Etablierung der IFM in murinen Lymphozyten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums in Homburg/Saar unter der Leitung von Prof. Dr. Christian Rube. Dabei wurden neben reparaturprofizienten C57BL/6-Mäusen (Wildtyp (WT)-Mäuse) auch Mäuse mit einer verminderten Expression der DNA-PK_{CS} (BALB/c), Mäuse mit einem Defekt im ATM-Protein (A-T) und solche mit einem Defekt in der DNA-PK_{CS} (SCID) verwendet. Nach erfolgreicher Etablierung des Verfahrens waren Foci sichtbar, welche sich in ihrer Morphologie nur dahingehend von denen in humanen Lymphozyten unterschieden, dass sie geringfügig feiner waren.

Bei der Quantifizierung dieser Foci in nicht-bestrahlten murinen Lymphozyten fiel zunächst auf, dass die gemessenen Werte etwa zehnmal höher lagen als in humanen Lymphozyten. Ein Grund für die höheren Kontrollwerte könnte in einem erhöhten oxidativen Metabolismus in murinen Lymphozyten liegen, welcher eine erhöhte Radikalkonzentration und damit mehr DNA-Schäden, z. B. in Form von DSBs zur Folge hätte. Generell zeichnen sich jedoch eher Zellen wie z. B. Herzmuskelzellen, welche aufgrund ihres großen Energiebedarfs viele Mitochondrien besitzen, durch einen erhöhten oxidativen Stoffwechsel aus. Interessanterweise liegen die

Kontrollwerte in murinen Zellen verschiedener Organe im Wesentlichen auf dem Niveau von humanen Zellen. Von allen Kontrollwerten in murinen Lymphozyten hatten WT-Mäuse den niedrigsten und SCID- sowie BALB/c-Mäuse die höchsten Werte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sowohl SCID- als auch BALB/c-Mäuse einen Defekt der DNA-PK_{CS} aufweisen (wobei sich dieser bei BALB/c-Mäusen nur in einer geringeren Expression der DNA-PK_{CS} äußert), welche eine wichtige Rolle bei der DSB-Reparatur spielt. Dies deutet darauf hin, dass durch endogene Prozesse entstehende spontane DSBs in DNA-PK_{CS}-defizienten Mäusen nicht so effektiv repariert werden wie in WT-Mäusen, sodass sie eine erhöhte spontane Rate an DSBs aufweisen.

Nach Bestrahlung mit 2 Gy wiesen die Lymphozyten von WT-, BALB/c- und SCID-Mäusen initial mit jeweils ca. 23 Foci pro Zelle die gleiche Anzahl an Foci auf. Dies war zu erwarten, da alle Mausstämme die gleiche Menge an DNA pro Zellkern aufweisen und somit in jeder Zelle gleich viele DSBs induziert werden. Für A-T-Mäuse wurde die Induktion erst nach 0,5 h gemessen, da in diesen Mausstamm die γ H2AX-Phosphorylierung über DNA-PK abläuft, was mit langsamerer Kinetik geschieht als über ATM (Stiff et al. 2004). Pro Gy wurden in Mauslymphozyten ca. 11,5 Foci pro Zelle induziert. Der Induktionswert in humanen Lymphozyten betrug dagegen pro Gy ca. 18 Foci pro Zelle. Da die Dosis definiert ist als deponierte Energie pro Masse, steigt die Anzahl an Ionisationen und damit die induzierten DSBs proportional mit dem DNA-Gehalt der Zelle an. Das menschliche Genom ist mit 3,2 Gbp ca. 22% größer als das Mausgenom (Lander et al. 2001, Waterston et al. 2002). Die Diskrepanz von rund 36% in der DSB-Induktion kann somit nur teilweise auf die unterschiedliche Genomgröße zurückgeführt werden. Eine weitere Ursache für den Unterschied in der Induktion könnte darin liegen, dass γ H2AX-Foci in Mauslymphozyten kleiner sind als in humanen, sodass ein Teil der Foci bei der Auswertung eventuell nicht als solche erkannt wurden.

Die Reparaturkinetik der WT-Mäuse gliederte sich in eine schnelle Komponente, in der die Focianzahl bis 5 h um 80% abnahm, und in eine langsame, in welcher am Ende nach 48 h über 95% der Brüche repariert waren. Dass DSB-Reparaturkinetiken ein biphasisches Verhalten zeigen, wurde bereits früh z. B. mittels PFGE in CHO-Zellen, welche sich in der G1-Phase des Zellzyklus befanden, gemessen. Hierbei entsprach die Reparaturzeit nach Bestrahlung der Zellen mit 50 Gy in der schnellen Reparaturphase 12,5 min und in der langsamen Reparaturphase 87 min (Iliakis 1991). Dass dieses biphasische Verhalten der Reparaturkinetiken in der vorliegenden Arbeit in WT-Mäusen sowohl in Lymphozyten als auch in verschiedenen Geweben beobachtet werden konnte, deutet ebenfalls darauf hin, dass die ausgewerteten Foci DSBs repräsentieren und daher zur Untersuchung der DSB-Reparatur herangezogen werden können.

Lymphozyten DNA-PK_{CS}-defizienter SCID-Mäuse wiesen sowohl in der schnellen als auch in der langsamen Reparaturphase höhere Fociwerte auf als die Lymphozyten der anderen Maus-

stämme, sie zeigten aber dennoch Reparatur. Dies deutet darauf hin, dass trotz vollständigen Defektes der DNA-PK_{CS} ein Teil der Brüche repariert werden kann, vermutlich weil die DNA-PK_{CS} für die Ligation der Brüche zwar wichtig, aber nicht absolut essentiell ist. Dies zeigten bereits Reparaturstudien in DNA-PK_{CS}-defizienten murinen Fibroblasten. Diese wiesen 24 h nach Röntgenbestrahlung eine Reparatur von 50% aller induzierten Brüche auf was konsistent mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist (Riballo et al. 2004). 48 h nach IR verblieben in Lymphozyten von SCID-Mäusen noch 30% an unreparierten Brüchen. Eine Studie, in welcher DSB-Reparaturkinetiken in Nierenzellen verschiedener Mausstämmen mittels PFGE gemessen wurden, untersuchte ebenfalls das Reparaturverhalten von SCID-Mäusen mit einem Defekt in der Expression der DNA-PK_{CS} (Okayasu et al. 2000). Hierbei wiesen die Zellen bereits zu frühen Zeiten nach Bestrahlung mit 50 Gy γ -Strahlung einen markanten DSB-Reparaturdefekt auf. Nach 2 h verblieben bei den SCID-Mäusen noch 55% der induzierten Brüche unrepariert, während dies bei WT-Mäusen nur auf 15% der Brüche zutraf. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den Reparaturkinetiken der vorliegenden Arbeit und sind konsistent damit, dass die katalytische Untereinheit der DNA-PK bei der DSB-Reparatur eine wichtige Rolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit glich die Reparaturkinetik der untersuchten BALB/c-Mäuse in der schnellen Reparaturphase (bis 2,5 h) der Kinetik der WT-Mäuse. Nach 5 h und 24 h wiesen BALB/c-Mäuse jedoch eine geringfügig erhöhte DSB-Anzahl gegenüber den WT-Mäusen auf. Diese Diskrepanz verschwand nach 48 h wieder. In der Studie von Okayasu et al. (2000) wurden neben Zellen von SCID-Mäusen auch solche von BALB/c-Mäusen hinsichtlich ihrer Reparaturfähigkeit nach Bestrahlung untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass dieser Mausstamm nach Abschluss der schnellen Reparaturphase 75% der Brüche und damit deutlich mehr als SCID-Mäuse, aber weniger als WT-Mäuse repariert hatte. Somit beschrieben auch Okayasu et al. (2000) die eingeschränkte Reparaturfähigkeit von BALB/c-Mäusen. Da die Studie die Reparatur jedoch nur bis 5 h nach IR verfolgte, wurde keine Aussage über spätere Zeitpunkte getroffen.

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete leichte Reparaturdefekt von BALB/c-Mäusen lässt sich auf deren verminderte DNA-PK_{CS}-Expression zurückführen. Da die DNA-PK_{CS} selbst aber funktionstüchtig ist, sind diese Mäuse im Gegensatz zu SCID-Mäusen in der Lage die durch 2 Gy induzierten DSBs innerhalb von 48 h vollständig zu reparieren. Die hohe Restaktivität der DNA-PK_{CS} bei BALB/c-Mäusen zeigte sich auch dadurch, dass diese Mäuse die während der V(D)J-Rekombination induzierten DSBs reparieren können und somit - im Gegensatz zu SCID-Mäusen - keinen Immundefekt aufweisen. Eine andere Studie, die ausschließlich das Überlebensverhalten von Knochenmarkszellen von BALB/c-Mäusen nach verschiedenen Dosen an γ -Bestrahlung untersuchte, konnte sogar ein besseres Überlebensverhalten für diesen Mausstamm nachweisen als für WT-Mäuse (C57BL/6-Mäuse). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Zellen drei Tage nach Bestrahlung für das Überlebensexperiment ausplattiert wurden, also zu einem Zeitpunkt, ab dem in der vorliegenden Arbeit der leichte Reparaturdefekt von

BALB/c-Mäusen nicht mehr zu detektieren war. Warum diese Mäuse sogar ein besseres Überleben zeigten als WT-Mäuse, kann nicht erklärt werden (Biedermann et al. 1991).

Somit konnten Beobachtungen der letzten Jahre bestätigt werden, die vermuten lassen, dass BALB/c-Mäuse eine leichte Einschränkung in der DSB-Reparatur aufweisen. Das Reparaturverhalten der Mäuse steht dabei im Einklang mit Beobachtungen bezüglich deren Strahlenempfindlichkeit. Im Vergleich zu WT-Mäusen zeigten Zellen von BALB/c-Mäusen nach IR eine erhöhte Apoptoserate (Mori et al. 1992). Sie haben weiterhin eine stärkere Neigung zur Entwicklung einer Reihe von unterschiedlichen spontanen sowie strahleninduzierten soliden Tumoren und Lymphomen als WT-Mäuse (Storer et al. 1988, Okumoto et al. 1989, Okumoto et al. 1995).

Der DSB-Reparaturverlauf in Lymphozyten von A-T-Mäusen war dem von C57BL/6-Mäusen bis 2,5 h sehr ähnlich. 5 h nach Bestrahlung wiesen A-T-Mäuse mit ca. 50% mehr an unreparierten Brüchen jedoch eine schlechtere Reparatur auf als WT- und BALB/c-Mäuse. Nach 48 h waren noch 15% der induzierten Brüche vorhanden. Aus *in vitro*-Studien mit humanen und murinen Fibroblasten ist bekannt, dass A-T-Zellen einen Defekt in der langsamen Komponente der DSB-Reparatur aufweisen (Blocher et al. 1991, Kuhne et al. 2004). Hierbei verblieben 15 bis 20% der induzierten DSBs nach ähnlich langen Reparaturzeiten unrepariert. ATM wird durch das Auftreten eines DSBs aktiviert und akkumuliert am Bruchort (Bakkenist & Kastan 2003). G1-Zellen mit einem Defekt in Artemis zeigten nach Bestrahlung einen identischen Reparaturverlauf wie A-T-Zellen. Außerdem wiesen sie nach langen Reparaturzeiten ebenfalls etwa 10% an unreparierten Brüchen auf. Hierbei erwiesen sich ATM und Artemis in G1-Zellen als epistatisch zueinander, sie wirkten also im gleichen Reparaturweg. Es wurde deshalb angenommen, dass ATM und Artemis für die Prozessierung von komplexen Brüchen in der G1-Phase verantwortlich sind, welche anteilmäßig etwa 10 bis 15% der Gesamtbrüche nach IR ausmachen (Lobrich & Jeggo 2005). Dies spiegelt die langsame Komponente in der Reparaturkinetik wider.

Neuere Studien gehen davon aus, dass ATM speziell für die im Heterochromatin lokalisierten DSBs benötigt wird. Es konnte gezeigt werden, dass nach Auftreten von DSBs in diesen Regionen ATM das ursprünglich als transkriptioneller Korepressor beschriebene KAP-1 (*Krüppel-associated box (KRAB)-associated Protein*) inaktiviert. Dieses kann diesem Modell zufolge daraufhin nicht mehr mit weiteren für die Bildung von Heterochromatin benötigten Proteinen wie HP1 oder HDAC1/2 interagieren, was zu einer Relaxierung des Chromatins führt (Craig 2005, Ziv et al. 2006). Dadurch werden diese Genomregionen für die Reparaturfaktoren des NHEJs zugänglich. Erst kürzlich konnte u. a. in murinen Zellen nachgewiesen werden, dass die in A-T-Zellen unrepariert verbleibenden DSBs in der Tat mit heterochromatischen Regionen assoziiert sind (Goodarzi et al. 2008). Dies wäre konsistent der Theorie, dass die Öffnung des Chromatins Zeit in Anspruch nimmt und A-T-Zellen deshalb einen Defekt in der langsamen Reparaturkomponente zeigen.

Zusammenfassend konnte durch Etablierung der IFM in murinen Lymphozyten erstmalig ein zuverlässiges Verfahren entwickelt werden, um durch definierte Mutationen hervorgerufene DSB-Reparaturdefekte nach *in vivo*-Bestrahlung von Mäusen zu messen. Die unterschiedliche Ausprägung der Strahlensensitivität verschiedener Mausstämme spiegelte sich hierbei in Form eines unterschiedlichen Reparaturverhaltens der Mäuse nach Bestrahlung wider. Während SCID-Mäuse den größten Reparaturdefekt zeigten, und dieser sowohl in der schnellen als auch in der langsamen Reparaturphase größer war als derjenige der anderen Mausstämme, konnte bei A-T-Mäusen erst in der langsamen Phase der DSB-Reparatur ein Reparaturdefekt detektiert werden. Hierbei erwies sich die IFM als ausreichend sensitiv, um selbst einzelne DSBs messen zu können, sodass auch der leichte Reparaturdefekt der BALB/c-Mäuse nach mittleren Reparaturzeitpunkten nachweisbar war. Somit konnte das IF-Verfahren vor einem definierten genetischen Hintergrund validiert und für klinische Fragestellungen herangezogen werden.

5.2 Untersuchungen zur Auswirkung von KM auf die Entstehung von DSBs nach IR

Die erfolgreiche Etablierung der IFM in murinen Lymphozyten ermöglichte nun deren Einsatz bei der Beantwortung klinischer Fragestellungen. Diagnostische Röntgenuntersuchungen stellen die größte vom Menschen geschaffene Quelle für Strahlung und damit einhergehenden DNA-Schäden im Alltag dar. Daher ist es vor allem für den Strahlenschutz von besonderem Interesse, mögliche gesundheitliche Folgen wie Krebs so genau es geht abzuschätzen. Bei radiologischen Untersuchungen wie z. B. der Computertomographie (CT) wird deshalb angestrebt, die Strahlenbelastung möglichst gering zu halten. Gleichzeitig werden jedoch gerade bei CT-Untersuchungen vor der Bestrahlung häufig Kontrastmittel (KM) injiziert, welche durch eine erhöhte Strahlenabsorption die Bildgebung unterstützen. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher untersucht, ob diese erhöhte Strahlenabsorption zu einer Erhöhung der Anzahl an DSBs führt.

5.2.1 *in vitro*-Untersuchung des KM-Effekts an humanen Lymphozyten nach Röntgen- und γ -Strahlung mittels γ H2AX-IFM

Obwohl bereits mehrere Jahrzehnte beobachtet wird, dass die Anwendung von KM nach Bestrahlung ein erhöhtes Vorkommen von DNA-Schäden zur Folge hat, ist die genaue Ursache hierfür bis heute unklar. Als eine mögliche Ursache werden bisher ein gesteigerter Photoeffekt während der Bestrahlung in Betracht gezogen, der durch im KM enthaltenen Elemente mit hoher Ordnungszahl (Z) verursacht wird (Norman et al. 1978, Callisen et al. 1979, Hadnagy et al. 1982, Santos Mello et al. 1983). Als weitere mögliche Ursachen gelten zum einen eine potentielle Beeinträchtigung des Reparaturvermögens durch Spaltprodukte des KMs, die während

der Bestrahlung entstehen (Joubert et al. 2005), und zum anderen zytotoxische Effekte, die unbestrahltes KM verursacht (Parvez et al. 1987).

Zur Aufklärung dieses Sachverhalts wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst primäre humane Lymphozyten untersucht. Den Proben wurde jodhaltiges KM oder die Negativkontrolle Mannitol zugegeben. Mannitol ist eine Zuckerlösung mit ähnlichen viskosen und osmolaren Eigenschaften wie das KM, es enthält jedoch keine Elemente mit hohem Z. Die Zugabe beider Substanzen erfolgte entweder vor oder nach Bestrahlung. Die Zugabe von KM vor Bestrahlung mit 90 kV-Röntgenstrahlung und zwei unterschiedlichen Röntgendosen führte in der vorliegenden Arbeit jeweils zu einer 60%igen Erhöhung der Anzahl an γ H2AX-Foci. Dieses Ergebnis ist mit Experimenten früherer Arbeiten konsistent. Matsubara et. al (1982) z. B. untersuchten den Effekt von KM u. a. auf die Entstehung von Chromosomenaberrationen *in vitro* in Lymphozyten. Hierbei führte eine Bestrahlung mit 21,5 R (Einheit: *Röntgen*) (= 185 mGy) Röntgenstrahlung in Anwesenheit von jodhaltigem KM zu einer Erhöhung der Anzahl an Chromosomentyp-Aberrationen wie Dizentrischen- und Ringchromosomen sowie Chromatidtyp-Aberrationen wie Chromatidbrüchen und achromatischen Stellen. Deren Anzahl stieg mit steigender KM-Konzentration weiter an, wobei der Anstieg erst ab einer Konzentration von 18% KM im Medium signifikant war. Der Anstieg von chromosomalen Aberrationen bei Bestrahlung in Anwesenheit von KM konnte auch in der Arbeit von Hadnagy et. al (1982) nach Anwendung von jodhaltigem KM bei Lymphozyten beobachtet werden.

Die Erklärung für das vermehrte Auftreten von DSBs durch die Anwesenheit von KM während der Bestrahlung könnte auf die im KM enthaltenen Jodatome zurückzuführen sein. Beim Durchtritt der Röntgenphotonen durch die Probe werden diese exponentiell mit der zurückgelegten Strecke durch Absorption geschwächt. Bei den nachfolgenden Absorptionsprozessen entstehen bei den betrachteten Energien sowohl Photo- als auch Comptonelektronen. Wie hoch der jeweilige Anteil ist, hängt von der Energie der Strahlung ab. Bei Röntgenenergien, wie sie im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden (maximale Photonenenergie = 90 keV, Intensitätsmaximum = 60 keV), beträgt der Anteil an Photoelektronen ca. 50% (Glocker & Macherauch 1971). Weiterhin ist die Absorption der Strahlung direkt proportional zur Ordnungszahl der Elemente, welche die Strahlung absorbieren (www.rad.rwth-aachen.de/lernprogramm/grd.htm). Hierbei ist die Abhängigkeit der durch den Photoeffekt deponierten Energie von Z sehr hoch ($\sim Z^4$), während die des Comptoneffektes nur einfach ist ($\sim Z$) (Kiefer & Kiefer 2003).

Die Zugabe von KM zu den Blutproben führte demzufolge zu einer Erhöhung der mittleren Ordnungszahl im Zellmedium und damit zu einer erhöhten Absorption von Strahlung. Es entstanden folglich durch den Photoeffekt vermehrt Photoelektronen. Diese legten auf ihrem Weg durch das Medium in die Zelle bis in den Zellkern eine gewisse Strecke zurück und lösten auf ihrem Weg weitere Ionisationen aus. Die Hauptreaktion ist hierbei die Entstehung von OH-Ra-

dikalen durch die Radiolyse von Wasser. Diese Radikale waren dann in der Lage, bei genügend kleinem Abstand zur DNA diese zu schädigen und DSBs zu erzeugen. Die zurückgelegte Strecke der Sekundärelektronen variiert allgemein von 2 μm bei Elektronen mit einer Energie von 10 keV bis hin zu 100 μm bei 100 keV-Elektronen (Meesungnoen et al. 2002). Diese Unabhängigkeit des KM-Effektes von der Röntgendosis war zu erwarten, da die vermehrte Entstehung von Photoelektronen durch Elemente mit hohem Z lediglich von der Energie der eingesetzten Strahlung und der damit einhergehenden Absorptionseffekte abhängt und nicht von der Menge an absorbiertener Strahlenenergie pro Masse des Absorbers (= Energiedosis).

Nachdem es durch die Zugabe von KM vor Bestrahlung zu einer initialen Erhöhung an DSBs kam, wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung des KMs auf die DSB-Reparatur untersucht. Eine Zugabe von KM nach Bestrahlung beeinträchtigte die Reparatur nicht. Dagegen wiesen Proben, denen KM vor Bestrahlung zugegeben wurde, ein schlechteres Reparaturverhalten auf als die restlichen Proben. Dies war für 10 mGy mit 18% ausgeprägter als für 500 mGy mit 8%. Dafür gibt es keine fundierte Erklärung. Man könnte mutmaßen, dass durch eine eventuelle lokale Anhäufung des KMs (z. B. durch eine ungleichmäßige Verteilung des KMs im Blut) Photoelektronen in der Nähe der DNA mehrere Ionisationen in nächster Nachbarschaft auslösten und dadurch mehrere DSBs auf engem Raum entstanden. Dies könnte die Reparatur erschwert haben. Warum dies jedoch für Proben, die mit 10 mGy bestrahlt wurde, ausgeprägter war, als für Proben, welche mit 500 mGy bestrahlt wurden, kann nicht sicher begründet werden. Es könnte jedoch mit einem schlechteren Reparaturverhalten nach niedrigen Dosen in Verbindung stehen.

Nachdem eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlung im Beisein von KM zu einer initialen Erhöhung der Anzahl an DSBs geführt hatte, wurde der gleiche Versuchsansatz mit den Lymphozyten derselben Spender nach ^{137}Cs - γ -Bestrahlung durchgeführt. 5 min nach γ -Bestrahlung mit 500 mGy wiesen Proben mit und solche ohne KM die gleiche initiale Anzahl an DSBs auf. Das KM hatte somit keinen Effekt auf die Entstehung von DSBs. Dies lässt sich damit erklären, dass bei Photonenenergien von 660 keV die Photoelektronen einen Anteil von nur ca. 0,1% an der insgesamt auftretenden Elektronenenergie repräsentieren. Der weit überwiegende Anteil der durch die Absorption auftretenden Elektronen sind dementsprechend Comptonelektronen (99,9%) (Glocker & Macherauch 1971). Da die Abhängigkeit der durch den Comptoneffekt deponierten Energie nur einfach proportional zu Z ist ($\sim Z$) (Kiefer & Kiefer 2003), wurden bei der Bestrahlung keine zusätzlichen Sekundärelektronen und damit auch keine zusätzlichen DSBs erzeugt. Damit unterstützen diese Daten die physikalische Erklärung, dass es im Beisein von KM durch eine Verstärkung des Photoeffektes bei niedrigeren Photonenenergien zu einer initialen Erhöhung an DSBs kommt. Die Ergebnisse mit ^{137}Cs - γ -Bestrahlung decken sich mit früheren KM-Studien. Matsubara et. al (1982) beobachteten nach Bestrahlung von Lymphozyten mit ^{60}Co - γ -Strahlung bei gleichzeitiger Inkubation mit 30% KM (Megluminotalamat), dass die Anzahl an Chromoso-

mentyp-Aberrationen wie Dizentrische und Ringchromosomen nicht verändert wurde. Auch Matsudaira et al (1980) konnten bei der Auswertung von Mikrokernen nach Bestrahlung einer murinen T-Lymphomzelllinie im Gegensatz zu Röntgenstrahlung keinen KM-Effekt nach γ -Strahlung beobachten. Sie begründeten dies ebenfalls mit einer fehlenden Erhöhung der Anzahl an Photoelektronen nach γ -Strahlung.

In der vorliegenden Arbeit war auffällig, dass nach ^{137}Cs - γ -Bestrahlung initial etwa 15% weniger Foci gemessen wurden als mit derselben Dosis an Röntgenstrahlung. Dies könnte darin begründet sein, dass ein Teil der γH2AX -Foci zu schwach gefärbt war und deshalb nicht in die Auswertung miteinbezogen wurde. Dies kann insbesondere nach einer Induktionszeit von 5 min möglich sein, wenn sich die Helligkeit der Foci noch nicht voll ausgeprägt hat. Diese Beobachtung ist konsistent mit einer weiteren Studie, in der etwas Ähnliches beobachtet wurde (mündliche Mitteilung Dr. Peter Kegel). Auch zeigten die Lymphozyten nach ^{137}Cs - γ -Strahlung ein geringfügig schlechteres Reparaturvermögen als nach Röntgenstrahlung. In früheren Studien mit WT-Zelllinien und verschiedenen Strahlenarten (u. a. 120 kV-Röntgen- und 660 kV- ^{137}Cs - γ -Strahlung) wurde gezeigt, dass sich die DSB-Reparaturkinetiken von Zellen nach diesen beiden Strahlenarten nicht unterscheiden. Daher wurde vermutet, dass keine Unterschiede in der Komplexität der Brüche bestehen, die das Reparaturverhalten beeinflussen können (Kegel et al. 2007). Ein Grund für die schlechtere Reparatur nach ^{137}Cs - γ -Strahlung in der vorliegenden Arbeit kann darin liegen, dass die dadurch induzierten Foci generell feiner in der Optik sind als die durch Röntgenstrahlung induzierten, sodass vereinzelt auch Punkte in die Auswertung mit einbezogen wurden, die keine strahleninduzierten Foci waren. Gestützt wird dies neben eigenen Beobachtungen durch eine Studie, in welcher beschrieben wurde, dass die Größe der gemessenen γH2AX -Foci nach niederenergetischer Al_K -Röntgenstrahlung (1,49 keV) größer waren als nach höherenergetischer Vergleichsstrahlung (240 keV) (Hamada et al. 2006).

5.2.2 *In vitro*-Untersuchung des KM-Effekts an humanen Fibroblasten mittels γH2AX - und 53BP1-IFM und alternativen Nachweismethoden

Um den in Lymphozyten gemessenen KM-Effekt mit einem anderen Zelltyp und anderen Methoden zu validieren, wurden zusätzliche *in vitro*-Experimente mit KM an humanen WT-Fibroblasten durchgeführt. Dies wurden außer mit IFM auch mit Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und *premature chromosome condensation* (PCC) durchgeführt. Hierbei konnten mit allen Methoden die Ergebnisse aus den Lymphozytenexperimenten bestätigt werden, d. h. es wurde eine Erhöhung der initialen Anzahl an DSBs in Anwesenheit von KM beobachtet. Dieser Effekt war in den IFM-Experimenten mit Lymphozyten und in den PFGE-Experimenten stärker ausgeprägt als in den IFM-Experimenten mit Fibroblasten und den PCC-Experimenten. Dieser Unterschied zwischen den verschiedenen Methoden könnte im unterschiedlichen Versuchsaufbau begründet sein. Bei den IFM-Experimenten mit Fibroblasten und den PCC-Experimenten

waren die Zellen adhärent wachsend von dem KM-haltigen Zellkulturmedium bedeckt. Somit konnten die entstehenden Photoelektronen nur von einer Seite in die Zellen gelangen. In den IFM-Experimenten mit Lymphozyten und den PFGE-Experimenten wurden die Zellen vor der Behandlung und der Bestrahlung abtrypsiniert, sodass sie in Zellkulturmedium schwammen. Dadurch waren die Zellen von KM umgeben, was den Effekt vergrößert haben könnte.

Nachdem es durch die Zugabe von KM vor Bestrahlung zu einer initialen Erhöhung der DSB-Anzahl gekommen war, wurde auch in humanen primären Fibroblasten die Auswirkung des KMs auf die DSB-Reparatur untersucht. Die Quantifizierung sowohl von γ H2AX- als auch von 53BP1-Foci ließ diesmal keinen Unterschied in der DSB-Reparatur zwischen Proben mit KM-Gabe vor der Bestrahlung und den restlichen Proben erkennen, so wie es bei den Lymphozytenexperimenten der Fall gewesen war. Hierfür gibt es keine fundierte Erklärung. Weiterhin war kein Unterschied in der Focianzahl zwischen unbehandelten Proben und Proben, denen KM nach Bestrahlung zugegeben wurde, erkennbar. Dies ist konsistent zu den Lymphozytendaten und auch hier damit zu erklären, dass ohne Bestrahlung keine Ionisationen der Jodatome stattfanden und somit auch keine zusätzlichen Photoelektronen entstehen konnten, welche die DNA schädigten. Auch wurde nach Behandlung mit KM kein erhöhtes Vorkommen von apoptotischen Zellen beobachtet, sodass nicht von einem toxischen Effekt des KMs auszugehen ist. Dies ist konsistent mit Hadnagy et. al (1982), die ebenfalls keine schädigende Wirkung des KMs ohne Bestrahlung feststellen konnten. Bei Matsubara et. al (1982) führte eine Bestrahlung von proliferierenden Zellen ohne KM mit anschließender 72stündiger Inkubation der Zellen in Medium, welches bis zu 4% KM enthielt, zwar nicht zu einem Anstieg an Chromosomentyp-Aberrationen, jedoch zu einem signifikanten Anstieg an Chromatidbrüchen und achromatischen Stellen. Da auch die Anzahl an Schwesterchromatid-Austauschen (*sister chromatid exchanges* = SCEs) durch Inkubation der Zellen mit KM signifikant anstieg, schlussfolgerten Matsubara et. al (1982) daraus, dass der Wirkstoff des KMs (Megluminotalamat) eine mutagene Wirkung auf die Zellen haben könnte. Auch schlossen sie eine mögliche Interaktion des KMs mit dem ebenfalls zugegebenen Colcemid nicht aus. In der vorliegenden Arbeit wurde die Reparatur in Anwesenheit von KM lediglich mittels IFM untersucht. Da diese Experimente in nicht-proliferierenden Zellen durchgeführt und auch keine weiteren Chemikalien zugegeben wurden, lassen sich keine Aussagen über eine mutagene Wirkung von KM auf wachsende Zellen, nach längeren Zeiten oder potentielle Wechselwirkungen mit anderen Substanzen treffen.

In einer anderen Arbeit wurde beobachtet, dass eine Bestrahlung von BAEC (*bovine aortic endothelial cells*) im Beisein von jodhaltigem KM (Iomeprol) nicht zu einer Erhöhung des Induktionswertes an γ H2AX-Foci führte (Joubert et al. 2005). Dabei wurde eine Jodkonzentration von 10 mg pro ml eingesetzt, was in etwa einem Drittel der in dieser Arbeit eingesetzten Konzentration (33 mg pro ml) entspricht. Außerdem erwähnten die Autoren nicht, ob die ausgewerteten Zellen exponentiell wachsend oder konfluent waren. Da in G2-Zellen aufgrund des

doppelten DNA-Gehaltes doppelt so viele DSBs induziert werden wie in G1-Zellen, kann eine Auswertung exponentiell wachsender Zellen ohne Berücksichtigung des Zellzyklusstadiums zu Schwankungen in den Ergebnissen führen. Darauf weisen auch die hohen Fehlerwerte nach kurzen Reparaturzeiten bei der erwähnten Studie hin. Weiterhin beobachteten Joubert et al. (2005) eine verminderte DSB-Reparatur von Zellen, die KM vor Bestrahlung erhielten. Dies war auch der Fall, wenn mit 5 Gy vorbestrahltes KM nach Bestrahlung der Zellen zugegeben wurde. Die Autoren erklärten dies damit, dass mit zunehmender Dosis vermehrt toxisch wirkende Jod-Ionen im KM entstehen, die mit Natrium- oder Kaliumionen in den Zellen reagieren und an die DNA binden. Dadurch könnten durch die Strahlung induzierte DSBs nicht mehr von DNA-PK repariert werden, sodass die Reparaturkapazität der Zellen beeinträchtigt ist.

Um die von Joubert et al. (2005) beobachteten Zusammenhänge in dieser Arbeit zu berücksichtigen, wurden in den Fibroblastenexperimenten der vorliegenden Arbeit auch Proben mitgeführt, denen nach Bestrahlung KM zugegeben wurde. Dieses war mit verschiedenen Röntgendosen vorbestrahlt worden. Die Dosen betragen hierbei 0,5 Gy, eine Dosis, bei der Joubert et al. (2005) noch keinen messbaren Anstieg an Jod-Ionen feststellen konnten, und 5 Gy, bei der sich die Entstehung von Jod-Ionen bei Joubert et al. (2005) merklich erhöht hatte. Es konnte in der vorliegenden Arbeit bis 5 h nach Bestrahlung kein Unterschied zwischen diesen Proben und solchen ohne KM-Zugabe festgestellt werden. Da Joubert et al. (2005) erst nach einer Reparaturzeit von 24 h signifikante Reparaturunterschiede maßen, sind die Daten der vorliegenden Arbeit damit konsistent. Sollten tatsächlich durch die Strahlung Jod-Ionen entstehen, welche die Reparatur der Zellen langfristig stören, so ist dieser Effekt erst nach längeren Reparaturzeiten als 5 h messbar.

Zusammengefasst konnte mittels unterschiedlicher Versuchsansätze und zweier unterschiedlicher humaner Zelltypen gezeigt werden, dass das Vorhandensein von KM während 90 kV-Röntgenbestrahlung dosisunabhängig zu einer Erhöhung der initialen DSB-Anzahl führt, welche auf einen gesteigerten Photoeffekt zurückzuführen ist. Eine Bestrahlung mit hochenergetischer ¹³⁷Cs- γ -Bestrahlung führte im Beisein von KM dagegen nicht zu einer Entstehung von zusätzlichen DSBs, da bei diesen Photonenenergien der Photoeffekt nur einen minimalen Anteil an den Absorptionseignissen hat. Ebenso hatte die Zugabe von nicht-bestrahltem oder bestrahltem KM nach Bestrahlung für die Dauer der Reparaturzeit keinen Effekt auf die DSB-Entstehung, sodass davon auszugehen ist, dass die verwendeten jodhaltigen KM als solche keine DNA-schädigende Wirkung haben.

5.3 *In vivo*-Untersuchung des KM-Effekts an humanen Lymphozyten

Nachdem *in vitro* eine Erhöhung der DSB-Induktion nach Bestrahlung nachgewiesen worden war, wurde dieser Effekt auch *in vivo* an CT-Patienten untersucht. Hierfür wurde die Anzahl an

DSBs mit Hilfe des γ H2AX-IF-Verfahrens in Lymphozyten der CT-Patienten nach der CT-Untersuchung bestimmt. Parallel dazu wurden von jedem Patienten Proben mitgeführt, welche *in vitro* mit definierten Dosen an Röntgenstrahlung bestrahlt wurden. Dies sollte dazu dienen, das *in vivo* erhaltene Ergebnis biodosimetrisch einordnen zu können. Als Induktionszeitpunkt wurde 0,5 h nach der CT-Untersuchung gewählt. Hierbei muss deutlich gemacht werden, dass CT-Patienten in den meisten Fällen eine Teilkörperbestrahlung erhalten, d. h. es wird lediglich ein Teil der Lymphozyten bestrahlt. Nach der Untersuchung vermischen sich diese bestrahlten Lymphozyten mit nicht-bestrahlten, sodass ein „Verdünnungseffekt“ auftritt, welcher letztendlich zu einer Unterschätzung der tatsächlich applizierten Dosis führt. Bei der Messung des Induktionswertes *in vivo* wurde bereits in der Vorgängerstudie festgestellt, dass die Anzahl an DSBs 0,5 h nach einer Thorax-CT-Untersuchung das Maximum erreicht und anschließend wieder abfällt (Lobrich et al. 2005). Eine andere Studie führte ebenfalls *in vivo*-Messungen an CT-Patienten durch, erhielt jedoch das höchste Schadensniveau bereits 5 min nach der Bestrahlung, was den Beobachtungen von Lobrich et al. (2005) entgegen steht (Rothkamm et al. 2007). Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass bei der Mehrzahl an von Rothkamm et al. (2007) untersuchten Patienten die Bestrahlung während der CT-Untersuchung nicht nur den Thorax, sondern auch das Abdomen und die Hüfte umfasste, sodass eine größere Blutmenge bestrahlt wurde als bei den Patienten der vorliegenden Arbeit. Da das Herz pro Minute etwa 5 Liter Blut durch den Körper pumpt, kann angenommen werden, dass der Anteil bestrahlter Blutzellen in Patienten, welche eine größere Körperoberfläche bestrahlt bekamen, höher ist als der Teil der nicht-bestrahlten Zellen. Vermutlich führte eine schnelle Durchmischung der beiden Blutzellpopulationen schließlich dazu, dass der Maximalwert an γ H2AX-Foci bei Rothkamm et al. (2007) bereits nach 5 min gemessen wurde. Dies ist konsistent mit Beobachtungen aus der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit verfasst wurde. Diese beinhalteten, dass nach einem CT, bei welchem größere Körperareale bestrahlt wurden, die maximale Focianzahl in peripheren Blutlymphozyten früher als nach 0,5 h erreicht. Des Weiteren wurde in der Arbeit von Rothkamm et al. (2007) die Induktion an γ H2AX-Foci eines CT-Patienten nach einem Thorax-CT untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fanden Rothkamm et al. auch da die maximale Anzahl an DSBs bereits 5 min nach Bestrahlung. Die Ursache für dieses abweichende Ergebnis ist unklar, da die Thorax-CT-Daten von Rothkamm et al. (2007) jedoch wie erwähnt nur von einem Patienten resultieren, stellt dies die Zuverlässigkeit der Daten in Frage.

Beim Vergleich der Fociwerte zwischen nativ bestrahlten CT-Patienten und solchen mit KM-Gabe vor CT fiel auf, dass der *in vitro*-beobachtete Effekt *in vivo* nicht vorhanden war. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu bisherigen Patientenstudien, die KM in der Untersuchung verwendeten. So zeigten die Ergebnisse mehrerer Patientenstudien, in denen die Patienten eine Angiographie oder eine Urographie unter Gabe von KM bekamen, dass nach der

Untersuchung die mittlere Anzahl an Mikrokernen in peripheren Lymphozyten im Mittel um 4,2 Mikrokern pro 1.000 binukleärer Zellen anstieg. Diese Anzahl entsprach einer *in vitro* applizierten Dosis von 40 mGy. Dies war für verschiedene KM der Fall (Norman et al. 2001). Eine andere Arbeitsgruppe konnte einen signifikanten Anstieg in der Anzahl an Chromosomenbrüchen und -austauschen bei Patienten mit CCT (craniales CT, CT des Schädels) beobachten, wenn diese vorher jodhaltiges KM erhielten (Mozdarani & Fadaei 1998). Neben dieser konnten auch weitere Gruppen einen Anstieg in der Anzahl an Chromosomenaberrationen beobachten. Sie entwickelten jedoch noch keine Theorien bezüglich der konkreten Wirkweise des KMs (Adams et al. 1978, Stephan & Hadnagy 1981, Shafer et al. 1987).

Der Standardfehler der *in vivo*-Proben der Patientengruppe I in der vorliegenden Arbeit verriet, dass die Werte zwischen den Patienten stark streuten. Dies ist auch aus den Einzelwerten ersichtlich, die in Abhängigkeit vom Dosis-Längen-Produkt (DLP) aufgetragen wurden. Das DLP misst die kumulative Dosis (totale Energie), der ein Patient ausgesetzt ist. Dies berücksichtigt nicht nur die mittlere Ortsdosis innerhalb des Untersuchungsvolumens (= CT-Dosisindex, $CTDI_{vol}$), sondern auch die Länge des abgescannten Körpers (in der Einheit des DLPs als cm angegeben), sodass berücksichtigt wird, dass die absorbierte Energie mit der Länge des abgescannten Körpers ansteigt. 0,5 h nach Bestrahlung konnte teilweise ein Unterschied in den Werten von einem Faktor 2 bis 3 ermittelt werden. In den Patientenstatistiken variierte das DLP zwischen den Patienten von 350 bis 547 mGy*cm (mit Ausnahme eines Patienten mit einem DLP von 931 mGy*cm). Die Varianz des DLPs zwischen den Patienten der Patientengruppe I war damit nicht sehr groß. Um die großen Unterschiede in der Focianzahl zwischen den Patienten zu erklären, muss man sich deshalb die Länge des abgescannten Körpers als auch den $CTDI_{vol}$ -Wert der Patienten betrachten. Da für die Focianalyse Lymphozyten herangezogen wurden, würde eine große Varianz in der abgescannten Körperlänge bewirken, dass ein größeres oder kleineres Blutvolumen bestrahlt wird und somit mehr Lymphozyten DSBs aufweisen. Da jedoch die mittlere $CTDI_{vol}$ für alle Patienten relativ gleich war und keine große Varianz in den $CTDI_{vol}$ -Werten vorhanden war (10,3 bis 13,8 mGy), muss auch die abgescannte Körperlänge für alle Patienten relativ gleich gewesen sein, da diese multipliziert mit dem $CTDI_{vol}$ das DLP ergibt. Eine weitere Ursache für Schwankungen in den Werten kann ganz allgemein ein unterschiedlich großes Blutvolumen im Untersuchungsbereich während der Bestrahlung sein, welches das Verdünnungsverhältnis zwischen bestrahlten und nicht-bestrahlten Lymphozyten beeinflusst hat. Weiterhin kann ein unterschiedlich starkes Reparaturvermögen innerhalb der ersten 0,5 h, in denen im Allgemeinen die meisten DSBs repariert werden, ebenfalls zu hohen Varianzen in den Fociwerten zwischen den Patienten geführt haben. Diese Erklärung ist am wahrscheinlichsten, da die Schwankungen zwischen den Patienten in den folgenden Reparaturzeitpunkten kleiner werden.

Beim Vergleich der *in vivo*- mit den *in vitro*-Daten der Patienten zeigte sich, dass *in vivo* 0,5 h nach der Bestrahlung die gemessene Anzahl an γ H2AX-Foci bei einem DLP von 500 mGy*cm der Focianzahl nach einer *in vitro*-Bestrahlung mit 10 mGy entsprach. Dies ist konsistent mit der Vorgängerstudie von Lobruch et al. (2005). In dieser Studie waren die *in vivo* nach der CT-Untersuchung erhaltenen γ H2AX-Werte jedoch nicht wie in der vorliegenden Arbeit mit persönlichen *in vitro*-Werten der Patienten verglichen worden, sondern mit *in vitro*-Daten von einer anderen Spendergruppe. Somit konnten in der vorliegenden Arbeit zum einen die Ergebnisse von Lobruch et al. (2005) mit individuellen *in vitro*-Daten derselben Patienten validiert werden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass mit der angewandten Methode und ähnlichen CT-Protokollen reproduzierbare Ergebnisse bezüglich der Strahlenbelastung ermittelt werden können. Auch Kufner et al. (2008) fanden bei der Messung der applizierten Dosis in Form von auftretenden DSBs mit dieser Methode eine gute Korrelation zwischen der Anzahl an gemessenen γ H2AX-Foci und dem Dosisflächenprodukt ($\text{mGy} \cdot \text{cm}^2 = \text{Dosis} \cdot \text{Dosisbelastung des Patienten}$), sodass diese Methode insgesamt eine sensitive Technik zur Messung der Änderung des Schadenslevels nach unterschiedlichen Bestrahlungsprotokollen darstellt.

Nach *in vitro*-Bestrahlung wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Patientengruppe I nach 10 mGy ca. doppelt so viele DSBs induziert wie nach 5 mGy. Extrapoliert man davon ausgehend linear zu den höheren Dosen hin, stellt man jedoch fest, dass die gemessenen Induktionen nach 100 mGy und 500 mGy um 27% (für 100 mGy) bis ca. 50% (für 500 mGy) von den theoretisch errechneten Werten nach unten abwichen, sie also nicht linear verliefen. Ein Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass innerhalb von 0,5 h *in vitro* generell etwa 50% der induzierten Brüche repariert werden. Es wäre also möglich, dass die Zellen nach hohen Dosen in dieser Zeit durch ihr gutes Reparaturverhalten, welches aus den anderen Reparaturzeitpunkten ersichtlich ist, anteilig mehr Brüche reparierten als nach niedrigen Dosen. Dies würde bedeuten, dass die Diskrepanz zwischen der errechneten und der tatsächlich gemessenen Induktion nach höheren Dosen größer und die tatsächliche Induktion damit unterschätzt wird.

Betrachtet man die *in vitro*-Reparaturverläufe nach verschiedenen Dosen, so erkennt man, dass nach einer Dosis von 500 mGy innerhalb von 5 h die meisten DSBs repariert wurden. Ähnlich sieht es nach Bestrahlung mit 100 mGy aus. Nach 5 und 10 mGy verlief die Reparatur dagegen unvollständig, sodass ein residuales Focilevel verblieb. Der *in vivo*-Reparaturverlauf ähnelt sehr stark den Reparaturverläufen nach 100 mGy und 500 mGy *in vitro*. Dieses gute Reparaturverhalten war nicht zu erwarten, da die Anzahl der *in vivo* gemessenen DSBs 0,5 h nach Bestrahlung der nach einer *in vitro* applizierten Dosis von 10 mGy entsprach. Diese Daten sind konsistent mit denen von Lobruch et al. (2005), welche in ihrer Patientenstudie ebenfalls beobachtet hatten, dass die Fociabnahme *in vivo* mit der nach höheren *in vitro* applizierten Dosen (100 und 500 mGy) vergleichbar war, während nach 5 und 10 mGy *in vitro* die Reparaturkapazität eingeschränkt war. Auch konnte *in vitro* nach einer Reparaturzeit von 5 h im Gegensatz zu den

in vivo-Daten konsistent mit der vorliegenden Arbeit ein residuales Focilevel nach 5 und 10 mGy gemessen werden. Diese Beobachtung ist ebenfalls konsistent mit *in vitro*-Daten von konfluenten WT-Fibroblasten, deren Reparaturkapazität mit sinkender applizierter Dosis schlechter wurde, und welche auch 14 Tage nach Bestrahlung ein residuales Focilevel aufwiesen. Dieses war unabhängig von der applizierten Dosis (Rothkamm & Lobrich 2003). Auch neuere Daten von Rothkamm et al. (2007) von *in vitro*-bestrahlten WT-Fibroblasten und PBMCs wiesen 20 h nach Bestrahlung mit 500 mGy auf eine unvollständige Reparatur in diesen Zellen hin.

Ein Grund für das bessere Reparaturverhalten *in vivo* könnte darin liegen, dass aufgrund der physiologischen Umstände optimalere Bedingungen bestanden als *in vitro* und die Lymphozyten damit effektiver reparieren konnten. Untersuchungen nach Ganzkörperbestrahlungen könnten darüber genaueren Aufschluss geben, da bei derartigen Bestrahlungen alle untersuchten Zellen die gleiche Dosis an Strahlung erhalten. Diese werden jedoch nur relativ selten durchgeführt, sodass sich Patientenstudien hierzu schlecht eignen. Ein weiterer Grund könnte sein, dass im Körper nach Bestrahlung geschädigte Blutzellen erkannt und abgebaut wurden, und diese dann für die Auswertung eventuell nicht mehr zur Verfügung standen. Weiterhin kann die bessere *in vivo*-Reparatur auf den schon erwähnten „Verdünnungseffekt“ der Lymphozyten zurückzuführen sein, durch welchen nicht nur die Induktion unterschätzt, sondern auch die Reparatur überschätzt wurde. Dies wäre dann der Fall wenn man theoretisch annähme, dass *in vivo* konsistent zu den *in vitro*-Daten nicht alle Brüche repariert würden, also auch da ein residuales Focilevel nach langen Reparaturzeiten verbliebe. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nach langen Reparaturzeiten fast keine Brüche mehr gemessen. Man muss dabei jedoch bedenken, dass sich die nach 5 h ausgewerteten Lymphozyten aus bestrahlten und nicht-bestrahlten Zellen zusammensetzen. Dadurch wird ein vorhandenes residuales Schadenslevel durch den Verdünnungseffekt kleiner, was wie eine bessere Reparatur aussieht.

Aufgrund der hohen interindividuellen Variation in den *in vivo*-Werten ist es denkbar, dass der KM-Effekt *in vivo* nicht zu sehen war. Daher wurden anschließend die *in vitro*-Werte der Patienten einer genaueren Betrachtung unterzogen. Da die Streuung der *in vivo*-Werte nach den kurzen Zeitpunkten (0,5 h und 1 h) am höchsten war, und zu diesen Zeitpunkten die Fociwerte *in vivo* am ehesten mit den 5 und 10 mGy *in vitro*-Daten vergleichbar waren, eigneten sich diese beiden Dosen und Zeitpunkte am besten für eine Analyse der DSB-Schadensantwort zwischen nativ bestrahlten Patienten und solchen mit KM-Gabe. Ein Vergleich zwischen den Gruppen *in vitro* ergab, dass die nativ bestrahlte Patientengruppe nach beiden Dosen eine im Schnitt um 20% verminderte Schadensantwort aufwies als Patienten mit KM-Gabe vor CT. Um diesen Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen in die Auswertung der *in vivo*-Daten mit einzubeziehen, wurde eine Normierung über die *in vitro*-Daten vorgenommen. Hierfür wurde über eine lineare Regression der *in vitro*-Daten (über den 5 und den 10 mGy-*in vitro*-Wert) nach Reparaturzeiten von 0,5 h und 1 h die Steigung für jeden einzelnen Patienten bestimmt. An-

schließlich wurden die *in vivo*-Daten jedes einzelnen Patienten durch die individuellen Steigungen dividiert. Der Quotient entsprach einer individuellen Äquivalentdosis für jeden Patienten, welche angab, mit welcher *in vitro*-Dosis die *in vivo* ermittelten γ H2AX-Fociwerte vergleichbar waren. Hierbei zeigte sich, dass die durch ein CT mit einem DLP von 500 mGy*cm entstehenden DSBs generell mit einer *in vitro*-Dosis von 8 bis 9 mGy vergleichbar waren. Ein CT mit vorheriger Gabe von jodhaltigem KM erhöhte dagegen die durchschnittlich absorbierte Dosis um ca. 30%, sodass das dadurch entstandene Schadenslevel mit einer *in vitro* applizierten Dosis von 11 bis 12 mGy vergleichbar war. Somit war durch Berücksichtigung der *in vitro*-Schadensantwort und Berechnung der Äquivalentdosis ein Effekt des KMs ersichtlich.

Da der KM-Effekt erst durch Normierung der *in vivo*- und *in vitro*-Daten gezeigt werden konnte, wurde er noch einmal in einer zweiten Patientenstudie *in vivo* an 10 CT-Patienten untersucht. In dieser Patientengruppe II wurden 5 Patienten nativ bestrahlt, weitere 5 erhielten vor der Bestrahlung KM mit dem Wirkstoff Iomeprol. Da Iomeprol bereits in den *in vitro*-Experimenten mit Fibroblasten einen ähnlich großen KM-Effekt hervorrief wie Iopromid, konnte dieses KM in die Studie miteinbezogen werden. Um interindividuelle Unterschiede im Reparaturverhalten möglichst klein zu halten, wurden die Vergleichsgruppen der Patientengruppe II diesmal so gewählt, dass sie die gleichen klinischen Indikationen und das gleiche durchschnittliche Alter hatten. Außerdem variierte das Alter innerhalb jeder Untergruppe nur um 13 Jahre. Weiterhin bekamen die Patienten im Gegensatz zu Patientengruppe I festgelegte Jodmengen verabreicht, die sich nach dem CT-Gerät richteten, an welchem sie untersucht wurden. Beim Vergleich der *in vivo*-Daten zwischen nativ bestrahlten und KM-Patienten zeigte sich diesmal auch ohne Normierung, dass eine KM-Gabe vor Bestrahlung zu einer Erhöhung der Schadensantwort (hier in Form von DSBs) um 33% führt. Damit wurden die Ergebnisse der Patientenstudie I bestätigt.

Verglichen mit den vorangegangenen *in vitro*-KM-Experimenten fiel die *in vivo* beobachtete Erhöhung der DSB-Anzahl durch den KM-Effekt mit durchschnittlich 30% etwas geringer aus. Dies kann seine Ursache darin haben, dass sich die in den KM-Experimenten eingesetzten Jodmengen an Konzentrationen orientierten, wie sie maximal in der Aorta beobachtet werden. Diese Werte wurden mittels Phantommessungen unter Standardbedingungen am CT ermittelt (mündliche Mitteilung Prof. Dr. Michael Uder, Radiologisches Institut des Universitätsklinikums in Erlangen). Die Jodkonzentration im Blut kann bei diesem Verfahren über Umrechnung der ermittelten HE (Hounsfield-Einheit)-Werte entsprechend der eingesetzten KM-Verdünnung errechnet werden (z. B. Verhältnis KM : Blut = 1 : 10). In den meisten CT-Untersuchungen werden jedoch niedrigere maximale Jodkonzentrationen in der Aorta erreicht, sodass davon auszugehen war, dass der KM-Effekt *in vivo* niedriger ausfällt als in den *in vitro*-Experimenten.

Eine weitere Ursache hierfür kann z. B. auch eine durch individuell unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten des Blutes verursachte unterschiedliche Verteilung des kontrastierten Blutes

bis zur Bestrahlung im Thorax sein. Weiterhin kann es durch minimale Verzögerungen zwischen KM-Gabe und Bestrahlung eventuell zu einem Absinken der KM-Konzentration im bestrahlten Bereich des Patienten kommen. Um die maximal mögliche KM-Konzentration im zu bestrahlenden Areal während der Bestrahlung zu erhalten, muss der Zeitpunkt der Bestrahlung zeitlich sehr eng mit der Injektion des KMs verknüpft sein, da die maximale Jodkonzentration nach Gabe des KM z. B. in der Aorta bereits nach 15 bis 22 s erreicht wird (Prokop & van der Molen 2003). Startet die CT-Untersuchung geringfügig später, sinkt die Jodkonzentration im bestrahlten Bereich ab, wodurch auch der KM-Effekt geringer ausfällt.

5.4 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Reparatur von DSBs

Nachdem die Ergebnisse der Patientengruppe I gezeigt hatten, dass es individuelle Unterschiede im Reparaturvermögen geben kann, wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit untersucht, ob einzelne Faktoren wie das Alter, die klinischen Indikationen oder das Geschlecht einen Einfluss auf die Reparaturkapazität haben. Die Patienten der Patientengruppe I wurden daher nach ihrem Alter, ihrer klinischen Indikation und ihrem Geschlecht aufgeteilt und die DSB-Schadensantwort sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht. Hierbei war die Tendenz erkennbar, dass Patienten über 60 Jahre sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bis 100 mGy gegenüber jüngeren Patienten eine verminderte Reparaturkapazität aufweisen. Dieser Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant, was daran liegen könnte, dass der mittlere Altersunterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen lediglich 20 Jahre betrug. Auch war der Altersunterschied innerhalb jeder Gruppe relativ groß. Augenfällig war, dass dieser Reparaturunterschied nach einer Dosis von 500 mGy nicht mehr zu erkennen war. Dies kann damit erklärt werden, dass sich diese kleinen Reparaturunterschiede nach höheren Dosen relativieren, da in diesem Dosisbereich die DSB-Reparatur allgemein gut verläuft. Bezogen auf die klinischen Indikationen war zu beobachten, dass Patienten mit bösartigen Erkrankungen *in vitro* tendenziell niedrigere Fociwerte hatten als Patienten mit gutartigen Erkrankungen. Da dies *in vivo* jedoch nicht zu beobachten war, bedurfte auch dieses Ergebnis einer weiteren Überprüfung. Hinsichtlich des Geschlechts gab es keine eindeutigen Tendenzen, weil wahrscheinlich die Anteile der jeweiligen Vergleichsgruppen zu unausgewogen waren.

In der Patientengruppe I schienen KM-Patienten *in vitro* besser zu reparieren als nativ bestrahlte. Da das mittlere Alter dieser beiden Gruppen lediglich drei bis vier Jahre auseinander lag, konnte dies nicht der primäre Grund für den Reparaturunterschied der beiden Patientengruppen sein. In Patientengruppe I machte der Anteil an Frauen unter den nativ bestrahlten Patienten 14% aus, unter den Patienten, die unter Gabe von KM bestrahlt wurden, 23%, sodass dieser Faktor ebenfalls nicht als Ursache für die Unterschiede im Reparaturvermögen in Betracht kam. Bezogen auf die klinische Indikation als möglicher Einflussfaktor befanden sich zwar fünf der sechs Patienten mit bösartigen Erkrankungen in der Gruppe, welche KM bekam, trotz-

dem gab es keine Unterschiede im Reparaturverhalten zwischen Patienten mit gutartigen und bösartigen Erkrankungen. Die Ursachensuche bezüglich der Frage, was die relativ großen Unterschiede in der DNA-Reparatur beeinflusste, musste sich bei Patientengruppe I also entweder auf weitere, noch unbekannte Faktoren ausdehnen oder die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass die Unterschiede im Reparaturvermögen eher zufälliger Natur waren.

Um über die Faktoren, welche das DSB-Reparaturvermögen grundsätzlich beeinflussen können, mehr Klarheit zu gewinnen, wurde in einer unabhängigen weiteren Patientengruppe, (Patientengruppe III) bei einer erneuten Untersuchung darauf geachtet, dass im Vergleich zu der Patientengruppe I der durchschnittliche Altersunterschied zwischen jüngeren und älteren Patienten größer war (40 Jahre), dass der Altersunterschied innerhalb der jungen und alten Vergleichsgruppe kleiner war (12 Jahre bei den jüngeren und 20 Jahre bei den älteren Patienten) und dass die Anzahl der Patienten in den jeweiligen Fraktionen ähnlich groß war. Gleichzeitig konnten etwa gleich viele Patienten mit gut- und bösartigen Erkrankungen, jedoch nur fünf Männer und zehn Frauen für die Studie gewonnen werden, sodass das Geschlecht als einziger Faktor unausgewogen war. Ein Vergleich der DSB-Reparatur ergab hierbei, dass Patienten mit einem Durchschnittsalter von 70 Jahren signifikant mehr DSBs aufwiesen und damit schlechter reparierten als junge Patienten mit einem Durchschnittsalter von 28 Jahren. Der Unterschied war auch schon in der Induktion zu erkennen, war dort jedoch weniger ausgeprägt als nach den verschiedenen Reparaturzeiten. Trotzdem ist auch nach Berücksichtigung des Unterschiedes in der Induktion klar zu erkennen, dass in der Reparatur zwischen diesen beiden Vergleichsgruppen ein Unterschied bestand. Eine Erklärung für Unterschiede in der Induktion könnte in einem nachlassenden Phosphorylierungsvermögen von H2AX mit dem Alter bestehen und damit in einer nachlassenden Schadenserkenkung.

Eine frühere Arbeit, die sich mit der Effizienz der Reparatur von IR-induzierten DSBs in Lymphozyten beschäftigte, konnte mittels Comet-Assay analog zur vorliegenden Arbeit einen Rückgang im Reparaturvermögen mit zunehmendem Alter bei Patienten zwischen 23 und 78 Jahren beobachten (Mayer et al. 1989). Hierbei zeigten unstimulierte Lymphozyten von Patienten unter 60 Jahre bereits 0,5 h nach Bestrahlung eine um mehr als 50% erhöhte Anzahl an Reparaturereignissen als Patienten über 60 Jahre. Über die Ursachen hierfür wurde in der Studie jedoch nicht spekuliert. Auch eine Studie von Seluanov et al. (2004) konnte in Fibroblasten altersabhängig große Unterschiede im Reparaturverhalten beobachten. Hierbei sahen sie nicht nur einen Unterschied zwischen alten und jungen Zellen *in vitro*, sondern vielmehr eine sukzessive Abnahme des Reparaturvermögens mit zunehmendem Alter der Zellen. Dies ist konsistent damit, dass in der vorliegenden Arbeit in der Patientengruppe I die jungen Patienten (mittleres Alter 40 Jahre) eine tendenziell bessere Reparatur zeigten als die ältere Patientengruppe, aber eine schlechtere als die jungen Patienten der Patientengruppe III, deren Durchschnittsalter 28

Jahre betrug. Somit konnten auch hier Abstufungen der Reparaturkapazität bei unterschiedlichen Altersstufen nachgewiesen werden.

Lymphozyten greifen bei der DSB-Reparatur ausschließlich auf das NHEJ zurück, was darauf hindeutet, dass die NHEJ-Effizienz mit zunehmendem Alter nachlässt. Um dies zu untersuchen, entwickelten Seluanov et al. (2004) eine Methode zur Messung der NHEJ-Effizienz. Diese basiert auf einer NHEJ-Reporter-Kassette, welche ein GFP (*green fluorescent protein*)-Gen enthält. In dieses Gen wird ein Intron mit einer Erkennungsstelle für eine Endonuklease eingefügt, welche gezielt DSBs setzt. Das GFP-Gen wird durch Induktion eines DSBs mit anschließender Reparatur wieder aktiviert. Auf diese Weise konnten Seluanov et al. (2004) durch Messung der Anteile GFP-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie die NHEJ-Effizienz der Zellen bestimmen. Dabei fanden sie heraus, dass in zwei gealterten humanen Fibroblasten-Zelllinien um bis zu 4,5fach weniger Wiederverknüpfungereignisse von DSBs durch das NHEJ stattfanden, als in jungen Zellen. Da die beiden Zelllinien von unterschiedlichen Gewebetypen abstammten (Lunge und Vorhaut), betrachteten Seluanov et al. (2004) das Nachlassen der NHEJ-Effizienz im Alter als allgemeingültiges Phänomen, welches unabhängig vom Zelltyp ist. Andere Ergebnisse, die methodisch auf einem ähnlichen Versuchsansatz, dem *Plasmid Rejoining Assay* beruhen, konnten ebenfalls nachweisen, dass *in vitro* in neuronalen Zellen von alternden Ratten eine verminderte NHEJ-Effizienz vorlag (Ren & de Ortiz 2002, Vyjayanti & Rao 2006).

Eine weitere Ursache für eine abnehmende Reparaturkapazität mit zunehmendem Alter könnte darin liegen, dass sich der Beitrag der verschiedenen Mechanismen an der Reparatur der DSBs verändert. Einige Arbeiten beschäftigten sich bereits mit den Reparaturmechanismen und ihrem Auftreten im Alter. So wurde beobachtet, dass die Häufigkeit des Einsetzens von z. B. Mismatch- und Basenexzisionsreparatur mit zunehmendem Alter zurückgeht. Dies wurde *in vitro* an alternden humanen T-Zellklonen, alternden humanen Fibroblasten und Leukozyten nachgewiesen (Atamna et al. 2000, Annett et al. 2005). Während z. B. in G2-Zellen in der schnellen Reparaturphase vor allem das NHEJ für die Reparatur der Brüche verantwortlich ist und somit den Hauptteil der DSBs repariert, ist die HR nur für einen kleinen Teil der Brüche während der langsamen Reparaturphase zuständig. Anhand von Untersuchungen an Keimzellen von *Drosophila* konnte festgestellt werden, dass sich der relative Gebrauch dieser beiden Reparaturwege und eines dritten Reparaturweges, des *Single-strand-annealings* (SSA), mit dem Alter der Fliegen änderte. Hierbei stieg die HR-Häufigkeit mit dem Alter der Fliegen von 14% auf 60% linear an, während der Gebrauch der beiden anderen Reparaturwege abnahm (Preston et al. 2006). Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten nicht-proliferierenden Lymphozyten vornehmlich das NHEJ benutzen, würde eine Verlagerung der Reparaturmechanismen bzw. ein Rückgang des NHEJ-Gebrauchs im Alter dazu führen, dass die Reparaturkapazität insgesamt abnimmt. Sofern jedoch im Zuge eines Ersatzweges auch andere Reparaturmechanismen wie

SSA gebraucht würden, wäre es auch denkbar, dass diese anderen Mechanismen mit zunehmendem Alter nicht mehr so effizient funktionieren.

In genetischen Untersuchungen in humanen und murinen Modellen wurden Mutationen in Komponenten verschiedener DNA-Reparaturwege (u. a. auch des NHEJs) mit der zellulären Alterung in Zusammenhang gebracht. So konnte z. B. beobachtet werden, dass die Expression der Reparaturproteine Ku70 und Mre11 in humanen Lymphozyten mit zunehmendem Alter der Spender zurückging (Ju et al. 2006). Während in der Studie von Ju et al. (2006) kein Rückgang in der Expression von Ku80 mit zunehmendem Alter gemessen werden konnte, konnte eine andere Studie beobachten, dass in alternden humanen Fibroblasten das Proteinlevel sowohl von Ku70 als auch Ku80 um 50% zurückging (Seluanov et al. 2007). Weiterhin unterschied sich in letztgenannter Studie die zelluläre Lokalisation von Ku zwischen alten und jungen Zellen. Während in jungen nicht-bestrahlten Zellen Ku sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorhanden war und nach γ -Bestrahlung in den Zellkern translozierte, befand sich Ku in alternden nicht-bestrahlten Zellen ausschließlich im Zellkern. Seluanov et al. (2007) schlussfolgerten daraus, dass das im Zytoplasma befindliche Ku-Protein bei jungen nicht-bestrahlten Zellen als Reserve dient und erst rekrutiert wird, wenn es durch Bestrahlung o. ä. zu einer hohen Anzahl an DSBs kommt und zusätzliche Ku-Proteine zur Reparatur benötigt werden. Dieses Reservoir steht alternden Zellen nicht zur Verfügung. Die Beobachtung, dass altersassoziierte Krankheitsbilder wie z. B. Osteopenie (nachlassende Knochendichte) in Mäusen mit Mutationen in Komponenten des NHEJs wie z. B. Ku80 und DNA-PK_{cs} auftraten, gibt ebenfalls Hinweise darauf, dass eine Verbindung zwischen der Reparatur von DNA-Schäden und der zellulären Alterung besteht.

Gegenläufige Studien konnten keinen altersbedingten Unterschied in der DSB-Reparatur-effizienz beobachten, dafür aber einen Anstieg der spontan auftretenden γ H2AX-Foci mit zunehmendem Alter (Sedelnikova et al. 2008). Dabei wiesen humane WT-Lymphozyten älterer Spender mit einem Alter von ca. 50 Jahren Werte von bis zu 0,7 γ H2AX-Foci pro Zelle auf, was in der vorliegenden Arbeit in etwa der Anzahl an DSBs entspricht, wie sie durch eine Bestrahlung mit 70 mGy induziert werden würde. Die Kontrollwerte alter und junger Spender lagen in der vorliegenden Arbeit zwischen 0,05 und 0,1 Foci pro Zelle, was mit früheren Studien konsistent ist (Lobrich et al. 2005, Geisel et al. 2008, Kuefner et al. 2009). Weiterhin konnten Sedelnikova et al. in ihrer Studie nach IR weder nach kurzen noch nach langen Reparaturzeiten einen Unterschied im Reparaturverhalten zwischen älteren und jüngeren Spendern feststellen. Hierbei lagen der Altersunterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen sowie die Anzahl an ausgewerteten Spendern ähnlich hoch wie in der Patientenstudie III der vorliegenden Arbeit. Die eingesetzte Strahlendosis lag bei Sedelnikova et al. (2008) jedoch bei 600 mGy. Somit sind die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit nach einer *in vitro*-Dosis von 500 mGy, bei welcher ebenfalls kein Altersunterschied in der Reparatur gesehen werden konnte, mit denen von Sedelnikova et al. (2008) konsistent.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Ergebnis aus Patientengruppe I, dass Patienten mit bösartigen Erkrankungen tendenziell ein besseres Reparaturvermögen aufweisen als solche mit gutartigen Erkrankungen, in Patientengruppe III nicht bestätigt werden. Dagegen zeigten Frauen tendenziell ein schlechteres Reparaturvermögen als Männer. Hierzu findet man in der Literatur nur wenige Aussagen. In einer Studie, die sich mit der DSB-Reparatur in unstimulierten primären Lymphozyten beschäftigte, wurden die Daten auch hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Geschlechtern ausgewertet (Mayer et al. 1989, 1991). Dabei war der Anteil an nicht-reparierten DSBs bei älteren Frauen größer als bei älteren Männern. Die Autoren führten als Erklärung an, dass altersabhängige Veränderungen in der Chromatinstruktur auftreten, welche die DSB-Reparatur beeinflussen und für welche Frauen sensibler sind als Männer.

Zusammenfassend gibt es zahlreiche Indizien dafür, dass nicht nur die Anzahl an spontanen DSBs mit zunehmendem Alter ansteigt, sondern auch dafür, dass die Reparaturkapazität nach IR im Alter eingeschränkt ist. Hierzu konnten in der vorliegenden Arbeit vor allem *in vitro* Ergebnisse erbracht werden. Um jedoch eine konkrete Aussage darüber treffen zu können, ob die altersabhängige Verschlechterung dosisabhängig ist, müssten weitere Studien zur Messung der Dosisabhängigkeit durchgeführt werden. Dies wäre besonders für die Strahlentherapie von Relevanz, da Krebserkrankungen mit dem Alter zunehmen und diese mit hohen Dosen an IR behandelt werden. Bezüglich des Geschlechtes konnte eine Tendenz dahingehend beobachtet werden, dass Frauen eine schlechtere DSB-Reparatur aufwiesen als Männer. Da die Anzahl an Männern und Frauen in beiden Patientengruppen der vorliegenden Arbeit nicht ganz ausgewogen war, und es nur wenige Untersuchungen in der Literatur diesbezüglich gibt, stellt die Untersuchung der geschlechtsabhängigen DNA-Reparatur ein neues spannendes Untersuchungsfeld dar.

5.5 *In vivo* und *in vitro*-Untersuchungen zur Wirkung niedriger Dosen IR

Die Untersuchung der Wirkung niedriger Dosen IR stellt in der Strahlenbiologie ein wichtiges Forschungsfeld dar, dessen Erkenntnisse sowohl auf politische, als auch auf ökologische und ökonomische Entscheidungen Einfluss haben. Im Jahr 2005 wurden pro Einwohner in Deutschland 1,6 allgemeine Röntgenuntersuchungen durchgeführt. Die kollektive effektive Dosis lag hierbei bei 1,8 mSv pro Einwohner und Jahr. Obwohl der Trend dahin ging, dass die Häufigkeit an konventionellen Röntgenuntersuchungen (des Thorax, des Schädels oder des Bauchraums) abnahm, stieg die kollektive effektive Dosis insgesamt weiter an. Die Ursache hierfür lag darin, dass die Häufigkeit von CT-Untersuchungen über einen Beobachtungszeitraum von 1996 bis 2005 um 80% zunahm. Von allen durchgeführten Röntgenuntersuchungen machten CT-Untersuchungen zwar lediglich 7% aus, durch die zunehmende Häufigkeit der Anwendungen trugen sie jedoch insgesamt zu 75% zu der kollektiven effektiven Dosis bei. Dies spiegelt zumindest zum Teil den zunehmenden Einsatz neuer Techniken im klinischen Bereich wider

(Bundesamt für Strahlenschutz 2007). Es verdeutlicht aber auch die Wichtigkeit der Untersuchung der zellulären Reaktion auf Strahlendosen, wie sie bei CT-Untersuchungen appliziert werden. Da bisherige epidemiologische Ansätze zur Abschätzung des Krebsrisikos nur bis Dosen von minimal 50 mGy zuverlässige Daten liefern, ist eine Untersuchung niedriger Dosen *in vivo* von höchstem Interesse für eine verbesserte Risikoabschätzung.

5.5.1 *In vivo*-Untersuchung zur Wirkung niedriger Dosen IR

Wie sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in einer früheren Studie bereits beschrieben wurde, entspricht eine CT-Untersuchung des Thorax mit einem DLP von 500 mGy*cm einer *in vitro* applizierten Dosis von ca. 10 mGy (Lobrich et al. 2005). Im Rahmen der Patientenstudien der vorliegenden Arbeit war zu beobachten, dass das Reparaturvermögen nach einer so niedrigen Dosis *in vitro* eingeschränkt ist. Diese Beobachtung ist konsistent mit früheren Studien, die sich mit der Reparatur von DSBs in konfluenten Fibroblasten nach niedrigen Dosen beschäftigten (Rothkamm & Lobrich 2003). Dabei wurde gezeigt, dass mit sinkender Röntgendosis die Reparaturkapazität in konfluenten Fibroblasten abnimmt und dass im Bereich von wenigen mGy nahezu keine Reparatur mehr stattfindet. Die von Rothkamm et al. (2003) applizierten Dosen lagen demnach im für die Röntgendiagnostik relevanten Dosisbereich. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts eignet sich das murine System sehr gut, da dieses als Säugersystem ähnliche anatomische Eigenschaften und DSB-Reparatursysteme aufweist wie das humane. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass Mäuse ganzkörperbestrahlt werden können, sodass alle Zellen im Körper die gleiche Dosis erhalten.

Parallel zur Etablierung der IFM in murinen Lymphozyten verschiedener mutanter Mausstämmen in der vorliegenden Arbeit konnten in einem gemeinsamen Projekt mit dem Strahlenbiologischen Labor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar die in Lymphozyten gemessenen DSB-Reparaturdefekte auch in anderen Geweben verschiedener Organe derselben Mausstämmen nachgewiesen werden (Rube et al. 2008b). Den Anfang hierbei machte die DAB-Färbung, welche auf immunhistochemischem Weg γ H2AX detektierte. Die anschließende γ H2AX-IF-Färbung zeigte, dass die γ H2AX-positiven Bereiche bei beiden Färbemethoden vergleichbar waren (Rube et al. 2008b). Dadurch wurde die IFM in murinem Gewebe validiert, wodurch sich nun erstmals einzelne DSBs unter *in vivo*-Bedingungen in verschiedenen Gewebetypen quantifizieren ließen. Dies stellt eine erhebliche Erhöhung der Sensibilität im Vergleich zu vorherigen Studien im Gewebe dar, in denen vorwiegend die Gesamtmenge an phosphoryliertem H2AX in Geweben gemessen wurde (Olive et al. 2004, Qvarnstrom et al. 2004).

Durch die anschließende Etablierung der γ H2AX- und 53BP1-IFM in verschiedenen Geweben der Maus in der vorliegenden Arbeit war es zudem zum ersten Mal möglich, das Reparaturver-

halten nach niedrigen Dosen auch *in vivo* in verschiedenen Gewebetypen sicher zu messen. Hierfür wurden reparaturprofiziente WT-Mäuse (C57BL/6-Mäuse) mit einer hohen Dosis, einer höheren Niedrigdosis und mit einer niedrigen Dosis bestrahlt und zu verschiedenen Reparaturzeiten die Anzahl an γ H2AX-Foci in verschiedenen Organen bestimmt. Die Induktionswerte nach 1 Gy und 10 mGy waren in den verschiedenen Geweben nahezu identisch. Hierbei waren die nach 1 Gy induzierten Werte konsistent mit den Werten früherer Messungen (Rube et al. 2008a). Die Induktionen, welche nach 100 mGy gemessen wurden, lagen dagegen niedriger als erwartet. Ungenauigkeiten in der Dosimetrie können hierbei ausgeschlossen werden, da diese nicht in dieser Größenordnung liegen. Daher bleibt die Ursache hierfür weiterhin unbekannt. Weiterhin lagen verglichen mit den Induktionen in murinen Lymphozyten die im Gewebe gemessenen Fociwerte in der Induktion ca. 35% zu niedrig. Dies hängt höchstwahrscheinlich damit zusammen, dass die Kerne der Gewebezellen in den Gewebeschnitten angeschnitten und damit nicht komplett waren, sodass die einzelnen Zellen nicht vollständig vorhanden waren und damit auch nicht die wahre Focianzahl gemessen werden konnte.

Die Reparatur der induzierten DSBs erfolgte in allen Organen mit der gleichen Kinetik, was die Ergebnisse von Rube et al. (2008a) bestätigte. Von allen ausgewerteten Organen galten Lunge und Dünndarm als besonders, die Niere als moderat sowie Gehirn und Herz als am wenigsten strahlenempfindlich. Unterschiede in der Reparaturreffizienz in verschiedenen ausdifferenzierten Gewebezellen können somit als Ursache für Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit von Organen weitestgehend ausgeschlossen werden. Organe bestehen neben ausdifferenzierten Zellen auch aus Stammzellen sowie verschiedenen Vorläuferzellen, die aus der Teilung von Stammzellen entstehen und die Vorstufe zu differenzierten Zellen bilden. Weitere Studien zur Strahlensensitivität von Geweben sollten sich daher sinnvollerweise auch auf diese Stammzellen und den Vorstufen von ausdifferenzierten Zellen ausweiten.

Nach einer Bestrahlung mit 10 mGy wurden nur der Dünndarm, die Niere und das Herz ausgewertet. Die übrigen Organe (Gehirn und Lunge) sind für die Auswertung niedriger Fociwerte von ca. 0,1 Foci pro Zelle weniger gut geeignet, da sowohl im Gehirn als auch in der Lunge Bereiche existieren, die nicht gefärbt werden können. Wenn die Focianzahl zu niedrig wird, besteht deshalb die Gefahr, nicht gefärbte Bereiche als γ H2AX-negativ anzusehen und diese in die Auswertung mit einzubeziehen. Die Fociwerte, welche nach 100 mGy und 24 h in Gehirn und Lunge gemessen wurden, können dennoch als sicher betrachtet werden, da sie auf gleicher Höhe liegen wie die entsprechenden Werte in Dünndarm, Niere und dem Herz der gleichen Dosis. Dennoch wurden für die niedrigste Dosis (10 mGy) nur die Organe ausgewählt, die in diesem Dosisbereich sicher auswertbar waren.

Eine Reparaturstudie über 24 h und allen Dosen zeigte, dass die Reparaturkapazität nach 1 Gy und 100 mGy am effizientesten war. Innerhalb von 24 h wurden über 90% der Brüche repariert.

Nach einer Bestrahlung mit 10 mGy verlief die Reparatur deutlich schlechter. 24 h nach Bestrahlung verblieben nach dieser Dosis noch über 70% der induzierten Brüche unrepariert. Auffällig war, dass 24 h nach Bestrahlung mit 10 oder 100 mGy eine residuale Focianzahl zu messen war, sodass die induzierten DSBs nicht komplett repariert wurden. Dies ist konsistent mit *in vitro*-Studien von Rothkamm et al. (2003) mit konfluenten Fibroblasten und mit den Reparaturmessungen der vorliegenden Arbeit mit Lymphozyten bei Patientengruppe I und III. Nach 1 Gy lag die induzierte Focianzahl 24 h nach Bestrahlung dagegen noch zu hoch, um eine ähnliche Aussage treffen zu können. Nachdem *in vivo* mit zwei verschiedenen DSB-Markern u. a. nachgewiesen werden konnte, dass 24 h nach Bestrahlung mit 10 und 100 mGy residuale Foci verbleiben, wurde überprüft, ob dieses Focilevel ähnlich wie in der Studie von Rothkamm & Lobrich (2003) auch nach längeren Reparaturzeiten noch besteht. Daher wurde die Reparaturzeit auf drei Tage ausgedehnt und der Reparaturverlauf durch Messung von 53BP1-Foci verfolgt. Dabei verschwand nach 100 mGy die Anzahl an Brüchen bis 72 h komplett, während im gleichen Zeitraum nach 10 mGy die Focianzahl auf 30% der ursprünglich induzierten DSBs absank. Dieses Ergebnis bildet zunächst einen Gegensatz zu den bisherigen *in vitro*-Daten. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Daten nach 48 und 72 h nur aus zwei Experimenten resultierten, sodass die Werte Schwankungen unterworfen waren. Weiterhin wäre es denkbar, dass das Absinken der Focianzahl nach 24 h nicht Reparatur bedeutet, denn unter physiologischen Bedingungen sind manche Gewebe in der Lage, sich durch Proliferation und Differenzierung der Zellen zu regenerieren und geschädigte Zellen zu eliminieren.

Während z. B. das Gehirn, dessen Neuronen eine sehr lange Lebenszeit besitzen, als sehr statisches Organ gilt, werden Dünndarmzellen ständig erneuert. Die ausgewerteten ausdifferenzierten Dünndarmzellen entstehen aus Stammzellen, die sich in den Krypten befinden, den Vertiefungen zwischen den Villi. Diese Stammzellen bilden durch Zellteilung Nachkommen, die sogenannten *Transit Amplifying*-Zellen aus, welche geschätzte sechs bis acht Teilungen durchlaufen und dabei Richtung Villus wandern (Bach et al. 2000). Anschließend differenzieren sich diese Zellen aus, stellen dabei die Teilung ein und werden bei der Neubildung weiterer Zellen in Richtung Villusspitze geschoben, wo sie anschließend abgestoßen werden. Dieser Zyklus dauert zwei bis sieben Tage (Crosnier et al. 2006). Da der Reparaturzeitraum im Rahmen der vorliegenden Arbeit drei Tage betrug, wäre es möglich, dass bestrahlte Zellen während dieses Beobachtungszeitraums vom Dünndarm abgestoßen und ausgeschieden wurden. Diese ausgeschiedenen Zellen könnten somit nicht in die Auswertung mit eingeflossen sein, sodass der ermittelte Fociwert sank. Dies wäre dann fälschlicherweise als Reparatur gedeutet worden.

Zur Proliferationsfähigkeit ausdifferenzierter Zellen in den beiden anderen Organen gibt es nicht allzu viele Untersuchungen. In der Niere werden in Studien, die sich mit der Regenerationsfähigkeit nach Nierenerkrankungen beschäftigten, z. Z drei mögliche Quellen für neue Nierenzellen diskutiert: Angrenzende Nachbarzellen, welche durch Zellteilung geschädigte Zellen

ersetzen, extrarenale Zellen, welche in die Niere einwandern und dort geschädigte Zellen ersetzen und Stammzellen, welche sich in der Niere befinden (Gupta & Rosenberg 2008). Für alle drei Möglichkeiten existieren Hinweise. Letztendlich ist die Sachlage jedoch in diesem Organ noch nicht eindeutig geklärt. Die Entdeckung von Herzvorläuferzellen im erwachsenen Herz ist von besonderem Interesse, da lange angenommen wurde, dass das Herz ein sehr statisches Organ ist, welches keine Stammzellen besitzt. Hinweise, dass das adulte Herz Zellen mit replikativen Eigenschaften besitzen könnte, entstammen aus einer Studie mit Herzinfarktpatienten (Beltrami et al. 2001). Seither gibt es auch für das Herz zahlreiche Studien, die einen Hinweis auf die Existenz von multipotenten proliferierenden Herzvorläuferzellen im adulten Herz geben (Wu et al. 2008).

Zusammengefasst konnte zum ersten Mal die Beobachtung aus *in vitro*-Reparaturstudien *in vivo* bestätigt werden. Diese beinhaltet, dass das Reparaturvermögen mit kleiner werdender Dosis abnimmt. Außerdem konnte *in vivo* konsistent zu den *in vitro*-Daten beobachtet werden, dass 24 h nach Bestrahlung ein residuales Level an unreparierten Brüchen verbleibt. Dagegen ist die Datenlage aus Reparaturmessungen, die über 24 h hinausgehen, noch unsicher und kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht bewertet werden.

5.5.2 *In vitro*-Untersuchung zur Wirkung niedriger Dosen IR

Wie bereits erwähnt, wurde vor einigen Jahren von Rothkamm & Lobrich (2003) veröffentlicht, dass die Reparaturkapazität mit kleiner werdender applizierter Dosis an Röntgenstrahlung abnimmt und nach langen Reparaturzeiten ein residuales Focilevel verblieb. Nachdem dies *in vivo* konsistent zu der erwähnten Studie bestätigt werden konnte, sollte der Ursache hierfür nachgegangen werden. Vorher wurden jedoch zunächst die Ergebnisse von Rothkamm & Lobrich in der vorliegenden Arbeit reproduziert. Hierfür wurden zusätzliche Niedrigdosen eingesetzt sowie zwei DSB-Marker, (γ H2AX und pATM), verwendet. Auf diese Weise sollte die Reparaturkapazität noch differenzierter gemessen und die erhaltenen Ergebnisse mit verschiedenen Markern abgesichert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass nach einer Dosis von 200 mGy und 80 mGy innerhalb von 24 h 90 bis 95% der Brüche repariert wurden. Danach nahm der Anteil an reparierten DSBs bis 10 mGy stufenweise mit abnehmender Dosis ab. Nach 2 mGy änderte sich die induzierte Anzahl von 1 Fokus in ca. 12 bis 13 Zellen bis 24 h nicht wesentlich. Insgesamt verblieb bei allen Dosen im Gegensatz zu den *in vivo*-Daten und konsistent zu Rothkamm & Lobrich (2003) ein residuales Focilevel, welches sich auch über einen Zeitraum von drei Tagen nicht mehr veränderte. Die Vorgängerstudie konnte somit reproduziert werden.

Dass *in vitro* nach Bestrahlung ein residuales Focilevel nach langen Reparaturzeiten verbleibt, also nicht alle Brüche repariert werden, scheint nur auf nicht-proliferierende Zellen in der G0-

Phase des Zellzyklus beschränkt zu sein, da bei Rothkamm & Lobrich (2003) die residuale Focianzahl wieder verschwand, sobald man den Zellen erlaubte wieder zu proliferieren. Es könnte sein, dass G1-Zellen generell eine bessere DSB-Reparatur aufweisen als G0-Zellen. Studien haben festgestellt, dass sich G0-Zellen physiologisch von G1-Zellen z. B. durch eine veränderte Genexpression unterscheiden (Coller et al. 2006). Es wäre somit möglich, dass von diesen Veränderungen auch die Reparaturmechanismen betroffen sind. Hierfür gibt es jedoch keine Hinweise in der Literatur. Eine weitere Ursache für die residualen DSBs in G0-Zellen könnte sein, dass dies Brüche sind, welche während der Reparaturzeit entstehen. Rothkamm & Lobrich (2003) geben als Ursache hierfür z. B. den *Bystander*-Effekt an. Bei diesem Effekt bilden Zellen DNA-Schäden aus, obwohl sie nicht direkt vom DNA-schädigenden Agens betroffen sind (Hall 2003). Eine Studie beobachtete in WT-Fibroblasten, dass nach Dosen bis 5 mGy die Induktion von Foci nicht linear, sondern als Schulterkurve verläuft (Ojima et al. 2008). Dieser Effekt erfuhr ab einer Dosis von 10 mGy eine Sättigung, sodass die Kurve von diesem Punkt an linear verlief. Die ‚Schulter‘ erklären die Autoren durch DSBs, welche über *Bystander*-Effekte entstehen. Als Weg für die *Bystander*-vermittelte DSB-Entstehung sahen die Autoren Zellkommunikation an, da nach Gabe von *Lindane*, einem Inhibitor der Zellkommunikation, in den Zellen keine *Bystander*-vermittelte DSB-Entstehung mehr zu beobachten war.

In der vorliegenden Arbeit konnte beim Vergleich der Induktionswerte der unterschiedlichen Dosen keine Schulterkurve beobachtet werden. Der Anstieg hin zu höheren Dosen verlief nahezu linear. Der Grund für die Diskrepanz zu Ojima et al. (2008) ist unklar, jedoch verwendeten sie in ihrer Studie eine andere WT-Zelllinie, sodass zelllinienspezifische Unterschiede nicht ausgeschlossen werden können. Eine Restfocianzahl von einem Bruch in 10 bis 12 Zellen, wie es bei Rothkamm & Lobrich (2003) sowie in der vorliegenden Arbeit der Fall war, würde damit durch ein ständiges Gleichgewicht zwischen reparierten und neu auftretenden DSBs hervorgerufen werden. Rothkamm & Lobrich (2003) setzten hierfür voraus, dass beide Prozesse bei dieser Focianzahl mit der gleichen Häufigkeit stattfinden. Eine Bestrahlung mit noch niedrigeren Dosen würde dieser Annahme entsprechend dazu führen, dass mehr DSBs entstehen als durch die Reparatur verschwinden, sodass die Gesamt-Focianzahl ansteigt. Dies überprüften Rothkamm & Lobrich (2003), indem sie mit einer Dosis bestrahlten, welche noch weniger Brüche induziert. Da sich die dabei induzierte Focianzahl jedoch während der Reparaturzeit nicht erhöhte, schlossen sie daraus, dass nicht-reparierte Brüche für das residuale Focilevel verantwortlich sind. Unterstützt wurde deren Schlussfolgerung dadurch, dass nach einer Beobachtungszeit von 14 Tagen in konfluenten Zellen ein langsamer Abfall der Focianzahl zu beobachten war. Dies konnte ihrer Meinung nach durch die Eliminierung von Zellen verursacht worden sein, die über einen langen Zeitraum einen DSB aufwiesen. Gestützt wurde diese Beobachtung dadurch, dass vermehrt apoptotische Zellen und Mikrokerne auftraten, sobald den Zellen die Möglichkeit zur Proliferation gegeben wurde. Dies war in den konfluenten Zellkulturen nicht der Fall gewesen.

Überlebensexperimente von Rothkamm & Lobrich (2003) zeigten eine überdurchschnittliche Reduktion des Zellüberlebens bei niedrigen Dosen, was einen weiteren Hinweis darauf lieferte, dass Zellen DSBs unrepariert belassen und anschließend absterben.

Bei der Überlegung, ob der *Bystander*-Effekt eine Rolle bei der Bildung von DSBs nach niedrigen Dosen spielt, könnte als Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Anzahl an durch den *Bystander*-Effekt induzierten DSBs von der Anzahl IR-induzierter DSBs abhängt, sodass bei einer niedrigeren Dosis weniger Zellen einen Bruch an andere Zellen kommunizieren. Dementsprechend müsste die Induktion von mehr als nur einem Bruch in 10 bis 12 Zellen zur Folge haben, dass auch mehr *Bystander*-Brüche entstehen, weil dann mehr Zellen ein Schadenssignal an nicht-geschädigte Zellen weitergeben. Da in diesem Bereich jedoch eine Abnahme an Foci beobachtet wurde, also mehr Brüche repariert wurden als neue entstanden, ist dies unwahrscheinlich. Zumindest läge bei höheren Dosen dann das Gleichgewicht nicht auf der Bildung von Brüchen durch den *Bystander*-Effekt, sondern auf der Reparatur.

Rothkamm & Lobrich (2003) favorisierten die Theorie, dass es einen Schwellenwert an induzierten Brüchen gibt, ab welchem diese nicht mehr repariert werden. Dies war sowohl in deren Studie als auch in der vorliegenden Arbeit bei einem Bruch in 10 bis 12 Zellen der Fall (ca. 0,05 bis 0,1 Foci pro Zelle). Eine mehrmalige Induktion dieser Bruchanzahl mit einem zeitlichen Abstand zwischen den Bestrahlungen sollte demnach eine Akkumulation der DSBs zur Folge haben. Experimente mit fraktionierten Bestrahlungen führten jedoch nicht zu einer Akkumulation der Schäden, sondern zur Reparatur der fraktioniert applizierten DSBs auf das Niveau der durch die erste Dosis induzierten DSBs. Somit spielte nicht die insgesamt applizierte Dosis, sondern die Anzahl der aktuell vorhandenen Brüchen eine Rolle bei der Reparaturkapazität. Dieses Reparaturverhalten nach fraktionierter Bestrahlung erinnert an das Phänomen von *Adaptive Response* (AR). Hierbei führt eine Bestrahlung mit einer *priming dose*, welche sich üblicherweise im Niedrigdosisbereich bewegt, dazu, dass eine nach einem zeitlichen Abstand applizierte *challenging dose* besser repariert wird. Die *challenging dose* liegt üblicherweise in einem höheren Dosisbereich als die *priming dose* (Tapio & Jacob 2007). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass induzierte DSBs nach einer *challenging dose*, welche im selben Dosisbereich wie die *priming dose* liegt, ebenfalls besser repariert werden.

Zusammenfassend konnte *in vitro* konsistent zu den *in vivo*-Daten und zu früheren Studien wiederholt gemessen werden, dass mit kleiner werdender Dosis die Reparaturkapazität abnimmt und ein residuales Focilevel verbleibt. Hierzu wurden einige denkbare Ansätze und Ursachen diskutiert. Nachfolgend stellte sich somit die Frage, welche Faktoren die Schadensantwort nach niedrigen Dosen IR beeinflussen.

5.5.3 Überlegungen zu Faktoren, welche die Schadensantwort nach niedrigen Dosen IR beeinflussen können

Eine nachlassende Reparaturkapazität nach niedrigen Dosen wurde *in vivo* und *in vitro* bisher nur in konfluenten Zellen beobachtet, also in Zellen, die in unmittelbarem Zell-Zell-Kontakt stehen. Hierbei wurde eine Focianzahl von 0,2 Foci pro Zelle in Zellen, die anfänglich 2 Foci pro Zelle aufwiesen, schneller repariert, als in Zellen, in welchen von Beginn an nur 0,2 Foci pro Zelle induziert waren. Dies impliziert, dass die Anzahl an induzierten DSBs über die anschließende Reparaturkapazität entscheidet. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass nach Induktion von 0,2 Foci pro Zelle lediglich jede fünfte Zelle einen DSB aufweist. Es stellt sich somit die Frage, wie in einem Zellverband das Schadenslevel der Population kommuniziert und die Entscheidung über Reparatur oder Nicht-Reparatur in den einzelnen Zellen getroffen wird.

Im Zuge der Aufrechterhaltung der Homöostase von Zellen in Gewebeverbänden kommunizieren diese über ein kompliziertes Netzwerk miteinander. Hierbei sind vor allem die *Gap-junctions* (Zell-Zell-Kanäle) zu nennen. Diese bestehen aus kanalbildenden Proteinkomplexen, welche die zytoplasmatischen Kompartimente benachbarter Zellen direkt miteinander verbinden und je nach Aufbau des Kanals den Durchtritt von kleinen Molekülen, Ionen und *second messengers* erlauben (Bruzzone et al. 1996). Es existieren deutliche Hinweise darauf, dass auf diesem Weg Schadenssignale von geschädigten zu nicht-geschädigten Zellen übermittelt werden. Hierbei untersuchten z. B. Bruzzone et al. (1996) konfluente Zellen, welche entweder GJIC (*gap junction intercellular communication*)-profizient oder –defizient waren. Die Zellen wurden mit kleinen Dosen von α -Teilchen bestrahlt und die Expression von Proteinen eines stressinduzierten Signalweges sowie die Bildung von Mikrokernen in unbestrahlten *Bystander*-Zellen gemessen. *Bystander*-Zellen zeigten nur dann eine Expression oder Mikrokern, wenn sie GJIC-profizient waren (Azzam et al. 1998, Azzam et al. 2001).

Es wird jedoch auch vermutet, dass die Kommunikation über das Zellkulturmedium ablaufen kann. Hinweise darauf geben *Bystander*-Studien, welche belegten, dass nicht geschädigte Zellen, welche Zellkulturmedium von geschädigten Zellen erhalten, ebenfalls DNA-Schäden entwickeln (Mothersill & Seymour 1997, 2001). Dies deutet darauf hin, dass das Medium Botenstoffe enthalten muss, die von den geschädigten Zellen abgegeben werden. Einer dieser möglichen Stoffe wäre Interleukin-8 (IL-8), ein Zytokin, welches in vielen verschiedenen Zelltypen als Antwort auf oxidativen Stress, wie er auch durch Strahlung hervorgerufen wird, hochreguliert wird (Narayanan et al. 1999). Die Effizienz der Reparatursysteme könnte somit auch durch einen Regulationsmechanismus modifiziert werden, welcher über Zellkommunikation gesteuert wird. Die Reparaturreffizienz würde auf diese Weise stufenweise hochreguliert, bis sie ab einer bestimmten Anzahl an Brüchen nicht weiter gesteigert werden kann. Dies würde auch erklären, warum in der vorliegenden Arbeit bis zu einer höheren Niedrigdosis (200 mGy *in vitro*)

die Reparatur in den Experimenten stufenweise besser wurde, und warum ab dieser Dosis hin zu höheren Dosen keine weitere sichtbare Steigerung der Reparatur mehr sichtbar war (z. B. in den *in vitro*-Daten der Patientengruppe I zwischen 100 und 500 mGy und bei Rothkamm et al. (2003) in den Fibroblastendaten zwischen 200 mGy und 2 Gy).

Ein weiterer Faktor, der eine wichtige Rolle bei der Reparatureffizienz spielen könnte, ist der oxidative Metabolismus in Zellen und hierbei die Bildung von *reactive oxygen species* (Reaktiven Sauerstoffspezies, ROS). Zu ROS gehören kurzlebige instabile Moleküle wie Superoxid-Anionen und Hydroxylradikale sowie andere Moleküle, welche eine relativ lange Lebenszeit besitzen und daher weit diffundieren können, hierzu gehören Hydrogenperoxid und Stickstoffmonoxid (Halliwell & Gutteridge 1986). Es ist bekannt, dass die zelluläre Konzentration an ROS eine wichtige Rolle bei verschiedensten zellulären Prozessen spielt. So kann eine Änderung des Redoxstatus oder der intrazellulären ROS-Konzentration die Regulation der meisten stressregulierenden Gene und die Zellwachstumsrate beeinflussen, die Expression spezifischer Gene induzieren und es hat einen Einfluss auf die Aktivität der Ionenkanäle (Azzam et al. 2003). Während Strahlung den wichtigsten exogenen Faktor für deren Produktion darstellt, bildet der oxidative Metabolismus die wichtigste endogene Quelle. Um zu überprüfen, ob eine Steigerung der intrazellulären ROS-Konzentration einen Einfluss auf die DSB-Reparatur nach einer niedrigen Röntgendosis hat, wurden in der vorliegenden Arbeit konfluente primäre WT-Fibroblasten vor der Bestrahlung mit einer Niedrigdosis mit H₂O₂ behandelt. Für die Behandlung wurde eine H₂O₂-Konzentration gewählt, die nach Messungen in der vorliegenden Arbeit keine DSBs erzeugte, von welcher jedoch angenommen werden kann, dass sie viele ESBs erzeugt. Hierbei zeigte sich, dass durch die Behandlung und die damit verbundene Erhöhung des oxidativen Stresses alle durch Strahlung induzierten DSBs repariert wurden, die Reparaturkapazität also besser wurde. Damit ist davon auszugehen, dass die Erhöhung des oxidativen Levels in der Zelle und die damit einhergehende Induktion von ESBs die Reparatur von DSBs stimuliert hat.

ESBs werden über die BER (Basen-Exzisions-Reparatur) repariert. Es wäre denkbar, dass die DSB-Reparatur residualer Brüche, die durch die Kernkomponenten des NHEJ nicht repariert werden, durch die Reparatur von ESBs wieder stimuliert wird. Dies könnte z. B. durch eine Interaktion der Reparaturkomponenten der BER mit Reparaturkomponenten des NHEJ-Reparaturweges passieren. Eine wichtige Komponente könnte in diesem Zusammenhang PARP-1 sein, ein nukleäres Enzym in höheren Eukaryoten, welches in vielen zellulären Prozessen, u.a. auch in der DNA-Reparatur, eine Rolle spielt. PARP-1 ist zusammen mit XRCC1, DNA-Ligaselll u.a. in die Reparatur von ESBs involviert (Frouin et al. 2003, Okano et al. 2003). Weiterhin spielt es eine Rolle bei der Entfernung von DNA-Schäden, welche während der Replikation in DSBs umgewandelt werden (Bryant et al. 2005, Farmer et al. 2005). Einige Studien gehen davon aus, dass es auch Teil eines eigenen NHEJ-Weges ist (das sogenannte *Back-up*-NHEJ = B-NHEJ), wenn die „klassischen“ Komponenten des D-NHEJ (D = *DNA-PK dependent*-NHEJ) wie DNA-PK_{CS}, Ku70/80,

LigIV oder XRCC4 ausfallen. Sofern also das D-NHEJ residuale Brüche nach niedrigen Dosen nicht mehr reparieren kann, könnte durch die ESB-Induktion PARP-1 als Teil des BER aktiviert werden und als mögliche Komponente eines vom NHEJ unabhängigen Reparaturweges an der Reparatur residualer DSBs beteiligt sein.

Diese Theorie ist konsistent damit, dass proliferierende Zellen sowohl keine residualen DSBs nach Bestrahlung als auch keine verminderte Reparaturkapazität nach niedrigen Dosen aufweisen. Eine mögliche Ursache hierfür kann in ihrem erhöhten oxidativen Metabolismus liegen. Um proliferieren zu können muss die Zelle ihren Energiemetabolismus anpassen, worin die Mitochondrien als Energiekraftwerke der Zellen involviert sind. Die einzelnen Parameter und Mechanismen hierfür sind besonders bei Tumorzellen gut verstanden, welche stark proliferierend sind (Reitzer et al. 1979, Moreadith & Lehninger 1984). Eine neuere Studie beschäftigte sich mit der Messung von durch γ -Strahlung induzierten DSBs mittels *Life Cell Imaging* (LCI) (Asaithamby & Chen 2009). Hierfür wurde eine Tumorzelllinie (HT1080) verwendet, welche stabil YFP-53BP1 (YFP = gekoppeltes *yellow fluorescent protein*) exprimiert. Auf diese Weise konnte die Induktion und Reparatur von einzelnen IR-induzierten DSBs verfolgt werden. Die Angaben der Autoren lassen schlussfolgern, dass sie proliferierende Zellen auswerteten. Dabei wurde festgestellt, dass die Reparaturkapazität nach höheren Dosen (500 mGy und 1 Gy) genau so effektiv war wie nach niedrigen (5, 10 und 50 mGy), und dass nach allen applizierten Dosen im Gegensatz zu Rothkamm & Lobrich (2003) sowie der vorliegenden Arbeit eine vollständige Reparatur der DSBs erfolgte. Diese Daten schließen nicht aus, dass die endogene Konzentration an ROS ein Faktor sein könnte, der die Reparatureffizienz beeinflusst.

Zusammengefasst bewirkte die Erhöhung des oxidativen Stresses in konfluenten WT-Fibroblasten vor Bestrahlung mit einer niedrigen Röntgendosis, dass alle induzierten DSBs repariert wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Bildung von ROS in der Zelle und/oder die damit einhergehenden DNA-Schäden wie ESBs dazu führen, dass die Reparatur residualer Foci stimuliert wird. Über die genaue Ursache, weshalb ein gewisses Maß an DSBs unrepariert verbleibt und warum die DSB-Reparaturkapazität nach niedrigen Dosen schlechter ist, kann letztlich nur spekuliert werden. Die Akkumulation von Schadenssignalfaktoren wie γ H2AX, 53BP1 und pATM in der vorliegenden Arbeit am Bruchort zeigt, dass residuale Brüche zumindest erkannt werden. Weshalb es nicht zur Reparatur oder zur Auflösung dieser Brüche kommt, bleibt weiterhin zu untersuchen. Hierbei stellt die Erforschung der Rolle des oxidativen Levels in den Zellen einen vielversprechenden Ansatzpunkt dar.

5.6 Ausblick

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von Kontrastmittel (KM) vor Röntgenbestrahlung zu einer sichtbaren Erhöhung der Anzahl an indu-

zierten DSBs führt. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die KM-Applikation zur Strahlenbelastung des Patienten beiträgt, was bei Röntgenuntersuchungen berücksichtigt werden muss. Deshalb gilt es bei der Anwendung von KM nicht nur wie bisher auf die Verträglichkeit zu achten, sondern auch darauf, deren Dosierung entsprechend dem eingesetzten Röntgengerät anzupassen, um eine unnötige Strahlenbelastung der Patienten zu vermeiden.

Weiterhin implizieren die Ergebnisse, dass die DSB-Reparaturkapazität mit zunehmendem Alter eines Organismus schlechter wird. Dies deckt sich zum einen mit Beobachtungen aus anderen Studien und zum anderen allgemein damit, dass Krebserkrankungen mit dem Alter an Häufigkeit zunehmen. Im Hinblick darauf, dass das Alter eines Patienten in der Röntgendiagnostik und der Strahlentherapie momentan nicht berücksichtigt wird, sollte das Reparaturverhalten im Alter nach Bestrahlung in weiteren Studien sowohl nach niedrigen als auch nach höheren Röntgendosen analysiert werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal beobachtet werden, dass nicht nur *in vitro* nach Bestrahlung humaner Zellen, sondern auch *in vivo* nach Bestrahlung von Mäusen mit niedriger werdender Dosis die DSB-Reparaturkapazität schlechter wird. Dies wirft ein neues Licht auf die Frage, ob das LNT-Modell das Krebsrisiko nach niedrigen Dosen IR unterschätzt. Da *in vivo* im Gegensatz zu *in vitro* nur eine Niedrigdosis getestet wurde, sollte die Reparaturkapazität *in vivo* noch abgestufter mit mehreren Röntgendosen gemessen werden.

Langfristig gilt es bei Untersuchungen von Niedrigdosen die Frage zu beantworten, welche Faktoren bei der Reparatur residualer Brüche eine Rolle spielen. Hierzu konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass das oxidative Level in der Zelle die DSB-Reparatur beeinflusst. Es sollten jedoch auch weitere Faktoren wie z. B. die Zell-Zell-Kommunikation in Betracht gezogen werden, da die Untersuchungen zum Auftreten von residualen DSBs in konfluenten Fibroblasten und in Gewebeverbänden durchgeführt wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung *in vitro* über mehrere Tage DSBs unrepariert verbleiben. *In vivo* ist die Datenlage für Reparaturzeiten, die über 24 h hinausgehen, noch nicht ausreichend, um daraus Schlüsse zu ziehen. Daher sollten weitere Experimente in diesen Dosisbereichen durchgeführt werden, die eine längere Reparaturzeit *in vivo* miteinschließen.

Weiterhin muss untersucht werden, welche Auswirkungen DSBs, die über längere Zeit unrepariert verbleiben, auf den Organismus haben. Demzufolge bliebe zu erforschen, ob diese DSBs beispielsweise zur Entstehung von chromosomalen Instabilitäten und letztlich zur Entartung von Zelle beitragen.

Abschließend sollte der Frage nachgegangen werden, welche Rolle *Non-targeted-Effekte* wie *Bystander-Effekt* oder *Adaptive Response* bei der Entstehung von genomischer Instabilität spielen, und ob diese einen Einfluss auf das potentielle Krebsrisiko nach Niedrigdosis-Bestrahlung haben.

6 Literaturverzeichnis

Internetquellen:

www.fe-lexikon.info/lexikon-e.htm#elektromagnetischewelle

www.kliniken.de/lexikon/Medizin/Diagnostik/Mikrobiologie/GC-Gehalt.html

www.rad.rwth-aachen.de/lernprogramm/grd.htm

[www.medicin.dk/\(jtblir55ihexf3jd1fr22345\)/show.aspx](http://www.medicin.dk/(jtblir55ihexf3jd1fr22345)/show.aspx)

Sonstige Quellen

- Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15:2177-2196
- Acilan C, Potter DM, Saunders WS (2007) DNA repair pathways involved in anaphase bridge formation. *Genes Chromosomes Cancer* 46:522-531
- Acworth IN, Bogdanov MB, McCabe DR, Beal MF (1999) Estimation of hydroxyl free radical levels in vivo based on liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol* 300:297-313
- Adams FH, Norman A, Bass D, Oku G (1978) Chromosome damage in infants and children after cardiac catheterization and angiocardiography. *Pediatrics* 62:312-316
- Adams KE, Medhurst AL, Dart DA, Lakin ND (2006) Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene* 25:3894-3904
- Albrecht A, Golebiowski M, Kornienko VN, Nikitin V, Palmers Y, Trzebicki J, Twarkowski P, Wegener R (1999) A double-blind, prospective, randomized, multicenter group comparison study of iopromide 240 vs iohexol 240 in myelography. *Eur Radiol* 9:1901-1908
- Annett K, Duggan O, Freeburn R, Hyland P, Pawelec G, Barnett Y (2005) An investigation of DNA mismatch repair capacity under normal culture conditions and under conditions of supra-physiological challenge in human CD4+T cell clones from donors of different ages. *Exp Gerontol* 40:976-981
- Araki R, Fujimori A, Hamatani K, Mita K, Saito T, Mori M, Fukumura R, Morimyo M, Muto M, Itoh M, Tatsumi K, Abe M (1997) Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2438-2443
- Arrington ED, Caldwell MC, Kumaravel TS, Lohani A, Joshi A, Evans MK, Chen HT, Nussenzweig A, Holbrook NJ, Gorospe M (2000) Enhanced sensitivity and long-term G2 arrest in hydrogen peroxide-treated Ku80-null cells are unrelated to DNA repair defects. *Free Radic Biol Med* 29:1166-1176
- Asaithamby A, Chen DJ (2009) Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res*
- Atamna H, Cheung I, Ames BN (2000) A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:686-691
- Azzam EI, de Toledo SM, Gooding T, Little JB (1998) Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res* 150:497-504

- Azzam EI, de Toledo SM, Little JB (2001) Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:473-478
- Azzam EI, de Toledo SM, Little JB (2003) Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene* 22:7050-7057
- Azzam EI, Raaphorst GP, Mitchel RE (1994) Radiation-induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastic transformation in C3H 10T1/2 mouse embryo cells. *Radiat Res* 138:S28-31
- Bach SP, Renehan AG, Potten CS (2000) Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 21:469-476
- Bae KT, Heiken JP, Brink JA (1998) Aortic and hepatic contrast medium enhancement at CT. Part II. Effect of reduced cardiac output in a porcine model. *Radiology* 207:657-662
- Bahar R, Hartmann CH, Rodriguez KA, Denny AD, Busuttill RA, Dolle ME, Calder RB, Chisholm GB, Pollock BH, Klein CA, Vijg J (2006) Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* 441:1011-1014
- Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281:1674-1677
- Barja G (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 27:595-600
- Barlow C, Hirotsumi S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D, Wynshaw-Boris A (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86:159-171
- Baumann P, Benson FE, West SC (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87:757-766
- Bedford JS, Goodhead DT (1989) Breakage of human interphase chromosomes by alpha particles and X-rays. *Int J Radiat Biol* 55:211-216
- Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J (2006) Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* 173:195-206
- Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P (2001) Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344:1750-1757
- Benson FE, Stasiak A, West SC (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *Embo J* 13:5764-5771
- Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA, Lobrich M ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double strand breaks in G2. *EMBO J*, in Press
- Biedermann KA, Sun JR, Giaccia AJ, Tosto LM, Brown JM (1991) scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1394-1397
- Birren BW, Lai E, Clark SM, Hood L, Simon MI (1988) Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. *Nucleic Acids Res* 16:7563-7582
- Blackwell TK, Malynn BA, Pollock RR, Ferrier P, Covey LR, Fulop GM, Phillips RA, Yancopoulos GD, Alt FW (1989) Isolation of scid pre-B cells that rearrange kappa light chain genes: formation of normal signal and abnormal coding joins. *Embo J* 8:735-742
- Blier PR, Griffith AJ, Craft J, Hardin JA (1993) Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J Biol Chem* 268:7594-7601
- Blocher D, Sigut D, Hannan MA (1991) Fibroblasts from ataxia telangiectasia (AT) and AT heterozygotes show an enhanced level of residual DNA double-strand breaks after low dose-rate gamma-irradiation as assayed by pulsed field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol* 60:791-802

- Blunt T, Gell D, Fox M, Taccioli GE, Lehmann AR, Jackson SP, Jeggo PA (1996) Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the scid mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10285-10290
- Bohndorf W, Richter J (1992) Computertomographie und Bestrahlungsplanung in der Radioonkologie.
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301:527-530
- Bosma GC, Davisson MT, Ruetsch NR, Sweet HO, Shultz LD, Bosma MJ (1989) The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics* 29:54-57
- Bourin M, Jolliet P, Ballereau F (1997) An overview of the clinical pharmacokinetics of x-ray contrast media. *Clin Pharmacokinet* 32:180-193
- Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, Lubin JH, Preston DL, Preston RJ, Puskin JS, Ron E, Sachs RK, Samet JM, Setlow RB, Zaider M (2003) Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13761-13766
- Bruzzone R, White TW, Goodenough DA (1996) The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays* 18:709-718
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434:913-917
- Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O, Plebani A, Stephan JL, Hufnagel M, le Deist F, Fischer A, Durandy A, de Villartay JP, Revy P (2006) Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124:287-299
- Bundesamt für Strahlenschutz (2007) Parlamentsbericht, Deutscher Bundestag. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung im Jahr 2006 Drucksache 16/6835
- Burma S, Chen BP, Chen DJ (2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 5:1042-1048
- Callisen HH, Norman A, Adams FH (1979) Absorbed dose in the presence of contrast agents during pediatric cardiac catheterization. *Med Phys* 6:504-509
- Calsou P, Delteil C, Frit P, Drouet J, Salles B (2003) Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment. *J Mol Biol* 326:93-103
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281:1677-1679
- Carle GF, Olson MV (1985) An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:3756-3760
- CBEIR (1990) Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. BEIR V
- Chen BP, Uematsu N, Kobayashi J, Lerenthal Y, Krempler A, Yajima H, Lohrich M, Shiloh Y, Chen DJ (2007) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J Biol Chem* 282:6582-6587
- Chen S, Inamdar KV, Pfeiffer P, Feldmann E, Hannah MF, Yu Y, Lee JW, Zhou T, Lees-Miller SP, Povirk LF (2001) Accurate in vitro end joining of a DNA double strand break with partially cohesive 3'-overhangs and 3'-phosphoglycolate termini: effect of Ku on repair fidelity. *J Biol Chem* 276:24323-24330
- Christiansen C, Pichler WJ, Skotland T (2000) Delayed allergy-like reactions to X-ray contrast media: mechanistic considerations. *Eur Radiol* 10:1965-1975
- Clement O, Robert P, Cuenod CA, Siauve N, Sobotka A, Kahn E, Fria G (2002) Functional imaging of tumors using CT and iodinated contrast media of different molecular weights. *Acad Radiol* 9 Suppl 1:S212-214

- Cochran ST, Khodadoust A, Norman A (1980) Cytogenetic effects of contrast material in patients undergoing excretory urography. *Radiology* 136:43-46
- Coller HA, Sang L, Roberts JM (2006) A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* 4:e83
- Constantinou A, Chen XB, McGowan CH, West SC (2002) Holliday junction resolution in human cells: two junction endonucleases with distinct substrate specificities. *Embo J* 21:5577-5585
- Corde S, Joubert A, Adam JF, Charvet AM, Le Bas JF, Esteve F, Elleaume H, Balosso J (2004) Synchrotron radiation-based experimental determination of the optimal energy for cell radiotoxicity enhancement following photoelectric effect on stable iodinated compounds. *Br J Cancer* 91:544-551
- Cornforth MN, Bedford JS (1993) Ionizing radiation damage and its early development in chromosomes. In: Lett JT, Sinclair WK, eds. *Advances in radiation biology - DNA and chromatin damage caused by radiation.*:423-496
- Costanzo V, Paull T, Gottesman M, Gautier J (2004) Mre11 assembles linear DNA fragments into DNA damage signaling complexes. *PLoS Biol* 2:E110
- Craig JM (2005) Heterochromatin--many flavours, common themes. *Bioessays* 27:17-28
- Crosnier C, Stamataki D, Lewis J (2006) Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 7:349-359
- Dahm-Daphi J, Sass C, Alberti W (2000) Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int J Radiat Biol* 76:67-75
- Dai Y, Kysela B, Hanakahi LA, Manolis K, Riballo E, Stumm M, Harville TO, West SC, Oettinger MA, Jeggo PA (2003) Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2462-2467
- Darroudi F, Fomina J, Meijers M, Natarajan AT (1998a) Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH. *Mutat Res* 404:55-65
- Darroudi F, Natarajan AT, Bentvelzen PA, Heidt PJ, Van Rotterdam A, Zoetelief J, Broerse JJ (1998b) Detection of total- and partial-body irradiation in a monkey model: a comparative study of chromosomal aberration, micronucleus and premature chromosome condensation assays. *Int J Radiat Biol* 74:207-215
- Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* 7:273-282
- Dawson P (2006) Functional imaging in CT. *Eur J Radiol* 60:331-340
- Degrassi F, Fiore M, Palitti F (2004) Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumour drugs. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4:317-325
- Dempsey JL, Pfeiffer M, Morley AA (1993) Effect of dietary restriction on in vivo somatic mutation in mice. *Mutat Res* 291:141-145
- DePinho RA (2000) The age of cancer. *Nature* 408:248-254
- Ding Q, Reddy YV, Wang W, Woods T, Douglas P, Ramsden DA, Lees-Miller SP, Meek K (2003) Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 23:5836-5848
- Dronkert ML, Beverloo HB, Johnson RD, Hoeijmakers JH, Jasin M, Kanaar R (2000) Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* 20:3147-3156
- Dropkin G (2007) Low dose radiation and cancer in A-bomb survivors: latency and non-linear dose-response in the 1950-90 mortality cohort. *Environ Health* 6:1
- Drouet J, Delteil C, Lefrancois J, Concannon P, Salles B, Calsou P (2005) DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 280:7060-7069
- Eigsti OJ, Dustin P (1955) Colchicine in Agriculture. *Medicine, Biology and Chemistry*:pp. 470
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825
- Elke M, Schmitt H, Felder E, Fröhlich JM (1992) Kontrastmittel in der radiologischen Diagnostik.

- Elkind M, Redpath J (1977) Molecular and cellular biology of radiation lethality. *Cancer, a Comprehensive Treatise* 6:51-99
- Elson A, Wang Y, Daugherty CJ, Morton CC, Zhou F, Campos-Torres J, Leder P (1996) Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13084-13089
- Falck J, Coates J, Jackson SP (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434:605-611
- Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J (2002) The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30:290-294
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434:917-921
- Feinendegen LE (2005) Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br J Radiol* 78:3-7
- Feldmann E, Schmiemann V, Goedecke W, Reichenberger S, Pfeiffer P (2000) DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res* 28:2585-2596
- Finette BA, Sullivan LM, O'Neill JP, Nicklas JA, Vacek PM, Albertini RJ (1994) Determination of hprt mutant frequencies in T-lymphocytes from a healthy pediatric population: statistical comparison between newborn, children and adult mutant frequencies, cloning efficiency and age. *Mutat Res* 308:223-231
- Fisher AE, Hohegger H, Takeda S, Caldecott KW (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol Cell Biol* 27:5597-5605
- Franco S, Alt FW, Manis JP (2006) Pathways that suppress programmed DNA breaks from progressing to chromosomal breaks and translocations. *DNA Repair (Amst)* 5:1030-1041
- Friedland W, Jacob P, Paretzke HG, Merzagora M, Ottolenghi A (1999) Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiat Environ Biophys* 38:39-47
- Frouin I, Maga G, Denegri M, Riva F, Savio M, Spadari S, Prospero E, Scovassi AI (2003) Human proliferating cell nuclear antigen, poly(ADP-ribose) polymerase-1, and p21waf1/cip1. A dynamic exchange of partners. *J Biol Chem* 278:39265-39268
- Fulop GM, Phillips RA (1990) The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* 347:479-482
- Gajendiran N, Tanaka K, Kumaravel TS, Kamada N (2001) Neutron-induced adaptive response studied in go human lymphocytes using the comet assay. *J Radiat Res (Tokyo)* 42:91-101
- Gallotti A, Uggeri F, Favilla A, Cabrini M, de Haen C (1994) The chemistry of iomeprol and physico-chemical properties of its aqueous solutions and pharmaceutical formulations. *Eur J Radiol* 18 Suppl 1:S1-12
- Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K (2000) ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 25:115-119
- Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K, et al. (1988) Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 336:577-580
- Geisel D, Heverhagen JT, Kalinowski M, Wagner HJ (2008) DNA double-strand breaks after percutaneous transluminal angioplasty. *Radiology* 248:852-859
- Gellert M (2002) V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71:101-132
- Glanzmann E, Riniker P (1950) [Essential lymphocytopenia; new clinical aspect of infant pathology.]. *Ann Paediatr* 175:1-32
- Glocker R, Macherauch E (1971) Röntgen- und Kernphysik für Mediziner und Biophysiker.

- Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Loblrich M, Jeggo PA (2008) ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* 31:167-177
- Goodhead DT (1989) The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int J Radiat Biol* 56:623-634
- Goodhead DT (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* 65:7-17
- Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C (2007) Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res* 35:7466-7474
- Gotoh E, Durante M (2006) Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. *J Cell Physiol* 209:297-304
- Gravel S, Chapman JR, Magill C, Jackson SP (2008) DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev* 22:2767-2772
- Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW (1997) Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8076-8081
- Gupta S, Rosenberg ME (2008) Do stem cells exist in the adult kidney? *Am J Nephrol* 28:607-613
- Hadnagy W, Stephan G, Kossel F (1982) Enhanced yield of chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes in vitro using contrast media in X-irradiation. *Mutat Res* 104:249-254
- Hall EJ (2003) The bystander effect. *Health Phys* 85:31-35
- Hall EJ, Giaccia AJ (2006) *Radiobiology for the Radiologist*. 6. Auflage
- Halliwell B, Gutteridge JM (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246:501-514
- Hamada N, Schettino G, Kashino G, Vaid M, Suzuki K, Kodama S, Vojnovic B, Folkard M, Watanabe M, Michael BD, Prise KM (2006) Histone H2AX phosphorylation in normal human cells irradiated with focused ultrasoft X rays: evidence for chromatin movement during repair. *Radiat Res* 166:31-38
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816
- Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 6:923-935
- Heyer WD, Ehmsen KT, Solinger JA (2003) Holliday junctions in the eukaryotic nucleus: resolution in sight? *Trends Biochem Sci* 28:548-557
- Hitzig WH, Biro Z, Bosch H, Huser HJ (1958) [Agammaglobulinemia & alymphocytosis with atrophy of lymphatic tissue.]. *Helv Paediatr Acta* 13:551-585
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374
- Holley WR, Chatterjee A (1996) Clusters of DNA induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. I. Theoretical modeling. *Radiat Res* 145:188-199
- Hsu HL, Yannone SM, Chen DJ (2002) Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA Repair (Amst)* 1:225-235
- Hu B, Wu L, Han W, Zhang L, Chen S, Xu A, Hei TK, Yu Z (2006) The time and spatial effects of bystander response in mammalian cells induced by low dose radiation. *Carcinogenesis* 27:245-251
- ICRP (1991) *Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*. Pergamon
- Iliakis G (1991) The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 13:641-648
- Ito M, Shibamoto Y, Ayakawa S, Tomita N, Sugie C, Ogino H (2007) Low-dose whole-body irradiation induced radioadaptive response in C57BL/6 mice. *J Radiat Res (Tokyo)* 48:455-460
- Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23:687-696

- Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, Jackson SP (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8:37-45
- Johnson RD, Jasin M (2001) Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 29:196-201
- Johnson RT, Rao PN (1970) Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 226:717-722
- Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I (2001) Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49:379-389
- Jordan MA, Thrower D, Wilson L (1992) Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci* 102 (Pt 3):401-416
- Joubert A, Biston MC, Boudou C, Ravanat JL, Brochard T, Charvet AM, Esteve F, Balosso J, Foray N (2005) Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: consequences for computed tomography therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:1486-1496
- Ju YJ, Lee KH, Park JE, Yi YS, Yun MY, Ham YH, Kim TJ, Choi HM, Han GJ, Lee JH, Lee J, Han JS, Lee KM, Park GH (2006) Decreased expression of DNA repair proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence. *Exp Mol Med* 38:686-693
- Kadyk LC, Hartwell LH (1992) Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 132:387-402
- Karran P (2000) DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 10:144-150
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ, Jr. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71:587-597
- Katayama H, Yamaguchi K, Kozuka T, Takashima T, Seez P, Matsuura K (1990) Adverse reactions to ionic and nonionic contrast media. A report from the Japanese Committee on the Safety of Contrast Media. *Radiology* 175:621-628
- Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Genik PC, Little JB, Bedford JS (2006) gamma-H2AX foci after low-dose-rate irradiation reveal atm haploinsufficiency in mice. *Radiat Res* 166:47-54
- Keeney S, Neale MJ (2006) Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans* 34:523-525
- Kegel P, Riballo E, Kuhne M, Jeggo PA, Lohrich M (2007) X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst)* 6:1692-1697
- Kendall GM, Muirhead CR, MacGibbon BH, O'Hagan JA, Conquest AJ, Goodill AA, Butland BK, Fell TP, Jackson DA, Webb MA, et al. (1992) Mortality and occupational exposure to radiation: first analysis of the National Registry for Radiation Workers. *Bmj* 304:220-225
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247-254
- Kiefer J, Kiefer I (2003) *Allgemeine Radiologie*. Parey Buchverlag 1. Auflage
- Kienker LJ, Shin EK, Meek K (2000) Both V(D)J recombination and radioresistance require DNA-PK kinase activity, though minimal levels suffice for V(D)J recombination. *Nucleic Acids Res* 28:2752-2761
- Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, Cuomo CA, Fried LM, Carter T, Oettinger MA, Brown JM (1995) DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 267:1178-1183
- Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB (2004) Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* 18:1423-1438
- Krause W, Schobel C, Press WR (1994) Preclinical testing of iopromide. 2nd communication: toxicological evaluation. *Arzneimittelforschung* 44:1275-1279

- Kuefner MA, Grudzinski S, Schwab SA, Wiederseiner M, Heckmann M, Bautz W, Loblrich M, Uder M (2009) DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures. *Invest Radiol* 44:440-446
- Küfner MA, Heinrich M, Bautz W, Uder M (2008) Empfehlungen zur Prophylaxe der Nebenwirkungen bei intravasaler Applikation jodhaltiger Kontrastmittel - Suggestions for prevention of adverse reactions after intravasal administration of iodinated contrast media. *Röntgenpraxis* 56:199-206
- Kuhne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Loblrich M (2004) A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res* 64:500-508
- Kurz EU, Lees-Miller SP (2004) DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* 3:889-900
- Labhart P (1999) Nonhomologous DNA end joining in cell-free systems. *Eur J Biochem* 265:849-861
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921
- Lewis SM (1994) The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol* 56:27-150
- Lieber MR, Hesse JE, Lewis S, Bosma GC, Rosenberg N, Mizuuchi K, Bosma MJ, Gellert M (1988) The defect in murine severe combined immune deficiency: joining of signal sequences but not coding segments in V(D)J recombination. *Cell* 55:7-16
- Lieberman M, Hanstee GA, Waller EK, Weissman IL, Sen-Majumdar A (1992) Unexpected effects of the severe combined immunodeficiency mutation on murine lymphomagenesis. *J Exp Med* 176:399-405

- Little JB, Azzam EI, de Toledo SM, Nagasawa H (2002) Bystander effects: intercellular transmission of radiation damage signals. *Radiat Prot Dosimetry* 99:159-162
- Lobrich M, Ipkeme S, Haub P, Weber KJ, Kiefer J (1993) DNA double-strand break induction in yeast by X-rays and alpha-particles measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol* 64:539-546
- Lobrich M, Jeggo PA (2005) Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair (Amst)* 4:749-759
- Lobrich M, Rief N, Kuhne 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* 102:8984-8989
- Lukas C, Bartek J, Lukas J (2005) Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny 'local' lesions pose great 'global' challenges. *Chromosoma* 114:146-154
- Lyndon B (2002) NASA Factsheet: Understanding Space Radiation.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108:781-794
- Maller J, Gautier J, Langan TA, Lohka MJ, Shenoy S, Shalloway D, Nurse P (1989) Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *J Cell Sci Suppl* 12:53-63
- Marples B (2004) Is low-dose hyper-radiosensitivity a measure of G2-phase cell radiosensitivity? *Cancer Metastasis Rev* 23:197-207
- Marples B, Wouters BG, Joiner MC (2003) An association between the radiation-induced arrest of G2-phase cells and low-dose hyper-radiosensitivity: a plausible underlying mechanism? *Radiat Res* 160:38-45
- Matsubara S, Suzuki S, Suzuki H, Kuwabara Y, Okano T (1982) Effects of contrast medium on radiation-induced chromosome aberrations. *Radiology* 144:295-301
- Matsudaira H, Ueno AM, Furuno I (1980) Iodine contrast medium sensitizes cultured mammalian cells to X rays but not to gamma rays. *Radiat Res* 84:144-148
- Mayer PJ, Lange CS, Bradley MO, Nichols WW (1989) Age-dependent decline in rejoining of X-ray-induced DNA double-strand breaks in normal human lymphocytes. *Mutat Res* 219:95-100
- Mayer PJ, Lange CS, Bradley MO, Nichols WW (1991) Gender differences in age-related decline in DNA double-strand break damage and repair in lymphocytes. *Ann Hum Biol* 18:405-415
- Mcllwraith MJ, Vaisman A, Liu Y, Fanning E, Woodgate R, West SC (2005) Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell* 20:783-792
- Meesungnoen J, Jay-Gerin JP, Filali-Mouhim A, Mankhetkorn S (2002) Low-energy electron penetration range in liquid water. *Radiat Res* 158:657-660
- Melchionna R, Chen XB, Blasina A, McGowan CH (2000) Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol* 2:762-765
- Mello Filho AC, Meneghini R (1984) In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochim Biophys Acta* 781:56-63
- Mohaghegh P, Karow JK, Brosh Jr RM, Jr., Bohr VA, Hickson ID (2001) The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res* 29:2843-2849
- Moreadith RW, Lehninger AL (1984) The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)+-dependent malic enzyme. *J Biol Chem* 259:6215-6221
- Moreno S, Hayles J, Nurse P (1989) Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell* 58:361-372
- Mori N, Matsumoto Y, Okumoto M, Suzuki N, Yamate J (2001) Variations in Prkdc encoding the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) and susceptibility to radiation-induced apoptosis and lymphomagenesis. *Oncogene* 20:3609-3619
- Mori N, Okumoto M, Morimoto J, Imai S, Matsuyama T, Takamori Y, Yagasaki O (1992) Genetic analysis of susceptibility to radiation-induced apoptosis of thymocytes in mice. *Int J Radiat Biol* 62:153-159

- Morneburg H (1995) Bildgebende Systeme für die medizinische Diagnostik. 3. Auflage
- Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, de Villartay JP (2001) Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105:177-186
- Mothersill C, Seymour C (1997) Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* 71:421-427
- Mothersill C, Seymour C (2001) Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat Res* 155:759-767
- Mozdarani H, Fadaei S (1998) Similar cytogenetic effects of sodium-meglumine diatrizoate and sodium-meglumine ioxithalamate in lymphocytes of patients undergoing brain CT scan. *Toxicol Lett* 98:25-30
- Munro TR (1970) The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res* 42:451-470
- Murnane JP (2006) Telomeres and chromosome instability. *DNA Repair (Amst)* 5:1082-1092
- Narayanan PK, LaRue KE, Goodwin EH, Lehnert BE (1999) Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells. *Radiat Res* 152:57-63
- NCRP (1991) Guidance on radiation Received in Space Activities: Report 98. Natl. Council Radiat. Prot.
- Nelms BE, Maser RS, MacKay JF, Lagally MG, Petrini JH (1998) In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* 280:590-592
- Niida H, Nakanishi M (2006) DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21:3-9
- Nikjoo H, Goodhead DT (1991) Track structure analysis illustrating the prominent role of low-energy electrons in radiobiological effects of low-LET radiations. *Phys Med Biol* 36:229-238
- Norman A, Adams FH, Riley RF (1978) Cytogenetic effects of contrast media and triiodobenzoic acid derivatives in human lymphocytes. *Radiology* 129:199-203
- Norman A, Cochran ST, Sayre JW (2001) Meta-analysis of increases in micronuclei in peripheral blood lymphocytes after angiography or excretory urography. *Radiat Res* 155:740-743
- Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D (1992) DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7:3-12
- Ojima M, Ban N, Kai M (2008) DNA double-strand breaks induced by very low X-ray doses are largely due to bystander effects. *Radiat Res* 170:365-371
- Okano S, Lan L, Caldecott KW, Mori T, Yasui A (2003) Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol* 23:3974-3981
- Okayasu R, Suetomi K, Yu Y, Silver A, Bedford JS, Cox R, Ullrich RL (2000) A deficiency in DNA repair and DNA-PKcs expression in the radiosensitive BALB/c mouse. *Cancer Res* 60:4342-4345
- Okumoto M, Mori N, Miyashita N, Moriwaki K, Imai S, Haga S, Hiroishi S, Takamori Y, Esaki K (1995) Radiation-induced lymphomas in MSM, (BALB/cHeA x MSM) F1 and (BALB/cHeA x STS/A) F1 hybrid mice. *Exp Anim* 44:43-48
- Okumoto M, Nishikawa R, Imai S, Hilgers J (1989) Resistance of STS/A mice to lymphoma induction by X-irradiation. *J Radiat Res (Tokyo)* 30:135-139
- Olive PL, Banath JP, Sinnott LT (2004) Phosphorylated histone H2AX in spheroids, tumors, and tissues of mice exposed to etoposide and 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,3-dioxide. *Cancer Res* 64:5363-5369
- Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 66:1039-1056
- Parvez Z, Korman M, Satokari K, Moncada R, Eklund R (1987) Induction of mitotic micronuclei by X-ray contrast media in human peripheral lymphocytes. *Mutat Res* 188:233-239
- Paull TT, Gellert M (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 1:969-979
- Perryman LE (2004) Molecular pathology of severe combined immunodeficiency in mice, horses, and dogs. *Vet Pathol* 41:95-100

- Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S, Obe G (2004) Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* 104:7-13
- Piechaud JF, Iserin L, Aggoun Y, Kachaner J, Skinningsrud K (1997) Iopentol (Imagopaque 300) compared with iopromide (Ultravist 300) in pediatric angiocardiology. A clinical trial assessing adverse events, ECG and diagnostic information. *Eur Radiol* 7 Suppl 4:S127-130
- Pierce DA, Preston DL (2000) Radiation-related cancer risks at low doses among atomic bomb survivors. *Radiat Res* 154:178-186
- Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WM (2003) Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol* 81:123-129
- Povirk LF (1996) DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat Res* 355:71-89
- Preston CR, Flores C, Engels WR (2006) Age-dependent usage of double-strand-break repair pathways. *Curr Biol* 16:2009-2015
- Preston RJ (2003) The LNT model is the best we can do--today. *J Radiol Prot* 23:263-268
- Prise KM, Belyakov OV, Folkard M, Michael BD (1998) Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int J Radiat Biol* 74:793-798
- Prokop M, van der Molen A (2003) Patient Preparation and Contrast Media Application. In: Prokop M, Galanski M (Hrsg) *Spiral and Multislice Computed Tomography of the Body*:83-108
- Qvarnstrom OF, Simonsson M, Johansson KA, Nyman J, Turesson I (2004) DNA double strand break quantification in skin biopsies. *Radiother Oncol* 72:311-317
- Rao VA, Fan AM, Meng L, Doe CF, North PS, Hickson ID, Pommier Y (2005) Phosphorylation of BLM, dissociation from topoisomerase IIIalpha, and colocalization with gamma-H2AX after topoisomerase I-induced replication damage. *Mol Cell Biol* 25:8925-8937
- Reddy YV, Ding Q, Lees-Miller SP, Meek K, Ramsden DA (2004) Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends. *J Biol Chem* 279:39408-39413
- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254:2669-2676
- Ren K, de Ortiz SP (2002) Non-homologous DNA end joining in the mature rat brain. *J Neurochem* 80:949-959
- Riballo E, Kuhne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Loblrich M (2004) A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell* 16:715-724
- Rieder CL, Palazzo RE (1992) Colcemid and the mitotic cycle. *J Cell Sci* 102 (Pt 3):387-392
- Riley PA (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65:27-33
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-916
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868
- Rooney S, Alt FW, Lombard D, Whitlow S, Eckersdorff M, Fleming J, Fugmann S, Ferguson DO, Schatz DG, Sekiguchi J (2003) Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J Exp Med* 197:553-565
- Rosati G (1994) Clinical pharmacology of iomeprol. *Eur J Radiol* 18 Suppl 1:S51-60
- Rothkamm K, Balroop S, Shekhdar J, Fernie P, Goh V (2007) Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure. *Radiology* 242:244-251
- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Loblrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23:5706-5715
- Rothkamm K, Loblrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5057-5062

- Rube CE, Dong X, Kuhne M, Fricke A, Kaestner L, Lipp P, Rube C (2008a) DNA double-strand break rejoining in complex normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72:1180-1187
- Rube CE, Grudzenski S, Kuhne M, Dong X, Rief N, Lobrich M, Rube C (2008b) DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* 14:6546-6555
- Sahin H, Bircan MK, Akay AF, Kuru AF (1998) Acute side effects of iopromide and diatrizoate in urography. *Acta Radiol* 39:734-735
- Saintigny Y, Makienko K, Swanson C, Emond MJ, Monnat RJ, Jr. (2002) Homologous recombination resolution defect in werner syndrome. *Mol Cell Biol* 22:6971-6978
- Santos Mello R, Callisen H, Winter J, Kagan AR, Norman A (1983) Radiation dose enhancement in tumors with iodine. *Med Phys* 10:75-78
- Sauer R (2003) *Strahlentherapie und Onkologie*. 4. Auflage
- Sawant SG, Randers-Pehrson G, Metting NF, Hall EJ (2001) Adaptive response and the bystander effect induced by radiation in C3H 10T(1/2) cells in culture. *Radiat Res* 156:177-180
- Schlegel BP, Jodelka FM, Nunez R (2006) BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation. *Cancer Res* 66:5181-5189
- Schuler W, Bosma MJ (1989) Nature of the scid defect: a defective VDJ recombinase system. *Curr Top Microbiol Immunol* 152:55-62
- Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75
- Sedelnikova OA, Horikawa I, Redon C, Nakamura A, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM (2008) Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging Cell* 7:89-100
- Seluanov A, Danek J, Hause N, Gorbunova V (2007) Changes in the level and distribution of Ku proteins during cellular senescence. *DNA Repair (Amst)* 6:1740-1748
- Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, Wilson JH, Gorbunova V (2004) DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7624-7629
- Seymour CB, Mothersill C (2000) Relative contribution of bystander and targeted cell killing to the low-dose region of the radiation dose-response curve. *Radiat Res* 153:508-511
- Shadley JD, Wiencke JK (1989) Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity. *Int J Radiat Biol* 56:107-118
- Shafer DA, Raviele AA, Dunbar VG, Click LA (1987) Increased chromosome damage in pediatric heart catheterization patients after diagnostic fluoroscopy and cineangiography. *Environ Mol Mutagen* 10:387-395
- Shao C, Furusawa Y, Aoki M, Ando K (2003) Role of gap junctional intercellular communication in radiation-induced bystander effects in human fibroblasts. *Radiat Res* 160:318-323
- Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3:155-168
- Shivji MK, Venkitaraman AR (2004) DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2. *DNA Repair (Amst)* 3:835-843
- Sipley JD, Menninger JC, Hartley KO, Ward DC, Jackson SP, Anderson CW (1995) Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7515-7519
- Smith GC, Jackson SP (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13:916-934
- Speck U (1999) X-ray contrast agent: physico chemical. *Textbook of contrast media*:35-45
- Stephan G, Hadnagy W (1981) Chromosomal aberrations in patients exposed to X-rays and contrast medium. *Eur J Radiol* 1:335-337
- Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM (1999) The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99:577-587

- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 64:2390-2396
- Stiff T, Reis C, Alderton GK, Woodbine L, O'Driscoll M, Jeggo PA (2005) Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *Embo J* 24:199-208
- Storer JB, Mitchell TJ, Fry RJ (1988) Extrapolation of the relative risk of radiogenic neoplasms across mouse strains and to man. *Radiat Res* 114:331-353
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123:1213-1226
- Stucki M, Jackson SP (2004) MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair (Amst)* 3:953-957
- Su TT (2006) Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu Rev Genet* 40:187-208
- Swift M (1990) Genetic aspects of ataxia-telangiectasia. *Immunodeficiency Rev* 2:67-81
- Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:630-670, table of contents
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 17:5497-5508
- Tapio S, Jacob V (2007) Radioadaptive response revisited. *Radiat Environ Biophys* 46:1-12
- Taylor AM (1978) Unrepaired DNA strand breaks in irradiated ataxia telangiectasia lymphocytes suggested from cytogenetic observations. *Mutat Res* 50:407-418
- Teebor GW, Boorstein RJ, Cadet J (1988) The reparability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review. *Int J Radiat Biol* 54:131-150
- Thompson LH, Schild D (2002) Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 509:49-78
- Thomsen HS, Dorph S (1993) High-osmolar and low-osmolar contrast media. An update on frequency of adverse drug reactions. *Acta Radiol* 34:205-209
- Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY, Sung P (1998) Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* 273:21447-21450
- UNSCEAR (2000) Sources and effects of ionizing radiation. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes No. E.00.IX.3
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J* 22:5612-5621
- Valerie K, Povirk LF (2003) Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22:5792-5812
- van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2:196-206
- van Heemst D, Brugmans L, Verkaik NS, van Gent DC (2004) End-joining of blunt DNA double-strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA-PK and XRCC4. *DNA Repair (Amst)* 3:43-50
- Venkat S, Apte SK, Chaubey RC, Chauhan PS (2001) Radioadaptive response in human lymphocytes in vitro. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20:165-175
- Vijg J (2000) Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutat Res* 447:117-135
- Vijg J, Dolle ME (2002) Large genome rearrangements as a primary cause of aging. *Mech Ageing Dev* 123:907-915
- von Zglinicki T (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27:339-344
- Vyjayanti VN, Rao KS (2006) DNA double strand break repair in brain: reduced NHEJ activity in aging rat neurons. *Neurosci Lett* 393:18-22
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412:607-614

- Ward IM, Minn K, Jorda KG, Chen J (2003) Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem* 278:19579-19582
- Ward JF (1990) The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int J Radiat Biol* 57:1141-1150
- Ward JF (1995) Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat Res* 142:362-368
- Ward JF, Blakely WF, Joner EI (1985) Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. *Radiat Res* 103:383-392
- Ward JF, Evans JW, Limoli CL, Calabro-Jones PM (1987) Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *Br J Cancer Suppl* 8:105-112
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562
- West SC (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:435-445
- Weterings E, van Gent DC (2004) The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst)* 3:1425-1435
- Wild C, Puig S (2003) Nicht-ionische Röntgenkontrastmittel - klinische Relevanz der Unterschiede verschiedener Kontrastmittel. Vorbereitungspapier für Konsensuskonferenz
- Wilson L, Panda D, Jordan MA (1999) Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Struct Funct* 24:329-335
- Wolff S (1998) The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 1:277-283
- Wu SM, Chien KR, Mummery C (2008) Origins and fates of cardiovascular progenitor cells. *Cell* 132:537-543
- Wykes SM, Piasentin E, Joiner MC, Wilson GD, Marples B (2006) Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks. *Radiat Res* 165:516-524
- Wyman C, Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 40:363-383

-
- Xu Y, Ashley T, Brainerd EE, Bronson RT, Meyn MS, Baltimore D (1996) Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev* 10:2411-2422
- Yano KI, Morotomi-Yano K, Akiyama H (2008) Cernunnos/XLF: A new player in DNA double-strand break repair. *Int J Biochem Cell Biol*
- Yonezawa M, Takeda A, Misonoh J (1990) Acquired radioresistance after low dose X-irradiation in mice. *J Radiat Res (Tokyo)* 31:256-262
- Yoo S, Dynan WS (1999) Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* 27:4679-4686
- You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* 25:5363-5379
- Yu Y, Okayasu R, Weil MM, Silver A, McCarthy M, Zabriskie R, Long S, Cox R, Ullrich RL (2001) Elevated breast cancer risk in irradiated BALB/c mice associates with unique functional polymorphism of the Prkdc (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) gene. *Cancer Res* 61:1820-1824
- Zhang Y, Zhou J, Cao X, Zhang Q, Lim CU, Ullrich RL, Bailey SM, Liber HL (2007) Partial deficiency of DNA-PKcs increases ionizing radiation-induced mutagenesis and telomere instability in human cells. *Cancer Lett* 250:63-73
- Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren CA, Vannais D, Hall EJ, Hei TK (2000) Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2099-2104
- Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, Lukas J, Bekker-Jensen S, Bartek J, Shiloh Y (2006) Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol* 8:870-876

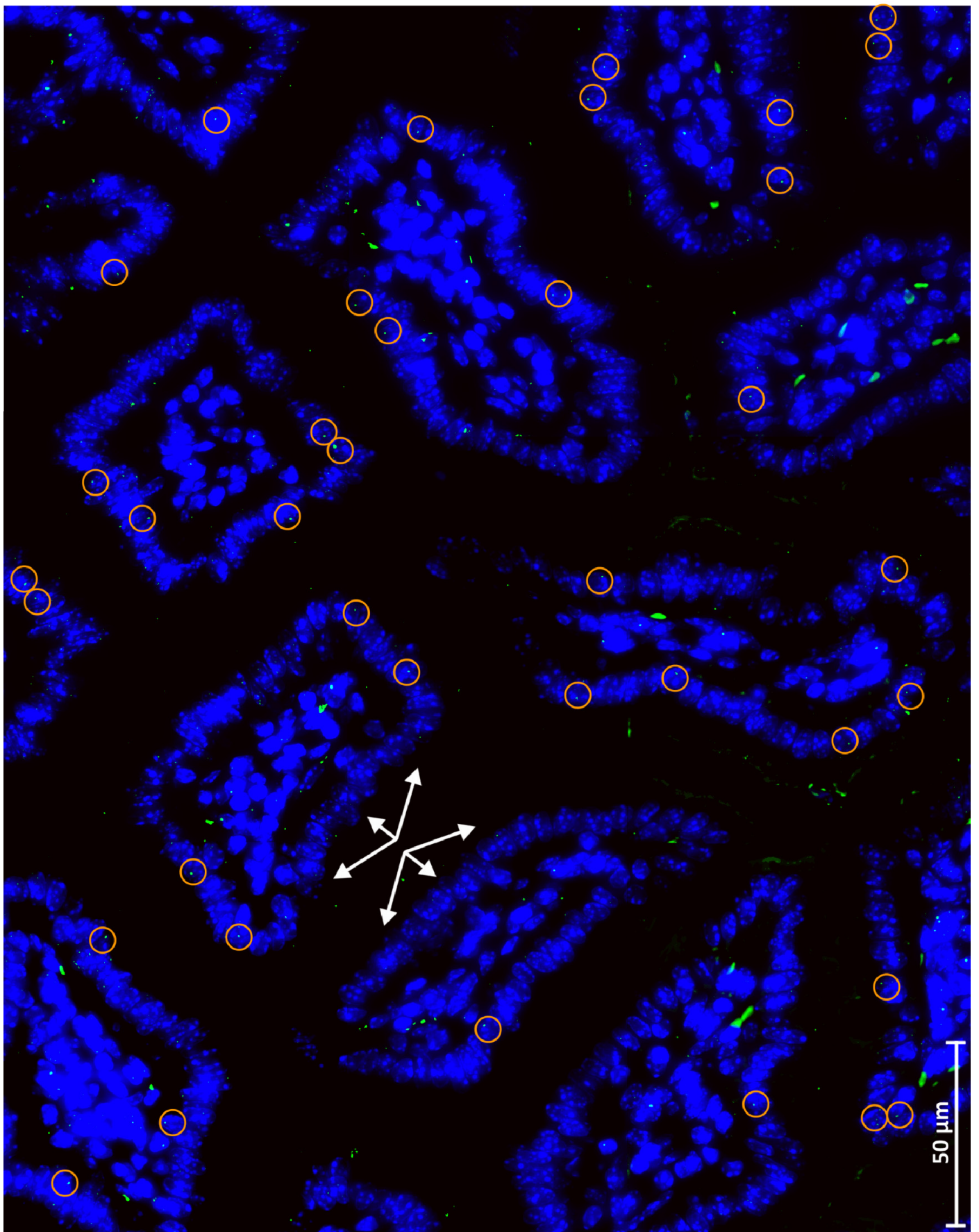
7 Anhang

Zu Kap. 4.4.2: Fluoreszenzfärbung größerer Gewebeschnitte des Dünndarms, des Herzens und der Niere nach Röntgenbestrahlung mit 10 mGy

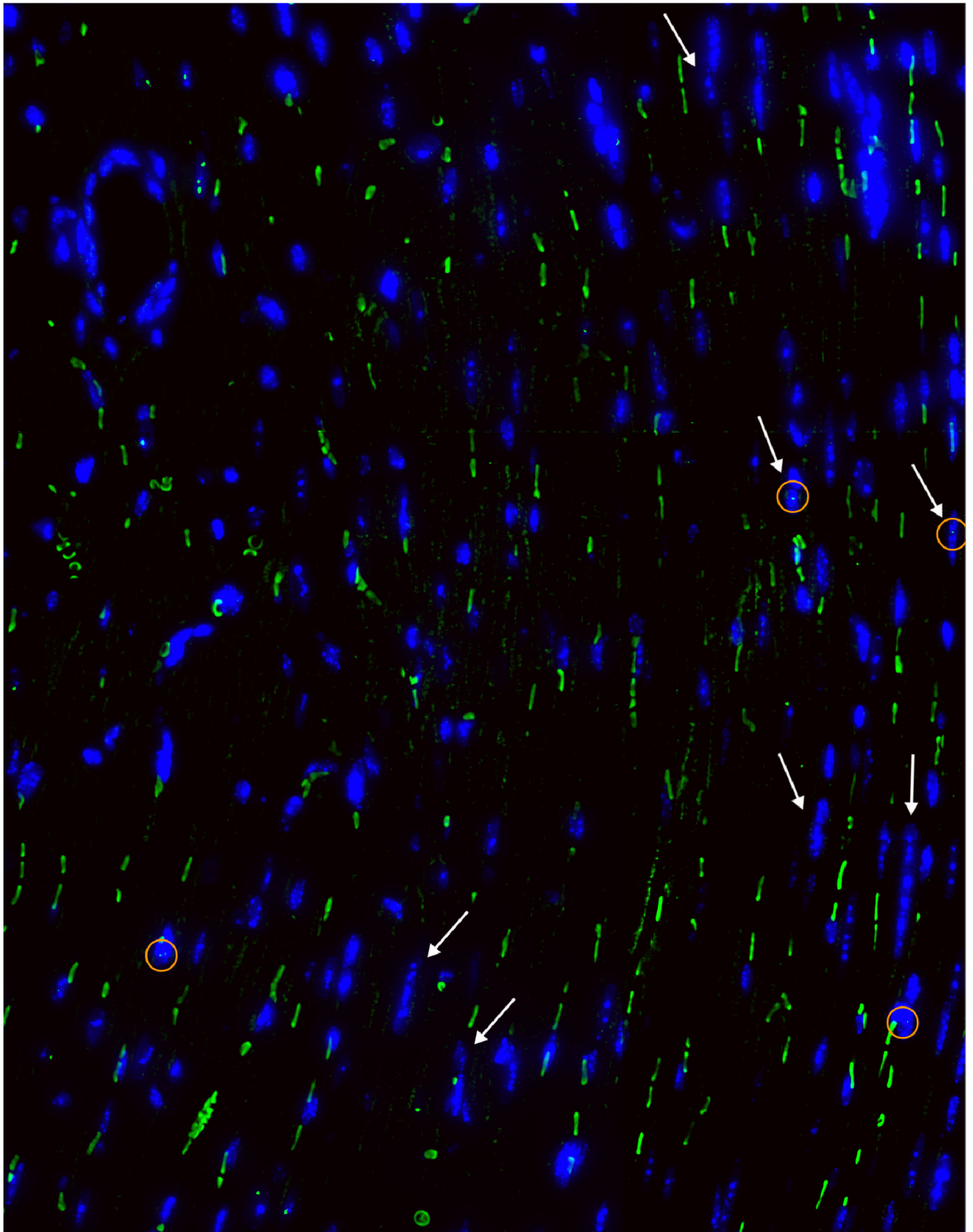
In den folgenden Bildausschnitten sind murine Gewebeschnitte der Niere dargestellt. Hierfür wurden WT-Mäuse (C57BL/6) an einem Linearbeschleuniger mit 6 MV-Röntgenstrahlung und einer Dosis von 10 mGy bestrahlt, der Dünndarm, das Herz und die Nieren entnommen und fixiert. Anschließend wurden die DSBs mittels IF-Färbung detektiert. Die DNA der Zellkerne wurde hierbei mit DAPI (blau) angefärbt. DSBs wurden mit 53BP1-Primärantikörper und FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper (grün) detektiert. Diese DSBs sind vereinzelt in den blauen Zellkernen als grüne Punkte sichtbar und wurden mit Kreisen markiert. Die Bildausschnitte bestehen aus neun Einzelbildfeldern, welche mit 630facher Vergrößerung aufgenommen wurden. Diese Einzelbildfelder bestehen wiederum aus mehreren Ebenen, welche übereinander gelagert und dekonvolviert wurden, sodass alle in den Zellkernen befindlichen Foci erfasst und klar dargestellt werden konnten. Auf den Aufnahmen befinden sich höchstens bis zu zwei Foci in einem Kern. Da in Gewebeschnitten das Problem besteht, dass unspezifische Bindungen außerhalb der Kernbereiche auftreten können, sind außerhalb der Kerne teilweise grüne unspezifisch angefärbte Gewebereiche zu erkennen.

Für die Niere sind jeweils drei Bildausschnitte dargestellt, da für dieses Organ auch Reparaturzeitpunkte und Kontrollschnitte gezeigt sind. Für den Dünndarm und das Herz ist jeweils nur ein Bildausschnitt gezeigt. Im Dünndarmschnitt sind Querschnitte von Villi der Mukosa zu sehen. Pfeile markieren den Saum aus Epithelzellen, welche für die Auswertung herangezogen wurden (Erster Bildausschnitt). In der Induktion sind in den Bildausschnitten des Dünndarms und der Niere zwischen 33 und 41 Foci pro Bildausschnitt zu erkennen. Im Herz sind es dagegen nur 5 Foci (Gekennzeichnet mit „10 mGy 10 min“). Dies liegt daran, dass im Herz in erster Linie längsgeschnittene Zellen aufgrund ihrer größeren Fläche Foci aufweisen (mit Pfeilen markiert) und außerdem wenige dieser Kerne pro Bildausschnitt vorhanden sind. In die Auswertung wurden nur die längsgeschnittenen Kerne einbezogen. Als Beispiel für einen Reparaturzeitpunkt wurde der 24 h-Punkt in der Niere gewählt (Gekennzeichnet mit „10 mGy 24 h“). Es ist zu erkennen, dass sich nach dieser Reparaturzeit die Anzahl an induzierten DSBs um ca. 50% auf 20 bis 22 Foci pro Bildausschnitt reduziert hat. Dies ist konsistent zu den 53BP1-Daten aus den Reparaturstudien in der Maus. Außer den bestrahlten Gewebeschnitten sind auch unbestrahlte Schnitte (Gekennzeichnet mit „Kontrolle“) der Niere dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass murines Gewebe wenige spontane Brüche aufweist, wodurch trotz der wenigen Foci, die 24 h nach Bestrahlung mit 10 mGy verbleiben, auf einen Blick ein bestrahlter von einem unbestrahlten Gewebeschnitt unterscheidbar ist.

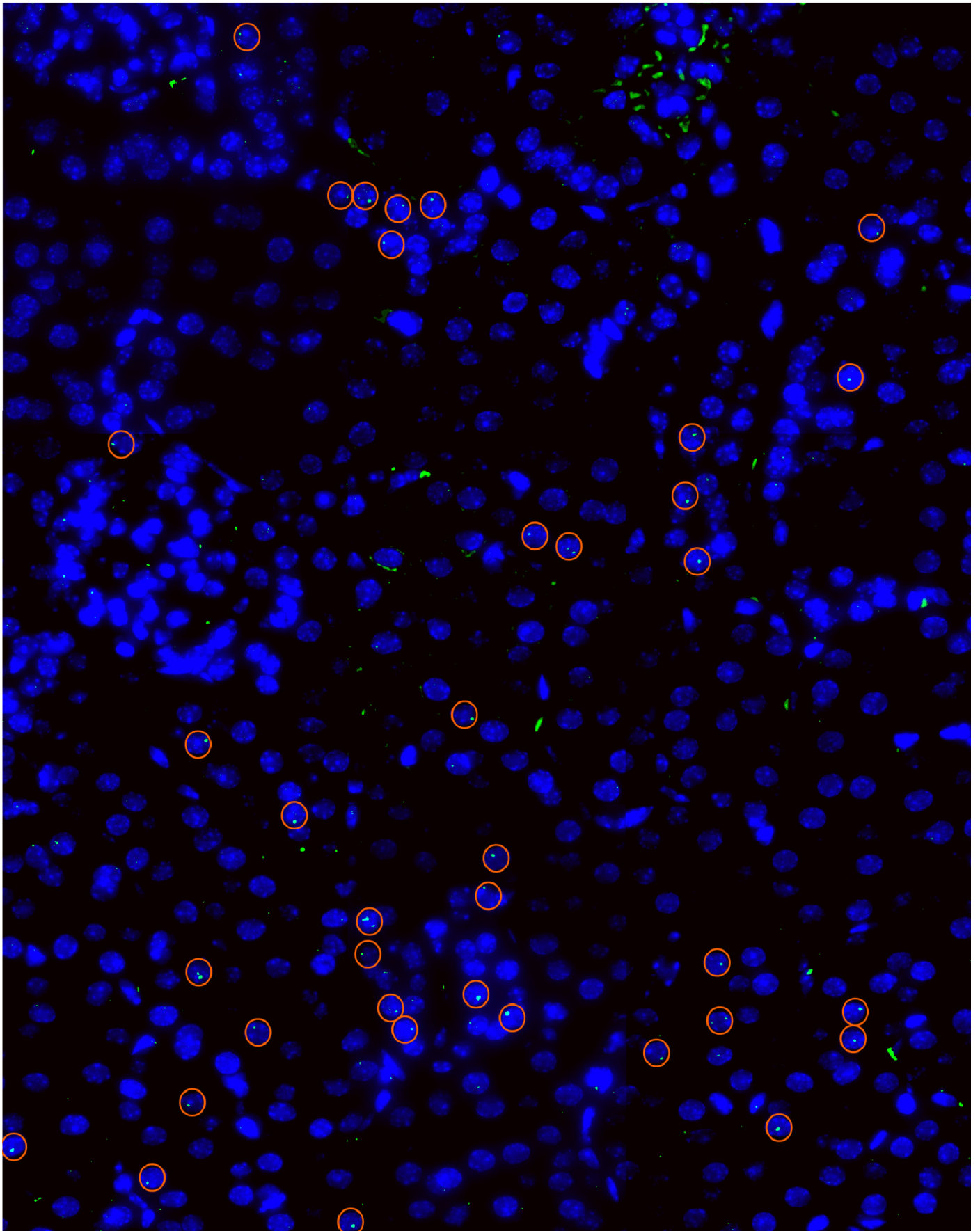
Dünndarm 10 mGy 10 min



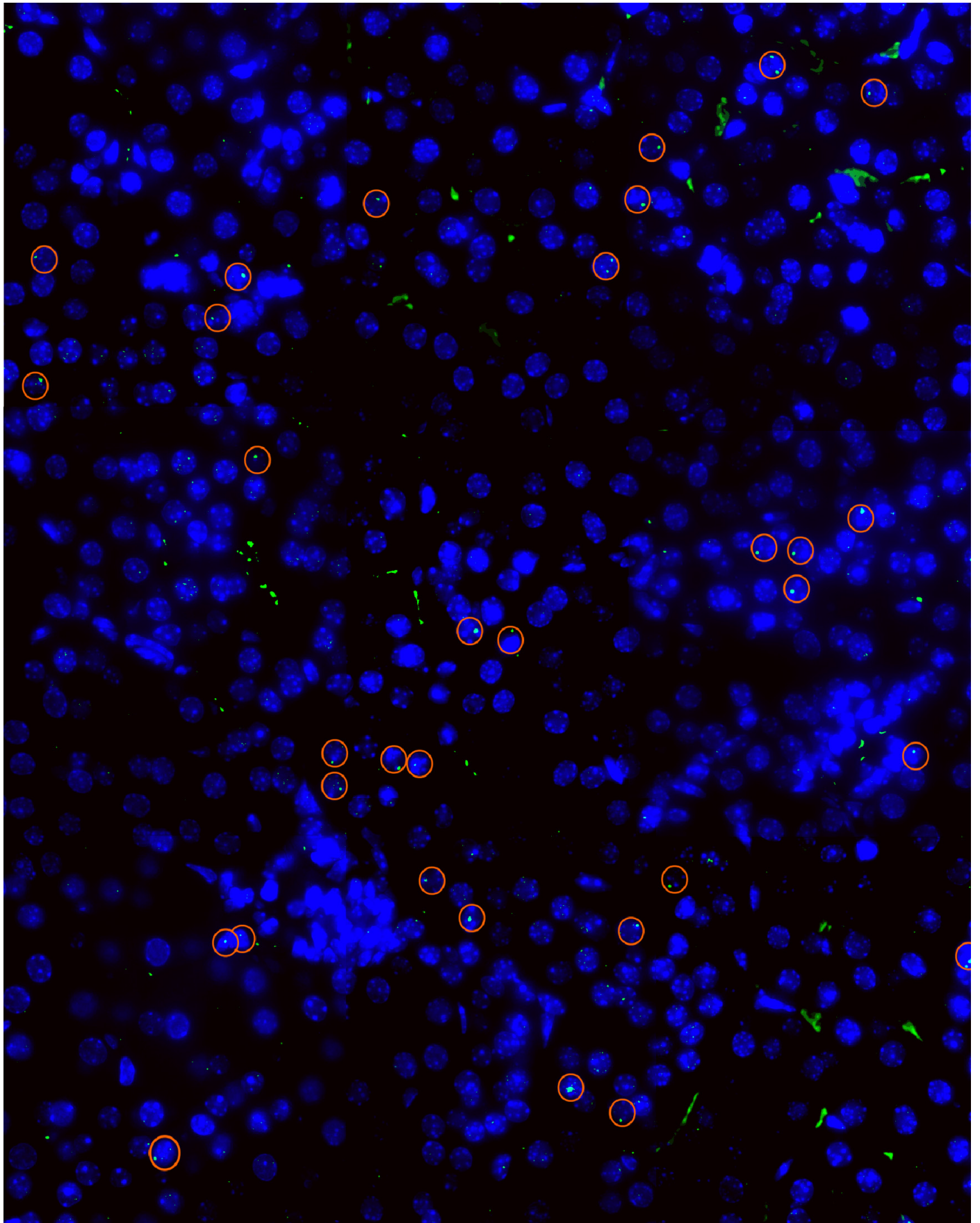
Herz 10 mGy 10 min



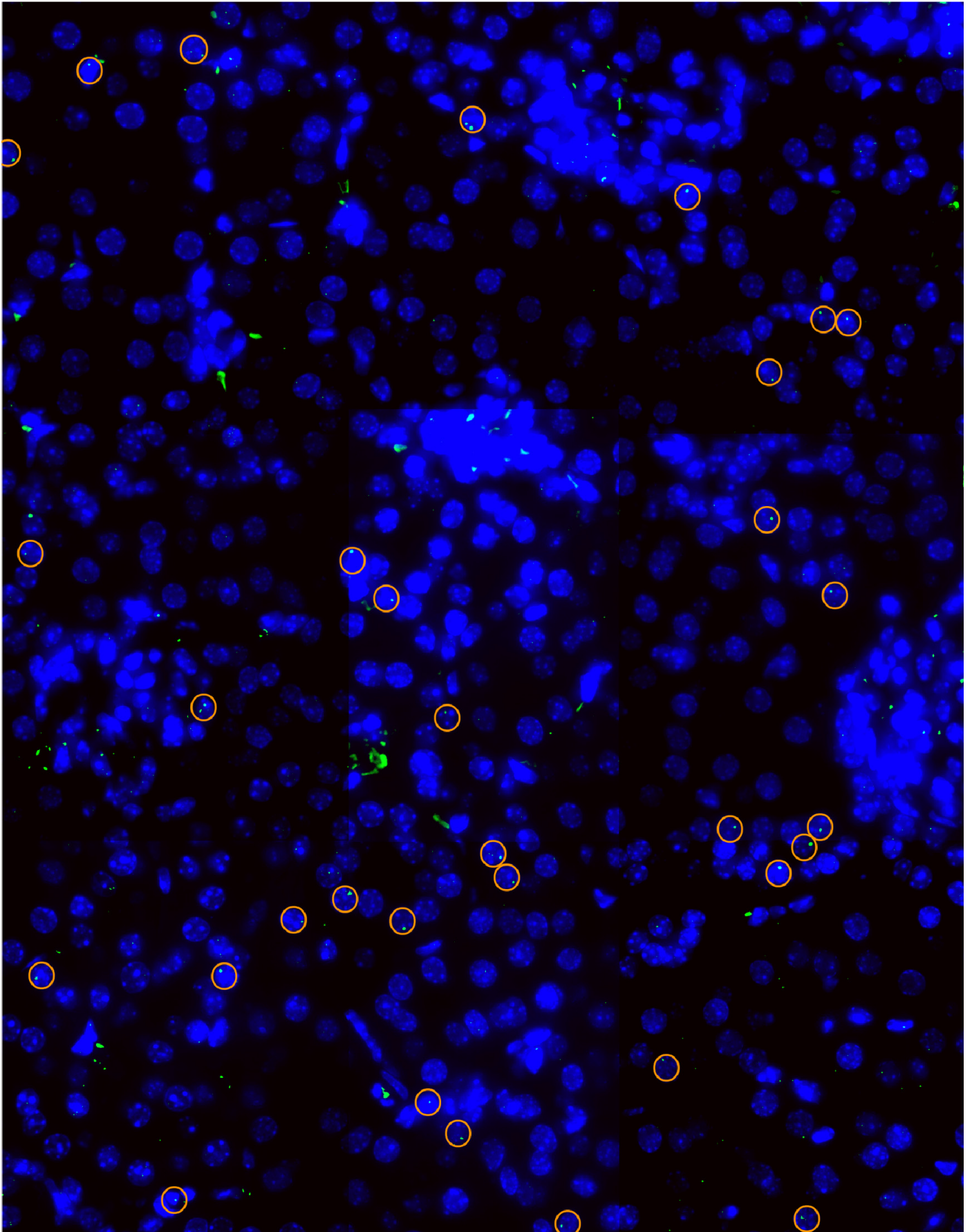
Niere 10 mGy 10 min, Bildausschnitt 1



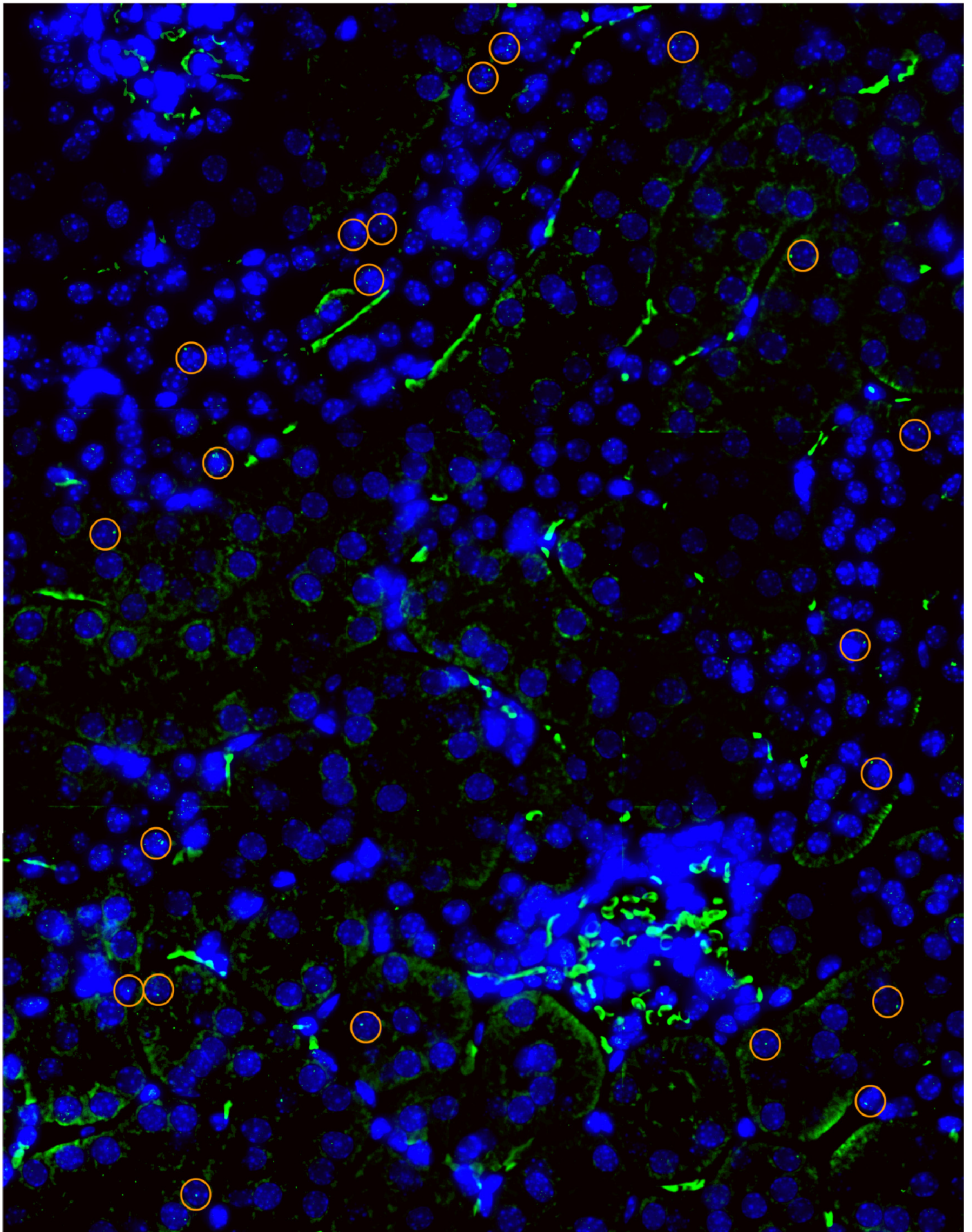
Niere 10 mGy 10 min, Bildausschnitt 2



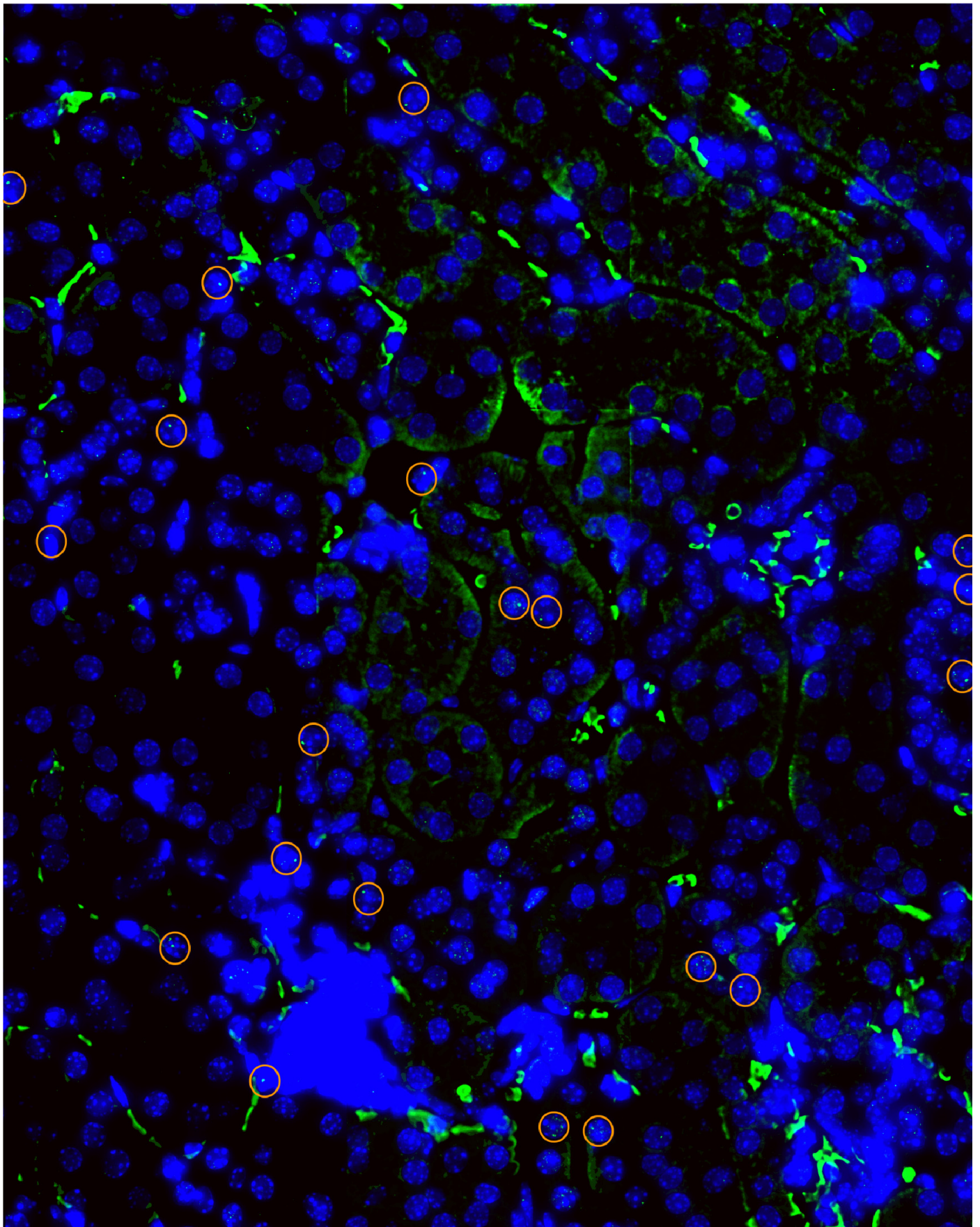
Niere 10 mGy 10 min, Bildausschnitt 3



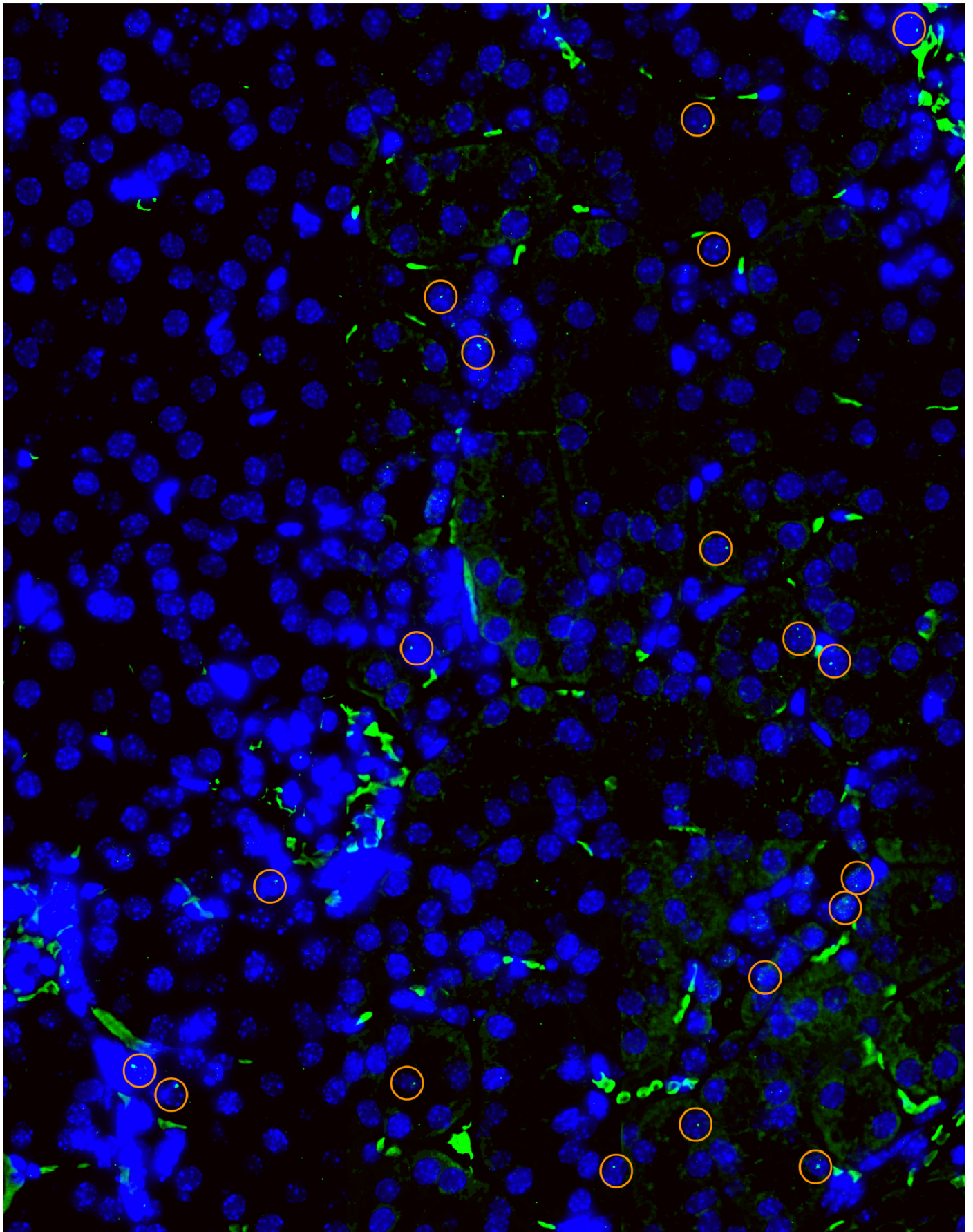
Niere 10 mGy 24 h, Bildausschnitt 1



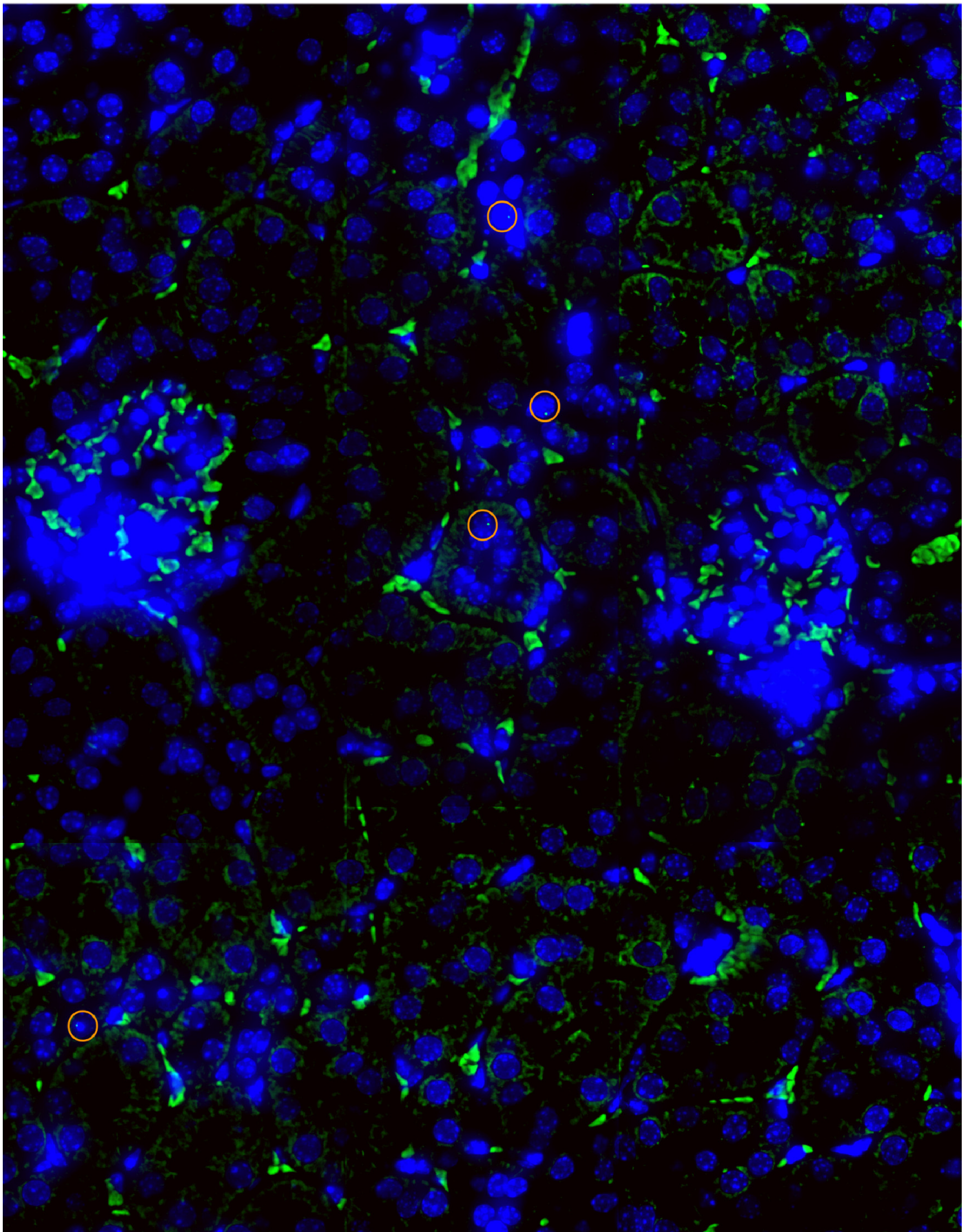
Niere 10 mGy 24 h, Bildausschnitt 2



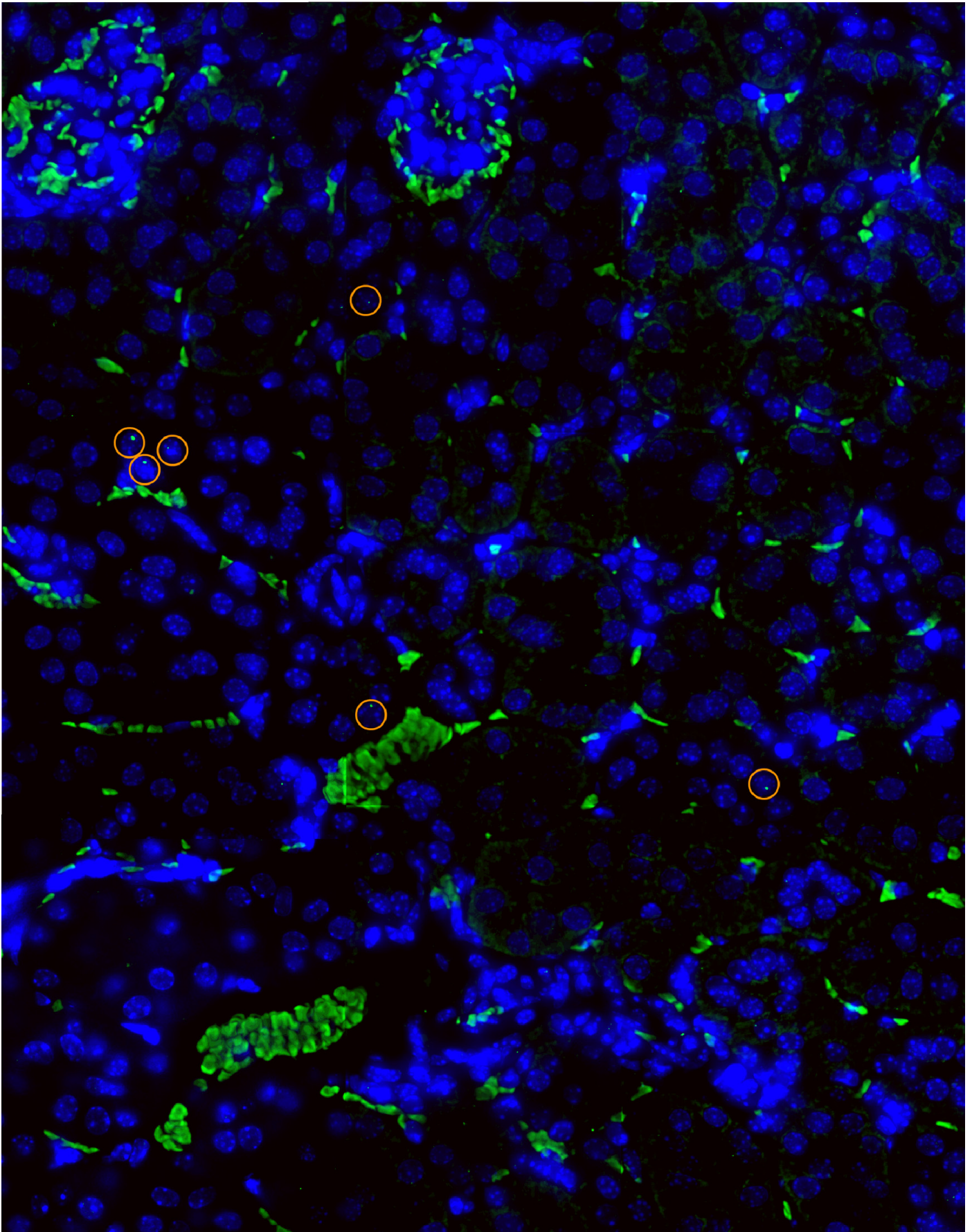
Niere 10 mGy 24 h, Bildausschnitt 3



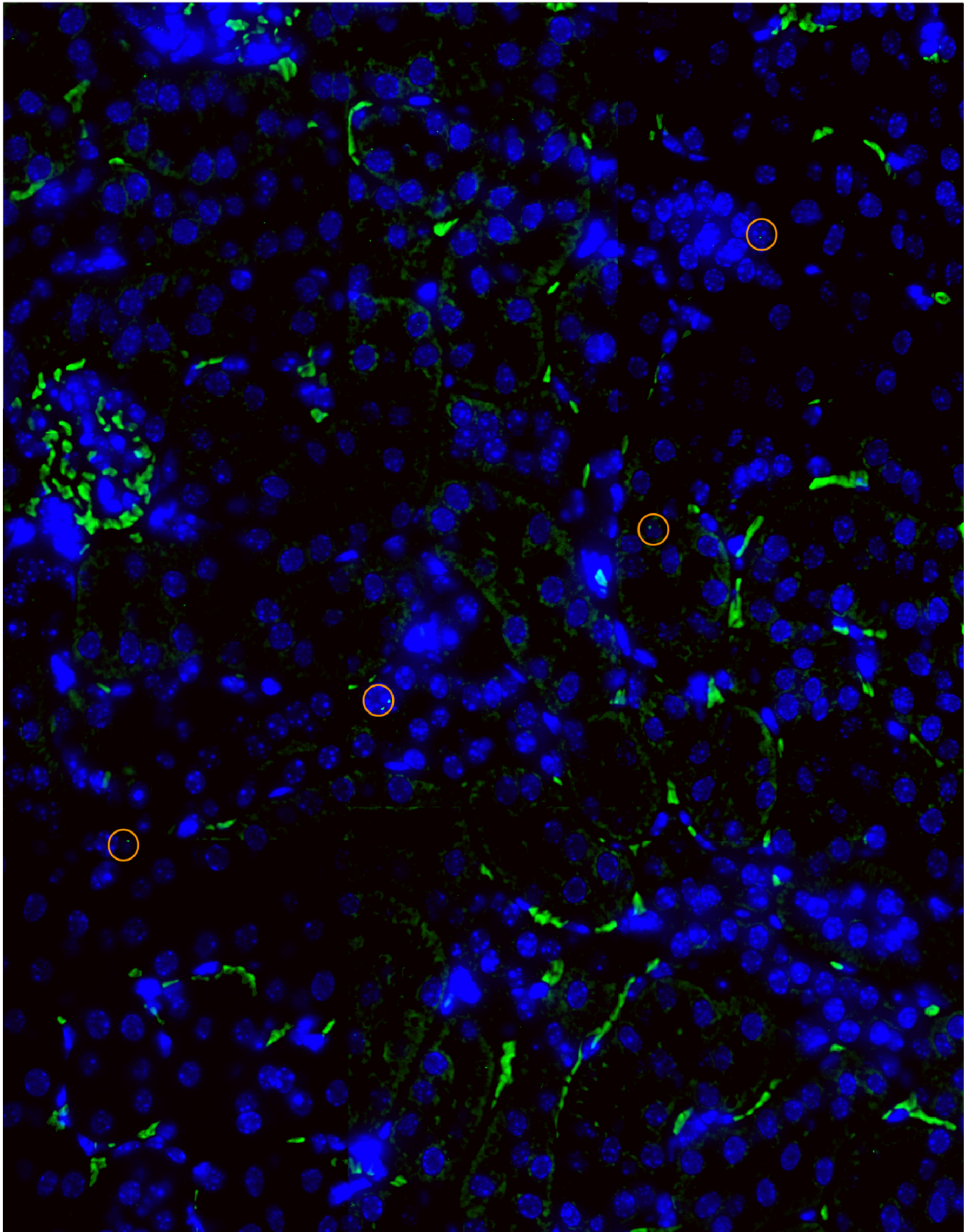
Niere Kontrolle, Bildausschnitt 1



Niere Kontrolle, Bildausschnitt 2



Niere Kontrolle, Bildausschnitt 3



8 Lebenslauf

Name: Saskia Grudzenski

Geburtsdatum: 06.08.1980

Geburtsort: Landau/Pfalz

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

August 1986-Juli 1990: Grundschule Esthal

August 1990-Juni 1999: Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Neustadt an der Weinstraße

Juli 1999 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Studium:

Oktober 1999–November 2004: Studium der Biologie an der Technischen Universität
Kaiserslautern

März 2004-November 2004 Diplomarbeit in der Abteilung Humanbiologie/-
genetik, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Heinrich Zankl

November 2004 Abschluss des Biologiestudiums mit Diplom

Beruflicher Werdegang:

15.03.2005-31.12.2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biophysik
der Universität des Saarlandes, Arbeitsgruppe Prof. Dr.
Markus Löbrich

01.01.2008-30.06.2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für
Strahlenbiologie und DNA-Reparatur der Technischen
Universität Darmstadt, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Markus
Löbrich

9 Publikationen, Auszeichnungen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Rübe CE, Grudzinski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rübe C.

DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 15; **14**(20):6546-55.

Raths A, Grudzinski S, Löbrich, M

DNA-Double-Strand Break Quantification and Localization in Mouse Tissues. *Radiation-Biophysics-04, GSI Scientific Report 2008*

Kuefner MA, Grudzinski S, Schwab SA, Azoulay S, Heckmann M, Heinrich MC, Loblrich M, Uder M. 2009

X-ray-induced DNA double-strand breaks after angiographic examinations of different anatomic regions. *Rofo.* **181**(4):374-80. Epub 2009 Mar 11. German.

Kuefner MA, Grudzinski S, Schwab SA, Wiederseiner M, Heckmann M, Bautz W, Loblrich M, Uder M.

DNA Double-Strand Breaks and Their Repair in Blood Lymphocytes of Patients Undergoing Angiographic Procedures. *Invest Radiol.* 2009 May 14. (Im Druck)

Grudzinski S, Kuefner MA, Heckmann MB, Uder M, Löbrich M

Contrast media enhance radiation damage caused by computed tomography examinations. *Radiology.* 2009 December; **256**(3) (in print).

Auszeichnungen und Tagungsbeiträge

Reisestipendium anlässlich der Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. GBS, Braunschweig 2006

Grudzinski S, Rief N, Kühne M, Uder M, Löbrich M (2006)

„Induktion und Reparatur von DSBs bei Computertomographieuntersuchungen mit Kontrastmittel“. Vortrag, 9. Jahrestagung 2006 der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. GBS, Braunschweig

Grudzenski S, Rief N, Heckmann M, Kufner M, Kühne M, Uder M, Löbrich M (2007)

“Induction and repair of DSBs after computed tomography examinations – the role of contrast media and age”. Posterpräsentation, 10th international Wolfsberg Meeting, Ermatingen, Schweiz

Reisestipendium anlässlich der Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. GBS, Tübingen 2008

Grudzenski S, Rube CE, Dong X, Kühne M, Löbrich M (2008)

„Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen *in vivo*“. Vortrag, 11. Jahrestagung 2008 der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. GBS, Tübingen

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die Möglichkeit, dieses spannende Thema im Rahmen einer Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Darüberhinaus danke ich ihm für seine stete Unterstützung und Förderung sowie für den anregenden Gedankenaustausch.

Prof. Dr. Gerhard Thiel danke ich für die bereitwillige Übernahme der Zweitberichterstattung zu dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer und Frau Prof. Dr. Barbara Drossel für die Bereitschaft, meine Arbeit zu prüfen.

Prof. Dr. Michael Uder und Dr. Michael Kufner gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit an einem interessanten medizinischen Projekt teilhaben zu dürfen, für die stete Hilfsbereitschaft in allen medizinischen Fragen und für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Christian Rube und Frau Dr. habil. Claudia Rube danke ich für die stete Kooperationsbereitschaft in unserem gemeinsamen Projekt.

Mein herzlichster Dank gilt Dr. Dorothee Deckbar für die schnelle und gewissenhafte Korrektur dieser Arbeit, die ständige Gesprächsbereitschaft und die wertvollen Anregungen.

Bei Dr. Martin Kühne bedanke ich mich sehr herzlich für die immerwährende Hilfsbereitschaft, das Korrekturlesen der physikalischen Themen und die fruchtbare Zusammenarbeit.

Dr. Nicole Rief danke ich für die Heranführung an die Materie, ihre Hilfsbereitschaft und dass sie immer ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Frau Roswitha Schepp danke ich ganz besonders für ihren unermüdlichen Einsatz zum Wohle der Arbeitsgruppe und die hervorragende technische Unterstützung.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die einzigartige freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die den Spaß an der Arbeit noch verstärkt hat!

Meinem Freund Michael danke ich sehr für die liebevolle Unterstützung über die ganzen Jahre und dass er sich soviel Zeit für Korrekturen genommen hat.

Zu Guter Letzt danke ich meiner Familie, die mir durch ihr wissenschaftliches Interesse die Augen für diese Berufsrichtung geöffnet und durch ihre immerwährende Unterstützung die Möglichkeit gegeben hat, meinen Weg zu gehen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Darmstadt, den

(Saskia Grudzenski)