
Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

***In vivo* Reparaturkapazität von DNA Doppelstrangbrüchen
männlicher Keimzellen und somatischer Zellen anhand
reparatur-profizienter und -defizienter Mausstämme nach
Bestrahlung**

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

vorgelegt von
Jan Tobias Oelmann
geboren am 06.08.1979 in Herten

**Wir haben Angst vor Veränderung.
Verzweifelt klammern wir uns an den Zweig,
der über dem reißenden Fluss hängt.
Das ist der Traum von der statischen Sicherheit.
Dynamische Sicherheit aber ist, was wir brauchen:
LOSLASSEN,
und mit dem reißenden Strom des Lebens schwimmen.**

Hermann Hesse

Inhaltsverzeichnis

1.	Literaturübersicht	8
1.1	Histologische Struktur und Funktion des Testisgewebes	8
1.2	Zellzyklus und Spermatogenese	10
1.2.1	Mitose	10
1.2.2	Meiose	13
1.2.3	Spermatogenese	16
1.2.4	Spermiogenese	18
1.3	DNA und Histone	20
1.3.1	Aufbau und Funktion der Histone	20
1.3.2	Vom Nukleosom zum Chromosom: Die höhere Ordnung der Chromatinstruktur innerhalb des Zellkerns	22
1.3.3	Histonmodulierung während der Spermiogenese	24
1.4	Grundlagen zur Entstehung von DNA Schäden und ihre Reparaturmechanismen	26
1.4.1	Physikalische Grundlagen	26
1.4.2	Strahlenchemische Wirkung	27
1.4.3	Biologische Strahlenwirkung	27
1.4.4	DNA Einzelstrangbrüche und Basenschäden	28
1.4.5	DNA Doppelstrangbrüche (DSB)	29
1.4.6	Reparaturmechanismen	30
1.4.7	Nicht-homologes End-Joining (NHEJ)	32
1.4.8	Homologe Rekombination (HR)	35
1.4.9	Phosphorylierung von H2AX (γ -H2AX)	37
2.	Material und Methoden	39
2.1	Tierhaltung	39
2.1.1	Verwendete Mausstämme	39
2.1.2	C57/BL6 Mäuse	39

2.1.3	BALB/c Mäuse	40
2.1.4	SCID (severe combined immunodeficiency) Mäuse	40
2.2	Bestrahlungsplanung und Durchführung	40
2.3	Bestrahlung	43
2.4	Gewebebegewinnung/Gewebeasservation und Lymphozytentrennung	44
2.5	γ -H2AX Immunfluoreszenzfärbung im Gewebe	46
2.6	γ -H2AX Immunfluoreszenzfärbung bei Blutlymphozyten	47
2.7	Erfassung der strahleninduzierten Doppelstrangbrüche mit der γ H2AX Methode	47
3.	Ergebnisse	48
3.1	Kontrollmessung anhand unbestrahlter Proben	48
3.2.	Dosiskorrelation nach Bestrahlung	49
3.3	DNA-Doppelstrangbruch Reparaturkinetik nach Bestrahlung	53
4.	Diskussion	58
4.1	Quantifizierung von DNA Doppelstrangbrüchen mit der γ -H2AX Methode	58
4.2	γ -H2AX – Grenzen der Immunofluoreszenz-Färbung	60
4.3	γ -H2AX im Kontext der Chromatinstruktur	61
4.4	Unterschiede in der DNA Reparaturkinetik zwischen reparatur- profizienten C57/BL6 und defizienten BALB/c und SCID Mäusen in männlichen Keimzellen und peripheren Lymphozyten	62
4.5	Unterschiedliche Expression von DNA Reparaturproteinen in männlichen Keimzellen	63
4.6	Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen in männlichen Keimzellen im Vergleich zu somatischen Zellen	66
4.7	Klinische Relevanz der Untersuchung	67

5 .	Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse	68
6.	Literatur	69
7.	Abkürzungsverzeichnis	80
8.	Abbildungsverzeichnis	82
9.	Tabellenverzeichnis	85
10.	Danksagung	86
11.	Lebenslauf	87

Summary

Purpose: Double-strand breaks (DSBs) are the most deleterious form of DNA damage after ionizing radiation and repair capacity of DSBs determines the radiosensitivity of the various cells in tissues. Tissues show different levels of radiosensitivity. In normal tissues, the repair of DSBs are differentially. The early response of DNA damage is associated with the phosphorylation of H2AX (γ -H2AX), and the visualization of γ -H2AX foci by immunofluorescence can be used to measure the induction and repair of radiation-induced DSBs *in vitro*. In the present study the γ -H2AX foci staining was established in normal tissues of DSB repair-proficient and repair-deficient mice, to evaluate if this staining is a precise index for the DSB repair *in vivo* and whether there are differences in the DSB repair kinetics between the different mouse strains.

Method: For DSB induction, testis tissue and lymphocytes of C57BL/6, BALB/c and SCID mice were analysed 10 min after whole body irradiation with 0.1 Gy, 0.5 Gy and 1.0 Gy. For DSB repair kinetics, testis tissue of repair-proficient (C57BL/6 mice) and repair-deficient mouse strains (BALB/c and SCID mice) were analyzed at 0.5 h, 2.5 h, 5 h, 24 h and 48 h after whole body irradiation with 2 Gy. γ -H2AX foci analysis was used to quantify DSBs foci and repair in testis tissue and lymphocytes of the different mouse strains.

Results: For DSB induction, we observed similar γ -H2AX foci levels with a linear dose correlation. Counting the loss of γ -H2AX foci allowed us to verify the different, DSB repair deficiencies, including the minor impairment of BALB/c mice. Repair-proficient C57BL/6 mice showed the fastest decrease in foci number within time, and displayed only low levels of residual damage at 24 h and 48 h after irradiation. In contrast, highly radiosensitive SCID mice showed highly increased γ -H2AX foci levels at all repair times (0.5 h to 48 h). Radiosensitive BALB/c mice showed slightly elevated foci numbers compared with C57BL/6 mice at 5 h, 24 h and 48 h after irradiation in testis.

Conclusion: Our results provide evidence that quantifying γ -H2AX foci in normal tissues represents a sensitive tool to analyze the induction and repair of radiation-induced DSBs at clinically relevant doses *in vivo*. γ -H2AX foci kinetics measured in testis were similar to kinetics in peripheral blood lymphocytes demonstrating that data obtained in blood samples can be used to screen for DSB repair deficiencies as predictor for clinical radiosensitivity.

Zusammenfassung

Ziel: DNA Doppelstrangbrüche (DSBs) sind die schädlichste Form von DNA-Schäden nach ionisierender Strahlung und die Reparaturkapazität bestimmt die Strahlenempfindlichkeit der unterschiedlichen Zellen im Gewebe. Gewebe zeigen unterschiedliche Empfindlichkeit unter der Radiotherapie. In Normalgeweben werden DSBs unterschiedlich repariert. Ein früher Schritt in der Antwort auf DNA Schäden ist die Phosphorylierung des Histons H2AX (γ H2AX). Es konnte gezeigt werden, dass γ -H2AX Foci verwendet werden können, um die Induktion und Reparatur von strahlungsinduzierten DSBs *in vitro* zu messen. In dieser Studie wurde die γ -H2AX Foci Färbung an Normalgeweben reparatur-kompetenten und reparatur-defizienten Mäusen etabliert, um zu evaluieren ob diese Färbung ein präziser Index für die DSB-Reparatur *in vivo* darstellt und ob es Unterschiede in der Reparaturkinetik zwischen den verschiedenen Mausstämmen gibt.

Methode: Für die DSB Induktion wurde Testisgewebe und Lymphozyten von C57BL/6, BALB/c und SCID Mäusen 10 min nach Ganzkörperbestrahlung mit 0,1 Gy, 0,5 Gy bzw. 1,0 Gy analysiert. Für die DSB-Reparatur Kinetik, wurde Testisgewebe Reparatur-profizienter (C57BL/6) und Reparatur-defizienter Maus-Stämme (BALB/c und SCID) bei 0,5 h, 2,5 h, 5 h, 24 h und 48 h nach Ganzkörperbestrahlung mit 2 Gy analysiert. γ H2AX Immunfluoreszenz-Analyse wurde verwendet, um DSBs Foci und Reparatur im Testisgewebe und peripheren Lymphozyten der verschiedenen Mausstämmen zu messen.

Ergebnisse: Für die DSB Induktion, beobachteten wir ähnliche Anzahl von γ -H2AX Foci mit einer linearen Dosiskorrelation. Die Abnahme von γ -H2AX Foci mit zunehmender Reperaturzeit erlaubt uns die verschiedenen DSB-Reparaturdefizite zu verifizieren. Reparatur-profizienten C57BL/6 Mäuse zeigten die schnellste Abnahme von γ -H2AX Foci mit der Zeit, und nur geringe Restschäden nach 24 und 48 h nach Bestrahlung. Im Gegensatz dazu, zeigten die sehr strahlensensitiven SCID-Mäuse stark erhöhte γ -H2AX Foci bei allen Reparaturzeiten (0,5 bis 48 h). Strahlensensitive BALB/c-Mäuse zeigten leicht erhöhte Foci Zahlen verglichen mit C57BL/6 Mäusen 5 h, 24 h und 48 h nach der Bestrahlung in der Testis.

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse belegen, dass die Quantifizierung von γ -H2AX Foci in verschiedenen Geweben eine empfindliche Methode für den Nachweis der Induktion und Reparatur von strahleninduzierten DSBs bei klinisch relevanten Dosen *in vivo* darstellt. Die Kinetiken von γ -H2AX Foci in Testis waren ähnlich der Kinetiken in peripheren Lymphozyten und zeigten, dass eine Blutprobe zum Screenen der DSB-Reparatur, und somit als Prädiktor für die klinische Strahlenempfindlichkeit, genutzt werden kann.

1. Literaturübersicht

1.1 Histologische Struktur und Funktion des Testisgewebes

Das Testisgewebe (siehe Abbildung 1) ist von einer Tunica albuginea, einer kollagenen, bindegeweblichen Kapsel umgeben, die mit einer Vielzahl glatter Muskelzellen ausgekleidet ist. Ebenso bilden bindegewebliche Septen, die sich mit der Tunica albuginea verbinden, das Stützgerüst der Testis. Ihre radikuläre Struktur beinhaltet unter anderem Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven. Durch die beschriebenen Septen wird die Testis in kleine, pyramidenförmige Läppchen, die sogenannten Lobuli testis, unterteilt. Sie beherbergen die stark aufgekäuerten Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti), die in ihrer Gesamtheit das Parenchym der Testis ausmacht. Die Tubuli seminiferi haben einen Durchmesser von ca. 200 µm und eine Länge von bis zu 50 cm. Jeder Tubulus bildet eine Schleife, die beiderseits mit der Rete testis, die sich als Verbindungsnetzwerk zwischen Testis und Epididymis befindet, in Verbindung steht.

Die histomorphologischen Strukturen der Tubuli seminiferi sind gekennzeichnet durch eine stetig zunehmende Differenzierung von den basalen bis zu den luminalen Anteilen. Basal gelegene Zellen, die Stammzellen, werden als Spermatogonien bezeichnet. Aus ihnen gehen die Spermatozyten 1. Ordnung hervor, die sich eine Ebene weiter lumenwärts befinden. Aus den Spermatozyten 1. Ordnung entstehen die Spermatozyten 2. Ordnung, die jedoch in histologischen Schnitten kaum zu finden sind, da ihre Interphase nur sehr kurz andauert und sie direkt in die 2. Reifeteilung übergehen. Aus der letzten Teilung der Spermatozyten 2. Ordnung entstehen folglich zuerst die runden Spermatiden, die sich zu Spermatozoen ausdifferenzieren.

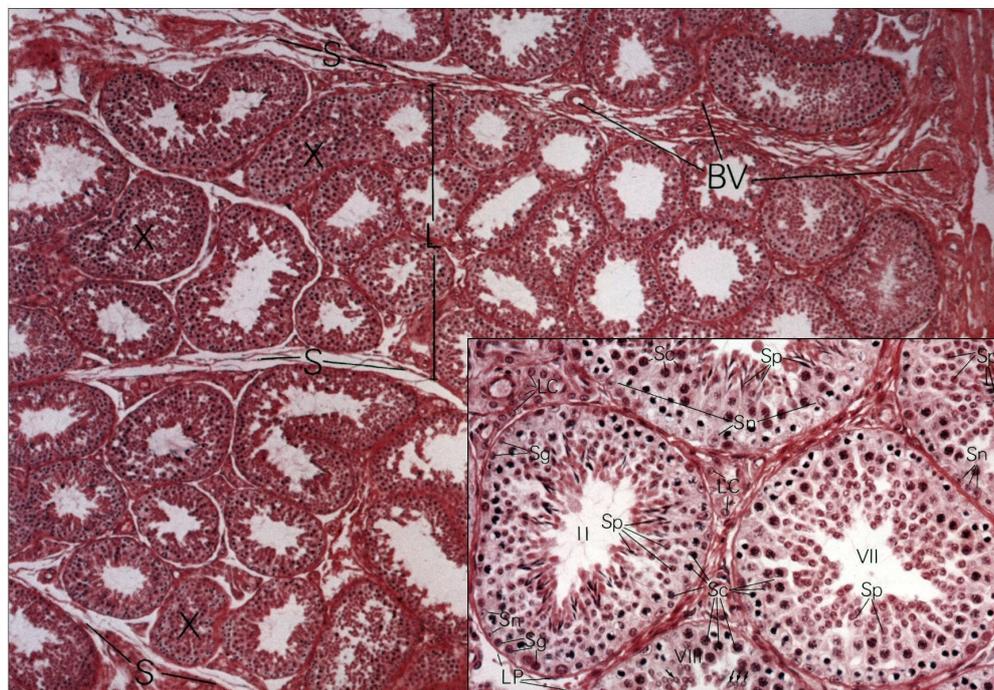


Abbildung 1: S: Septen, Sg: Spermatogonien, Sp: Spermatozyten 1.Ordnung X: Tubuli seminiferi contorti, BV: Blutgefäße; Ross, Rohen, Lütjen-Drecol, Kaye (eds) (1995) Atlas der Histologie. Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden

Das Tubulusepithel enthält neben den Keimzellen noch so genannte Sertoli-Zellen, die den gesamten Tubulus auskleiden. Es handelt sich hierbei um nicht-proliferative Zellen, die sowohl eine ernährnde als auch eine stützende Funktion für die Keimzellen aufweisen. Sie sind außerdem zur Phagozytose befähigt. Sämtliche Tubuli seminiferi werden von einer Schicht myoepithelialer Zellen umgeben, der Lamina propria, die ähnlich wie glatte Muskelzellen die Fähigkeit zur Kontraktion besitzen. Dadurch laufen Wellen von Kontraktionen über die Tubuli seminiferi und transportieren die noch unbeweglichen Spermatozoen in die Epididymis. Im Zwischengewebe liegen als epitheloide Zellhaufen die Leydig-Zellen (Sn), die für die Produktion des Testosterons unabdingbar sind und bereits während der Entwicklung des Hodens nachweisbar sind. Bis zum Ende der Embryonalzeit sind die Leydig-Zellen bereits voll ausdifferenziert und synthetisieren schon in dieser Zeit Testosteron.

1.2 Zellzyklus und Spermatogenese

1.2.1 Mitose

Der Zellzyklus proliferierender somatischer Zellen wird in verschiedene Phasen unterteilt (siehe Abbildung 2) und beginnt mit der Interphase, die sich aus der Gap 1-Phase (G_1 -Phase), der Synthese-Phase (S-Phase) und der Gap 2-Phase (G_2 -Phase) zusammensetzt. Während der Interphase sind die Chromosomen lichtmikroskopisch nicht sichtbar. Sie sind in einem lockeren DNA-Histon-Komplex, dem so genannten Chromatin, verpackt.

Die G_1 -Phase steht in der Regel für die RNA-Synthese, Proteinsynthese und für die der Histone. Es gibt eine große Variabilität in der zeitlichen Dauer der G_1 -Phase. In den meisten schnell proliferativen Geweben, zu denen auch der Hoden gehört, ist die G_1 -Phase kürzer als die S-Phase.

Manche Zellen werden in ihrer Proliferation gehemmt und gehen in die G_0 -Phase über, eine Art Ruhephase, aus der sie nur durch spezifische Reize wieder in die G_1 -Phase überführt werden können. Neben der Neusynthese von Tochterzentriolen kurz vor dem Beginn der S-Phase, nimmt in dieser Phase die RNA- und Proteinsynthese stetig ab. Die S-Phase ist die Periode, in der Synthese und Verdoppelung der DNA im Nukleus stattfindet. Die letzte Periode vor der Mitose wird als G_2 -Phase beschrieben. Auch hier sind zeitliche Variationen möglich, dennoch ist diese Phase, im Gegenteil zu den anderen Phasen, relativ kurz. In der G_2 -Phase wird die vorher heruntergefahrte RNA- und Proteinsynthese wieder angefahren.

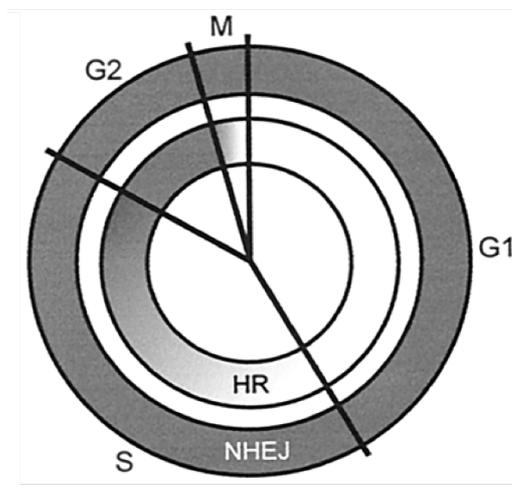


Abbildung 2: schematisches Modell des Zellzyklus und der Reparaturmechanismen im Laufe des Zellzyklus (Rothkamm et al., 2003).

Aus den auseinanderrückenden Zentriolen entsteht der Spindelapparat, der die Mikrotubuli ausbildet.

Auch die nächste Phase, die Mitose, wird in mehrere Abschnitte unterteilt, bestehend aus Prophase, (Pro-)Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese (Abbildung 3). Eine Dedifferenzierung der Zelle geht mit dem Beginn der Prophase einher, die sich in der Mitose fortsetzt. Eines der charakteristischen Merkmale für die Prophase ist aber, dass einerseits die Nucleoli im Zellkern verschwinden und andererseits die Chromatinfäden zu abgrenzbaren Chromosomen kondensieren und damit lichtmikroskopisch sichtbar werden. In der späten Prophase, auch Prometaphase genannt, entsteht nach Auflösung der Kernmembran die Mitosespindel. Diese Spindel besteht aus Mikrotubuli, die sich mit den Mikrotubuli der Gegenseite und den Zentromerenregionen der Chromosomen verzahnen. Die Anordnung der Chromosomen in die Äquatorialebene läutet die Metaphase der Mitose ein. Im weiteren Verlauf beginnen die Chromosomen sich in die jeweilige Richtung der Pole zu biegen. Hierbei entsteht das Bild eines so genannten Monasters.

Die Teilung der Chromosomen wird durch die Anaphase eingeleitet und in eine frühe und späte Phase eingeteilt. Der Unterschied zwischen der frühen und der späten Anaphase besteht in der Ausbildung einer so genannten Teilungsfuge und dem Trennen der Schwesterchromatiden.

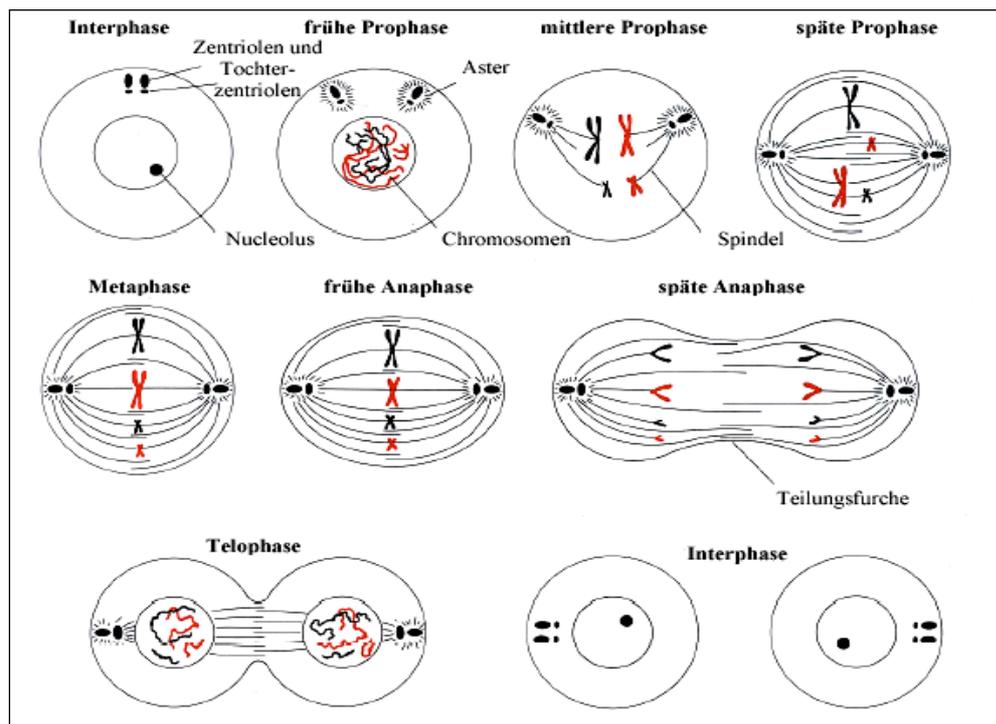


Abbildung 3: Mitose (Darnell et al., 1986)

Mit Abschluss der späten Anaphase sind die Chromosomen zu den jeweiligen Polkörperchen mit Hilfe der Mikrotubuli gewandert. Damit wurde der Übergang in die nächste Phase eingeleitet. Die anschließende letzte Phase der Mitose wird als Telophase bezeichnet und in ihr wird zunächst der noch bestehende Spindelapparat aufgelöst. Die Chromosomen werden dann decondensiert und es bilden sich zwei neue Kernmembranen aus. Mit Beendigung der Telophase gilt die Zelle als geteilt.

Die Zellmembranen haben sich komplett geschlossen. Die zwei neuen Zellen gehen jetzt wieder in die G_1 bzw. G_0 Phase über.

1.2.2 Meiose

Die Halbierung des vorhandenen Chromosomensatzes ist Ziel der Meiose. Durch zwei Zellteilungen entstehen aus einer Zelle mit diploidem Chromosomensatz vier Zellen mit haploidem Chromosomensatz. Die Meiose ist ein Prozess, der nur bei Ei- und Samenzellen vorkommt. Im Gegensatz zu der vorher besprochenen mitotischen Teilung ist die meiotische Teilung ein komplexerer Prozess, der sich in einigen Abschnitten von der mitotischen Teilung unterscheidet. Die Meiose wird, wie die Mitose, in vier Phasen unterteilt, die wiederum Subphasen aufweisen. Die erste Zellteilung wird durch die Prophase 1 eingeleitet. Sie wird wiederum in fünf Subphasen unterteilt: Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese.

Im Leptotän kondensieren die Chromosomen zu langen dünnen Fäden und werden lichtmikroskopisch sichtbar. Obwohl die Chromosomen bereits in ihre Chromatiden aufgeteilt sind, ist ihre charakteristische Morphologie noch nicht erkennbar. Der wohl wichtigste Vorgang für die meiotische Teilung vollzieht sich in dem Zygotän. Die Phase des Zygotäns besteht in der exakten Paarbildung der homologen Chromosomen (Bivalent), die als reißverschlussartige Struktur, dem synaptonemalen Komplex, zum Vorschein tritt.

In der darauf folgenden Phase, dem Pachytän, bilden sich Chiasmata zwischen den Chromatiden der homologen Chromosomen aus, die zur Einleitung des bevorstehenden Crossing-over benötigt werden. Das Crossing-over umschreibt den Prozess des reziproken Austausches zwischen den Chromosomen, der für die genetische Rekombination verantwortlich ist. Nach der Auflösung des synaptonemalen Komplexes wird die Verbindung in der Metaphase 1 zwischen den Chromosomen lediglich durch die Chiasmata aufrechterhalten.

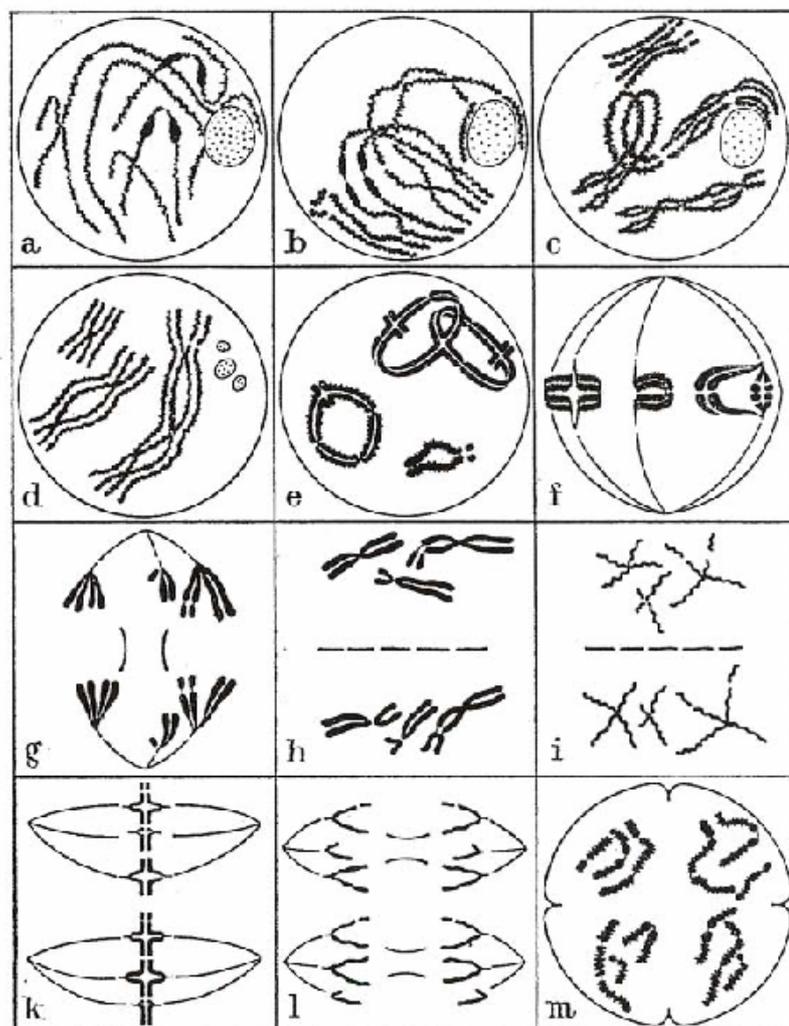


Abbildung 4: Meiose a) Leptotän, b) Zygotän, c) Pachytän, d) Diplotän, e) Diakinese, f) Metaphase I, g) Anaphase I, h) Telophase I, i) Interkinese, k) Metaphase II, l) Anaphase II, m) Telophase II (Rieger et al., 1976)

Die Chiasmata tragen zur korrekten Trennung der Chromosomen bei, weil sie sowohl eine stabilisierende Wirkung als auch eine vorzeitige Trennung der Chromosomen verhindern (Heyting et al., 1996). Diese Phase wird als Diplotän bezeichnet und geht mit der kompletten Trennung der Chromosomen in die Diakinese über. Weiterhin hat sich nun auch die gesamte Kernhülle aufgelöst, und der Abschluss der Prophase 1 hat sich vollzogen.

Die folgende Metaphase 1 entspricht der, der mitotischen Teilung. Die Pole bilden das bereits bekannte Mikrotubuli-System aus und die Chromosomen ordnen sich in einer äquatorialen Ebene an. Nachdem die Chromosomen in Richtung der entgegengesetzten Pole, ohne dass sich die Zentromere geteilt haben, gezogen sind, wird der Chromosomensatz der Zelle von einem Diploiden ($2n$), auf einen Haploiden ($2x n$) reduziert. Dieser Vorgang wird auch als Reduktionsteilung beschrieben und ist ein Synonym für die erste meiotische Teilung.

Nach einer relativ kurzen Interkinese beginnt die zweite meiotische Teilung, die der einer normalen mitotischen Teilung entspricht, mit der Ausnahme, dass nur ein haploider Chromosomensatz in jeder Zelle vorhanden ist. Nun erfolgt die Teilung des Zentromeres in seine beiden Schwesterchromatiden der Chromosomen. Somit entstehen durch die zweite meiotische Teilung vier haploide Keimzellen (siehe Abbildung 4).

1.2.3 Spermatogenese

Aus dem Prozess der Spermatogenese gehen aus den männlichen Stammzellen die Spermien hervor. Dieser Prozess läuft kontinuierlich und wellenförmig in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) des Hodens ab.

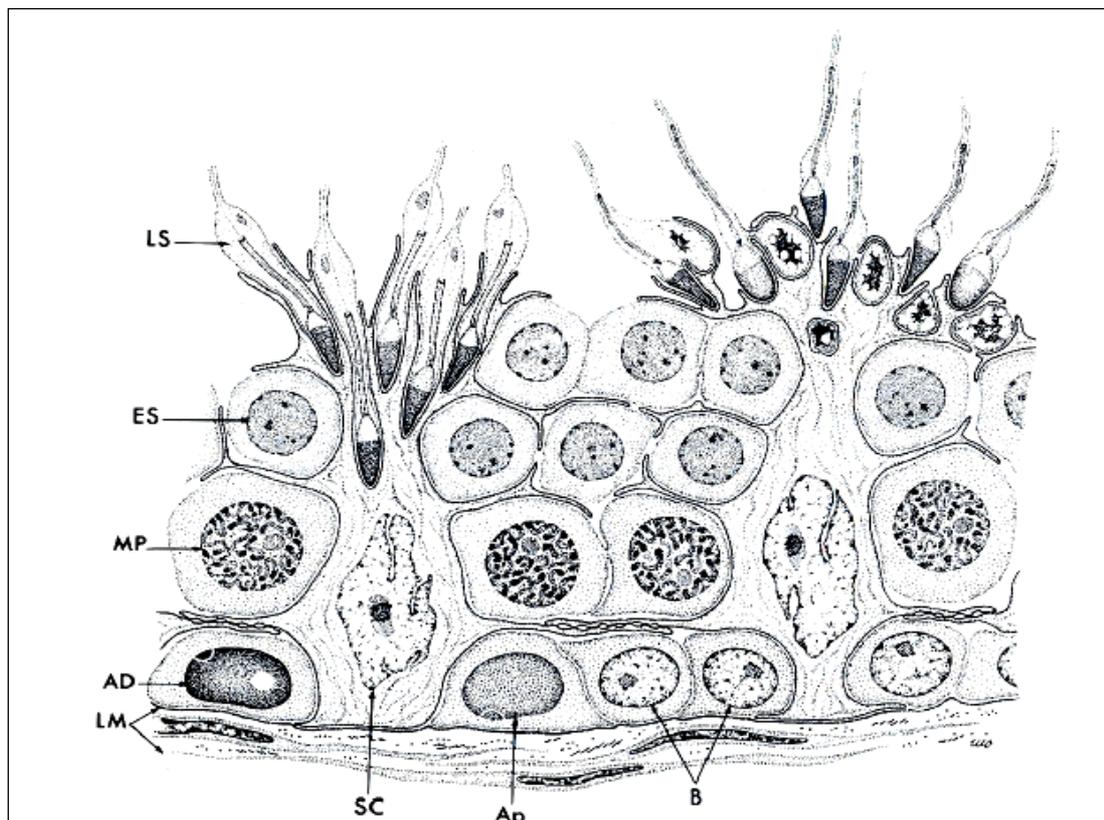


Abbildung 5: Schema der Reifung der Spermatogenesestadien. SC Sertoli-Zellen, Ap Typ A Spermatozyt, AD, Typ A Spermatozyt, dunkel, B Typ B Spermatozyt, MP Spermatozyt aus dem mittleren Pachytän, ES frühe (runde) Spermatozoen, LS späte (verlängert und kondensiert) Spermatozoen, LM Basalmembran (Handel, 1987)

An der Basalmembran der Samenkanälchen liegen die so genannten Stamm-Spermatozyten, mit denen die Spermatogenese beginnt (siehe Abbildung 5). Einige der Spermatozyten durchlaufen mehrere mitotische Zellteilungen und differenzieren sich weiter über die Spermatozyten des Typs A, intermediäre Spermatozyten und Spermatozyten des Typs B aus,

andere wiederum verbleiben weiterhin in ihrem Stammzellstadium. In einem Rhythmus von 6-8 Tagen teilen sich die Stamm-Spermatogonien, wobei die Zellzyklusdauer der differenzierten Spermatogonien 28 - 36 Stunden betragen. Bei der Maus nimmt die Spermatogonien-Entwicklung ungefähr 6 Tage in Anspruch. Die primären Spermatozyten gehen aus den Spermatogonien des Typs B hervor und treten nach ihrer Differenzierung in die Prophase I der ersten meiotischen Teilung ein. Im Vergleich zu den nachfolgenden Phasen der Meiose, beansprucht die Prophase I sehr viel Zeit. Sie dauert bei der Maus ungefähr 14 Tage (siehe Tabelle 1) und ist wohl der kritischste Teil der meiotischen Teilung, in der die Zelle besonders empfindlich gegenüber Einflüssen von außen ist. Die letzte DNA-Replikation der Spermatogenese erfolgt während des Präleptotäns. Im Leptotän, Zygotän und Pachytän, den nachfolgenden Stadien, finden sowohl die Chromosomenpaarung als auch die Rekombination statt. Zwei haploide sekundäre Spermatozyten entstehen aus einem primären Spermatozyt.

Spezies	Differenzieren- de Spermatogonien	Spermatozyten (meiotische Teilungsphase)	Spermatiden (postmeiotische Reifungsphase)	Testikuläre Spermato- zyten	Gesamte Spermatogenese	Epididymale Spermien
Maus	6	14	9	6	35	4-6
Mensch	16	25	16	6,5	64	8-17

Tabelle 1: Stadien der Spermatogenese und ihre Dauer (in Tagen) bei Maus und Mensch (abgeändert nach Adler, 1996)

Die Stadien der Spermatogenese werden als Prozess der ersten Reifeteilung beschrieben. Nach einer kurzen, von nur wenigen Stunden dauernden Interkinese, durchlaufen sie die zweite Reifeteilung.

Am Ende entstehen somit aus einer Spermatogonie vier haploide Spermatisden, die nun an der apikalen Seite des Samenkanälchens liegen. Die Gruppen von Keimzellen sind durch zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden, die während des gesamten Prozesses die Entwicklung der Spermien synchronisieren.

1.2.4 Spermiogenese

Die letzte Phase der Spermatogenese ist gekennzeichnet durch einen Umgestaltungsprozess, die so genannte Spermiogenese, in dessen Verlauf aus den anfänglich runden Spermatisden (A) hochdifferenzierte Spermien (E) entstehen. Dieser Prozess wird als Spermiogenese bezeichnet (siehe Abbildung 6).

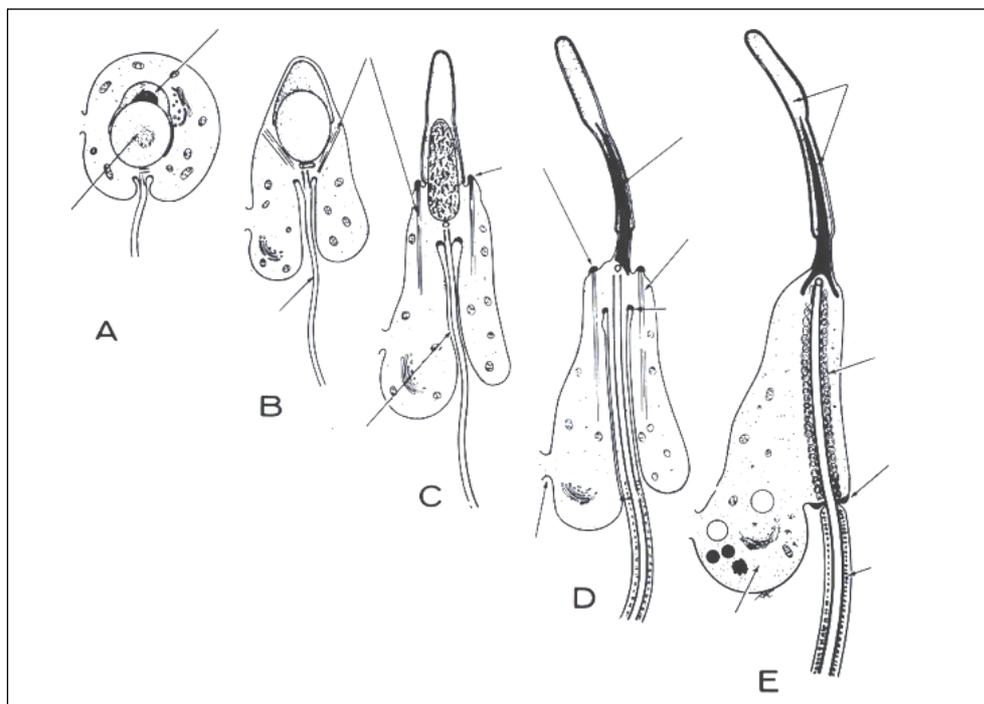


Abbildung 6: Spermiogenese (Handel, 1987)

Wichtige Bestandteile der Spermiogenese sind: zunehmende Kondensierung der DNA (B-D), Verlust des Zytoplasmas (E), Bildung eines Akrosoms und Ausbildung des Flagellatums (A-E). Wie man aus Tabelle 1 entnehmen kann, dauert dieser Differenzierungsprozess bei der Maus mit 9 Tagen kürzer, als der Prozess bei Menschen oder bei Ratten. Die Spermien werden daraufhin in das Lumen der Samenkanälchen entlassen, beenden im Epididymis ihre Reifung und werden dort für vier bis sechs Tage gespeichert. Somit wird innerhalb von 35 Tagen bei der Maus die gesamte Spermiogenese, beginnend mit den Mitosen der Spermatogonien bis zur Reifung der Spermien in der Epididymis durchlaufen. Dieser Prozess ist somit gerade mal halb so lang wie bei Menschen.

Die Sertolizellen bilden das Stützgerüst der Keimzellen aus und haben zusätzlich noch ernährende Funktionen. Sie fußen auf der Basalmembran und durchziehen das gesamte Keimepithel bis zum Lumen des jeweiligen Tubulus (siehe Abbildung 5). In ihren basalen Anteilen sind alle Sertolizellen über Tight Junctions miteinander verbunden und füllen sämtliche Zwischenräume zwischen den unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese aus. Die Sertolizellen bilden mit ihren Tight Junctions und ihrer Vernetzung mit der Basalmembran eine effektive Diffusionsbarriere aus, die man als Blut-Hoden-Schranke bezeichnet. Dadurch wird der Stofftransport zwischen dem Basalkompartiment und dem Tubulus seminiferus reguliert und die in der Meiose befindlichen Keimzellen geschützt. Das in den Sertolizellen produzierte und sezernierte Protein Inhibin, bildet eine weitere wichtige Funktion der Sertolizellen. Inhibin reguliert die Freisetzung des im Hypophysenvorderlappens produzierten Follikel stimulierenden Hormons (FSH), welches seinerseits wiederum die Sertolizellen zur Produktion weiterer, für die Differenzierung der Keimzellen nötigen Hormone, anregt.

Durch die Wirkung des Inhibins wird ebenso die Anzahl der Rezeptoren für Luteinisierendes Hormon (LH) auf den Leydigzellen erhöht, wodurch die Testosteronproduktion gesteigert wird. Testosteron wirkt einerseits zusammen mit FSH stimulierend auf die Proteinproduktion der Sertolizellen, andererseits hemmt es als negatives Feedback die Sekretion von LH aus dem Hypophysenvorderlappen.

1.3 DNA und Histone

Die DNA (Desoxyribonucleinsäure) ist wohl der wichtigste Bestandteil einer jeden lebenden Zelle und Speicherort für sämtliche genetische Informationen.

1.3.1 Aufbau und Funktion der Histone

Histone wurden erstmalig 1884 vom Mediziner und Physiologen Albrecht Kossel entdeckt und anfänglich als reines Packungsmaterial der DNA verkannt. Ihre Bedeutung und Rolle in der Modifizierung und Induktion wichtiger, biologischer Funktionen wurde erst in den letzten Jahrzehnten erkannt.

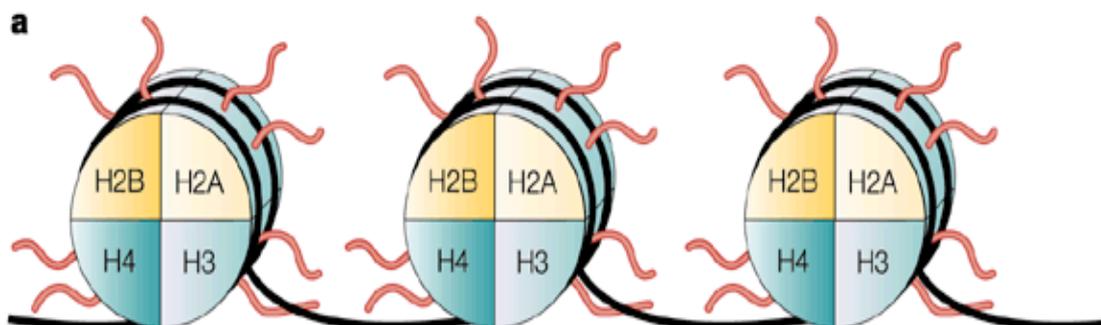


Abbildung 7: Das Core-Protein des Nukleosoms besteht aus Histon H2A, H2B, H3 und H4. Jeweils zwei Kopien sind im Nukleosom verpackt, damit sich die DNA (schwarzes Band) um das entstandene Oktamer winden kann (Paul et al., 2001).

Histone sind basische Proteine, die als Bestandteil des Chromatins für die Verpackung der DNA zuständig sind. Die kleinste Einheit der Verpackung wird als Nukleosom bezeichnet. Es besteht aus insgesamt 8 Histonen. Die Histone H2A und H2B lagern sich ähnlich wie H3 und H4 zu Dimeren zusammen. Jeweils zwei dieser Dimeren bilden als Oktamer ein Nukleosom (Core-Partikel). Das Histon H1 (fünftes Haupt-Histon) bindet direkt an die DNA und scheint für die übergeordnete Verpackungsform als Helix eine wichtige Rolle zu spielen (Widom, 1998). Dadurch ist eine Komprimierung bis auf 120 Millionen Nukleotide pro mm möglich (Paul et al., 2001).

biological function and modification	Histon modification
transcriptional repression / gene-silencing	H3 trimethyl K9 H2A phosphate S1 H4 sumoylated H4 acetyl K12 (telomeric silencing) H4 monomethyl K20 H4 trimethyl K20 (heterochromatin regions) H4 methyl K59
transcriptional activation	H3 acetyl K4, K9, K14; K18, K23, K27 H4 acetyl K5, K8, K12, K16, H2A acetyl K4, K5, K7 H2B acetyl K5, K11, K12, K15, K16, K20 H3 di-, and trimethyl K4, K36
chromatinconnection	H4 acetyl K5, K12, H4 acetyl K91
DNA repair	H2AX phosphate S139 H2A phosphate S129 H3 acetyl K14, K18, K23 H4 acetyl K5, K8, K12
cell-cycle (mitose / meiose)	H2A phosphate S1, T119 H3 phosphate T3, T11, S10, S28 H4 phosphate S1 H2B ubiquitylated K120
Apoptosis induced DNA fragmentation und chromatin condensation	H2B phosphate S32 dephosphorylated H1 and subtypes hyperphosphorylated H2AX phosphorylated H3

Tabelle 2: Überblick von Histonmodifikationen und ihrer möglichen biologischen Funktion (Peterson und Laniel, 2004)

Histone können auf unterschiedlichste Weise durch Methylierung, Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinylierung und andere Prozesse modifiziert werden. Dabei spielt die Methylierung wohl eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Inaktivierung von Genen und die Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription während der Meiose/ Mitose und Reparatur von DNA Schäden. Die Acetylierung, ähnlich wie die Phosphorylierung, setzt die Bindungsfähigkeit der Histone zur DNA durch Änderung ihrer Ladung herab. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Modifizierungen und deren biologische Funktion (Peterson und Laniel, 2004).

1.3.2 Vom Nukleosom zum Chromosom: Die höhere Ordnung der Chromatinstruktur innerhalb des Zellkerns

Eukaryotische Chromosomen bestehen aus einem großen molekularen Komplex, der im Gegensatz zu dem der Prokaryonten eine höhere Ordnung in ihrer Organisation aufweist. Prokaryontische DNA ist in einer zirkulären, eng gefalteten molekularen Struktur eingebettet. Im Gegensatz dazu muss das Mausgenom mit seiner Vielzahl an Basenpaaren in eine hochkompakte Struktur im Zellkern, der lediglich einen Durchmesser von 10µm aufweist, eingebettet werden. Dieses wird mit Hilfe der Nukleosomen erreicht, die eine Basiseinheit des Chromatins darstellt. Das eukaryontische Chromatin besteht in gleichen Teilen aus Proteinen, den so genannten Histonen und der DNA. Nur ein geringer Teil des Chromatins besteht aus Nicht-Histon Proteinen wie z.B. dem HMG Protein (high mobility group).

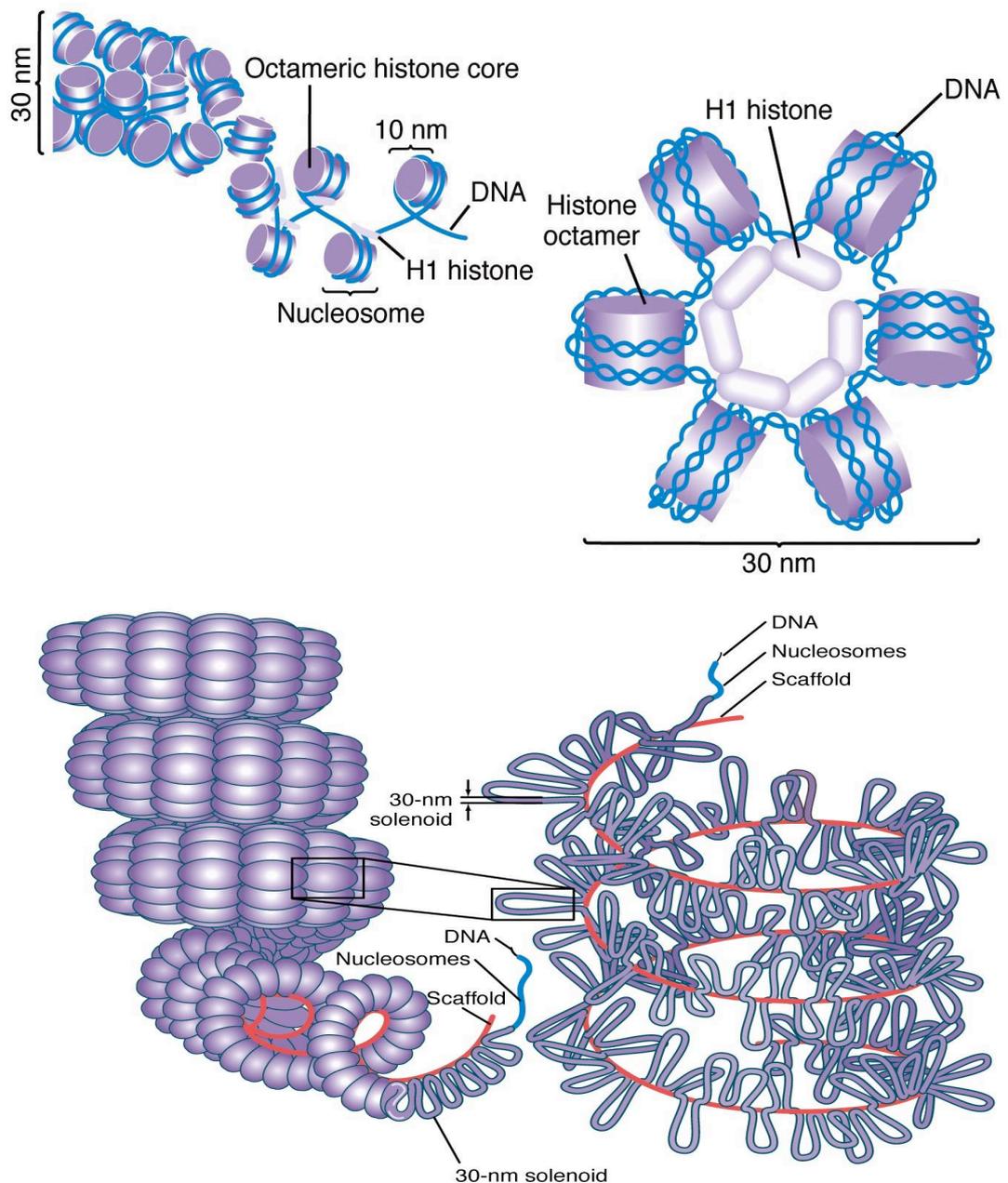


Abbildung 8: Vom Nucleosom zur höheren Ordnung der Chromatinstruktur und ihre unterschiedlichen Stadien der DNA Verpackung (Griffiths et al., 2004).

Das Chromatin als Grundgerüst der DNA ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. der DNA Replikation, genetischer Rekombination, Transkription und DNA Reparaturprozessen.

Ogleich die Struktur des Nukleosoms bereits häufig auf mehreren Ebenen analysiert wurde (Davey und Richmond, 2002; Davey et al., 2002), wird die Frage bezüglich der Organisation des Nukleosoms innerhalb des Chromatingeflechts immer noch kontrovers diskutiert.

Das Nukleosom, die erste Verpackungsstufe der DNA höheren Zellen, bildet, bestehend aus DNA und Histonen, die Grundorganisation des Chromatins. Etwa 146 Basenpaare der DNA wickeln sich in ihrer superhelikalen Struktur linksläufig, 1,64-mal um den zylindrischen Histonkomplex. Diese Struktur wird als *Nukleosom core Partikel* bezeichnet (Arents et al., 1991; Finch et al., 1977; Klug et al., 1980; Kornberg und Thomas, 1974).

Die ersten Schritte wurden von Finch (Finch et al., 1977) gemacht, der erstmals die Struktur durch kristallographische Analysen bei einer Auflösung von 7 Å darstellen konnte. Weitere Arbeiten von Arents (Arents et al., 1991) und Luger (Luger et al., 1987) konnten die Auflösung bis auf 2,8 Å reduzieren und damit erstmals die Verwindung der DNA um den *core Histonkomplex* darstellen.

1.3.3 Histonmodulierung während der Spermiogenese

Eine der drastischsten Remodulierungen des Chromatins findet während der Spermiogenese statt. In dieser Phase werden Histone durch kleine Basisproteine, die so genannten Transitionsproteine und Protamine, ersetzt (Abbildung 9). Über den eigentlichen Prozess und die zugrunde liegenden Mechanismen ist bisher nicht viel bekannt. Es gibt lediglich Hinweise, die voraussichtlich für den Prozess verantwortlich sind. Einer ist die massive Produktion von Histonvariablen und der andere ist eine stadienabhängige posttranslationale Modifikation von Histonen.

Die Rekrutierung von unterschiedlichen Histonvarianten innerhalb des Nukleosoms haben offensichtlich zwei wichtige Effekte hinsichtlich ihrer Stabilität und Funktion des Chromatins. Zum einen können kleine Sequenzänderungen die Stabilität des Nukleosoms verändern und zum anderen kann diese Sequenzänderung das Potential zur Modifizierung der einzelnen Kernhistone verändern. Zu diesen Veränderungen der Molekülstruktur werden mehrere Modifikationen gezählt. Zu erwähnen sind hier zunächst einmal die Methylierung von H3 (Lys9) durch zwei Histonmethyltransferasen, die Phosphorylierung von H3 (Ser10 und 28), von H2A, H2AX, H2B, die Ubiquitinylierung von H2A (K119) und zuletzt die Acetylierung von H4. Die Acetylierung von H4 spielt eine wichtige Rolle in den elongierten Spermatisiden, indem sie als primäres Signal für die Kondensation des Chromatins fungiert (Lahn et al., 2002).

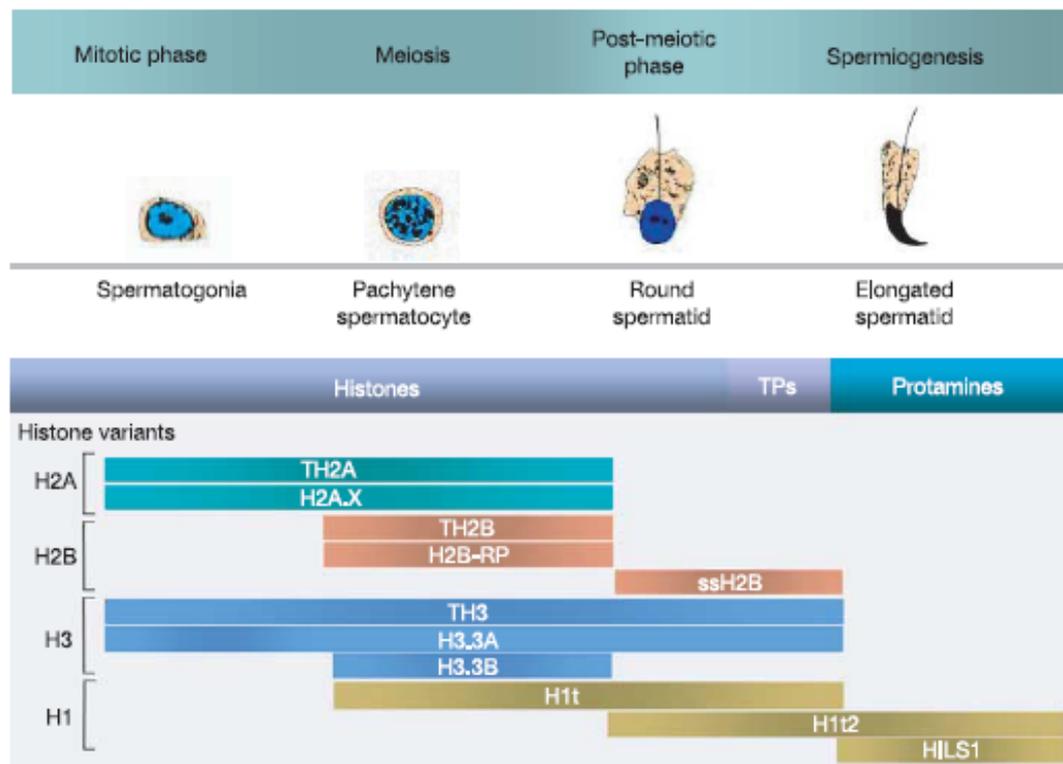


Abbildung 9: Remodellierung von Histonen während der Spermiogenese (S. Kimmins und P. Sassone-Corsi, 2005)

Ein weiterer Faktor der für die Remodulierung des Chromatins während der Spermio-genese entdeckt wurde, ist das BRDT (Bromodomain testis-specific protein). Dieses ist ein Testis spezifisches Bromodomainen enthaltene Protein, das durch Acetylierung verschiedener Histone das Chromatin verpackt (Pivot-Pajot et al., 2003).

1.4 Grundlagen zur Entstehung von DNA Schäden und ihre Reparaturmechanismen

1.4.1 Physikalische Grundlagen

Bei der Bestrahlung tritt energiereiche Photonenstrahlung in Wechselwirkung mit dem Gewebe und überträgt ihre Energie auf Moleküle und Atome. Einige der physikalischen Grundprozesse sind die Ionisation und die Exzitation (Schmelter, 1986). Bei der Ionisation werden Elektronen aus den Atomen oder Molekülen herausgelöst, wenn die bereitgestellte Energie groß genug ist, um die Elektronen aus ihrem Verband zu lösen. Ist die Energie zu gering, kommt es zur Exzitation (Anregung), wobei Elektronen durch Absorption von Lichtquanten auf eine höhere Elektronenschale angehoben werden, um anschließend wieder in den Urzustand unter Aussendung von Lichtquanten zurückzuspringen (Richter et al., 1996).

Die Prozesse, die für die Wechselwirkung zwischen einfallender Photonenenergie und dem durchwanderten Gewebe zuständig sind, werden als Photoeffekt, Compton-Effekt, Paarbildung und Streuung bezeichnet. Diese Prozesse sind abhängig von der Dichte und Kernladungszahl der durchstrahlten Materie sowie von der Photonenenergie, mit der bestrahlt wird.

Die weiteren nachgeschalteten Prozesse spielen sich auf einer molekularen, intra- und extrazellulären Ebene ab und sind radiochemischer, biochemischer und biologischer Natur.

1.4.2 Strahlenchemische Wirkung

Die strahlenchemische Wirkung wird in eine direkte und indirekte Wirkung unterteilt. Die direkte Wirkung bedeutet hierbei, dass Primärprozesse, wie z.B. die Zerstörung von Desoxyribosen, Nukleinsäuren oder Chromosomenaberrationen, zu chemischen Veränderungen des ursprünglichen Moleküls führen und damit die Integrität des Moleküls nicht mehr gewährleistet ist. Dabei erfolgt die Absorption und Wirkung in derselben biologischen Struktur. Bei der indirekten Strahlenwirkung hingegen erfolgt die Absorption und biologische Wirkung in unterschiedlichen Strukturen. Die entstandenen Schäden, beispielsweise an der DNA, entstehen durch chemische Reaktionen, die auf Produkte der Wasserradiolyse zurückzuführen sind, die so genannten Radikale (Hall, 1994; Bolus, 2001). Radikale sind Reaktionsprodukte, die sehr reagerfreudige Eigenschaften aufweisen und auf ihrer äußeren Schale ein freies Elektron besitzen. Die Primärradikale $\cdot\text{OH}$, $\text{H}\cdot$ und e^-_{aq} entstehen bei der Interaktion von Bestrahlung und den wässrigen Anteilen des Gewebes (Kauffmann et al., 1998).

Der Anteil an der Gesamtstrahlenwirkung durch Radikale ist um einiges höher, als die der direkten Strahlenwirkung. Dieser Effekt wird in Anwesenheit von Sauerstoff, durch die Bildung von aktiven Produkten, wie Peroxidradikale und Wasserstoffperoxid, noch verstärkt. Daher ist auch die biologische Wirksamkeit von ionisierenden Strahlen im Sauerstoffmilieu ca. 2-3 mal höher als unter Anoxie.

1.4.3 Biologische Strahlenwirkung

Der biologische Strahleneffekt wird in die stochastische und nicht-stochastische Strahlenwirkung unterteilt (Bolus 2001; Stewart 1999). Dabei ist die stochastische Strahlenwirkung unabhängig von der Dosis.

Sie steigt zwar mit der Dosis an, aber die Schwere des Effektes wird nicht beeinflusst (Roth et al., 1996). Die Induktion von Mutationen und von Krebsneubildungen ist ihr Effekt (Mazurik et al., 1999), der für seine Entstehung keinen Schwellenwert aufweist, d.h. auch bei einer geringen Dosis sind Mutationen und Krebsneubildungen möglich.

Im Gegensatz dazu ist bei der nichtstochastischen Strahlenwirkung das Ausmaß der Schädigung dosisabhängig wobei jedes Gewebe einen unterschiedlichen Schwellenwert aufweist, der sich in Früh- und Spätfolgen manifestiert. Somit nimmt auch das Ausmaß der Schädigung mit steigender Dosis zu.

1.4.4 DNA Einzelstrangbrüche und Basenschäden

Einzelstrangbrüche (single strand break; SSB) sind Diskontinuitäten in dem Zucker-Phosphat-Rückgrat eines Stranges der DNA-Doppelhelix. Hunderttausende von SSBs entstehen jeden Tag durch DNA-Schädigung. SSBs die nicht reparierbar sind, können in potentiell letale DSBs umgewandelt werden. Die beiden Hauptquellen endogener SSBs sind 1. Zuckerzerstörung und 2. DNA-Basenerstörung. Die SSBs entstehen durch Zuckerzerstörung und Desintegration von Deoxyribose *direkt* wohingegen Basenschäden *indirekt* durch eine enzymatische Entfernung der zerstörten Base bzw. des zerstörten Nukleotides mittels DNA-Basenreparatur (BER) entstehen. Zellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, SSBs schnell und effizient zu reparieren.

1.4.5 DNA Doppelstrangbrüche (DSBs)

DSBs repräsentieren wohl den wichtigsten DNA Schaden, der nicht nur für die Integrität des Genoms, sondern auch für das Überleben des Organismus von großer Bedeutung ist. Das Vermögen, diese Läsionen zu reparieren, sichert die Integrität des Genoms und deren Fortbestand.

Es gibt vielfältige Möglichkeiten, die zur Ausbildung eines DSB führen können. Exogene Noxen wie ionisierende Strahlungen, chemotherapeutische Medikamente und endogene Noxen, die während der Replikation, V(D)J Rekombination und Meiose zum Tragen kommen, sind nur einige Möglichkeiten ihrer Entstehung (Hoeikmakers et al., 2001; Van et al., 2001).

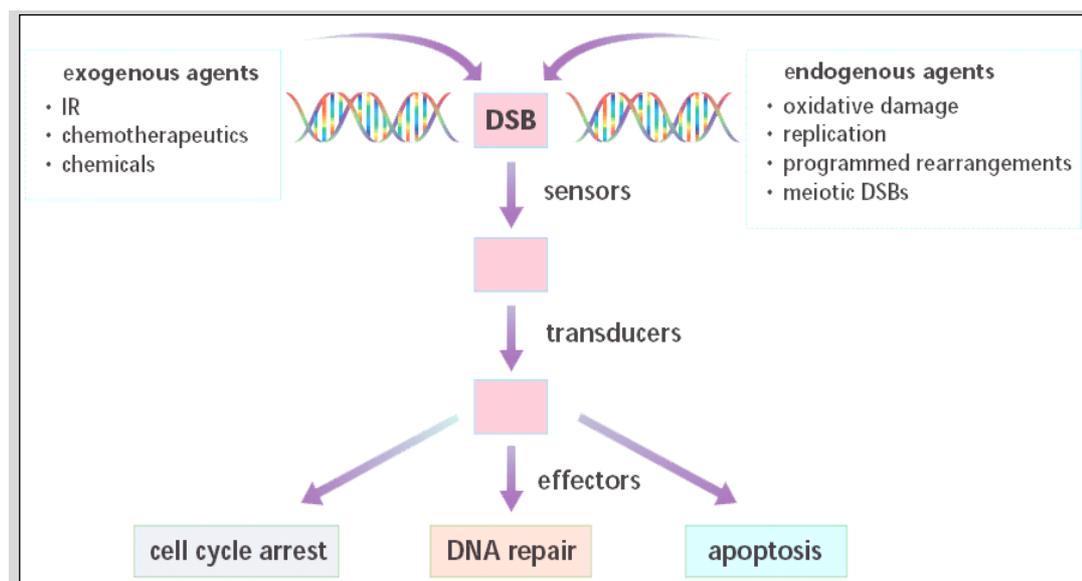


Abbildung 10: Signaltransduktion von DNS Doppelstrangbrüchen (Khanna et al., 2001)

Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, zieht ein durch endogene oder exogene Noxen verursachter DNA Schaden eine im klassischen Sinne erfolgende Signalkaskade nach sich, indem der eigentliche Bruch als aktivierendes Signal fungiert.

Dieses Signal wird von bruchbindenden Proteinen detektiert (Sensors), die wiederum weitere Proteine aktivieren (Effectors), um den entstandenen Schaden zu beheben.

Die Zelle verfügt über eine Vielzahl möglicher Strategien, um eine unkontrollierte Teilung einer beschädigten DNA zu verhindern.

Eine der wohl wichtigsten Strategien ist der Zellzyklusarrest, durch den eine mögliche Teilung einer fehlerhaften Zelle verhindert werden kann. Außerdem bleibt der Zelle somit die Gelegenheit ihre DNA Schäden in der Zeit des Zellzyklusarrestes zu reparieren. Eine weitere Möglichkeit ist der Übergang in die Apoptose, den so genannten programmierten Zelltod (Olive et al., 1998). Bei ihm werden durch Signaltransduktion Caspasen aktiviert, die für den programmierten Zelltod verantwortlich sind. Daher ist auch die Bedeutung dieses Systems für die Integrität des Genoms ausschlaggebend. Auch einzelne Brüche müssen von diesem System erkannt und beseitigt werden, weil ein nicht reparierter Bruch zu Mutationen oder Apoptose der Zellen führen kann (Morgan et al., 1998).

1.4.6 Reparaturmechanismen

Der DSB stellt für die Zelle eine potentiell gefährliche Läsion dar, deren Reparatur von großer Bedeutung ist. Als Folge dieser Schädigung könnten, bei Zellteilungen, bevor der Doppelstrangbruch repariert ist, ganze Chromosomen verloren gehen. In Eukaryonten werden DSBs durch zwei Mechanismen repariert, zum einen durch das *nicht-homologe End-Joining* (NHEJ) und zum anderen durch die *homologe Rekombination* (HR).

Im Gegensatz zu dem NHEJ, benötigt die HR zur Reparatur des DSBs, eine intakte doppelsträngige Kopie der geschädigten Region. Dies kann entweder das nach der Replikation entstandene Schwesterchromatid sein, oder das homologe Chromosom.

Bei der NHEJ hingegen erfolgt die Reparatur unabhängig von dem zugrunde liegenden Homologiebereiche, da hier die beiden Bruchenden lediglich miteinander verbunden werden. Allerdings ist das NHEJ in der Regel mit einem Verlust von Basenpaaren verbunden und kann Mutationen hervorrufen.

Neben der grundsätzlichen Diskussion über die Bedeutung beider Reparaturmechanismen kann festgehalten werden, dass Zellen, die sich in der G_0/G_1 Phase befinden, vorwiegend über das NHEJ repariert werden, wohingegen Zellen, die sich in der M oder S Phase begeben, sowohl über die HR als auch über das NHEJ repariert werden können (Lee et al., 1997; Takata et al., 1998).

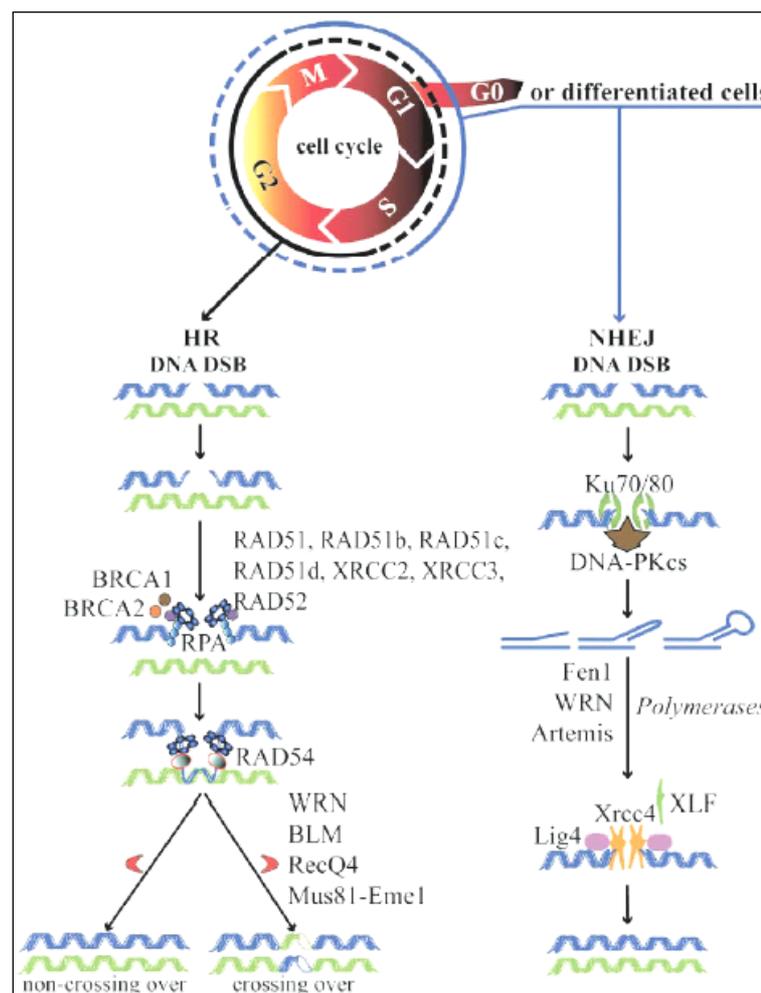


Abbildung 11: DNA-Reparationsysteme (HR und NHEJ) (Lee et al., 2006)

1.4.7 Nicht-homologes End-Joining (NHEJ)

Die verantwortlichen Proteine, DNA-PKcs, Ku (mit den zwei Untereinheiten Ku70/Ku80), DNA-Ligase LIG4 und deren Cofaktor LIT4/XRCC4 sind in dem Reparaturmechanismus des NHEJ involviert (Barnes, 2001; Valerie und Povirk, 2003). Die an der Bruchstelle entstehenden Bruchenden werden von dem Heterodimer Ku70/Ku80 gebunden und schützen den Bruch vor dem vorzeitigen Abbau. Ku70/Ku80 rekrutiert nach seiner Bindung die DNA-abhängigen Proteinkinase katalytische Subeinheit (DNA-PKcs) und bildet zusammen die DNA Proteinkinase, wodurch die beiden Bruchenden in ihrer Position stabilisiert werden (siehe Abbildung 12).

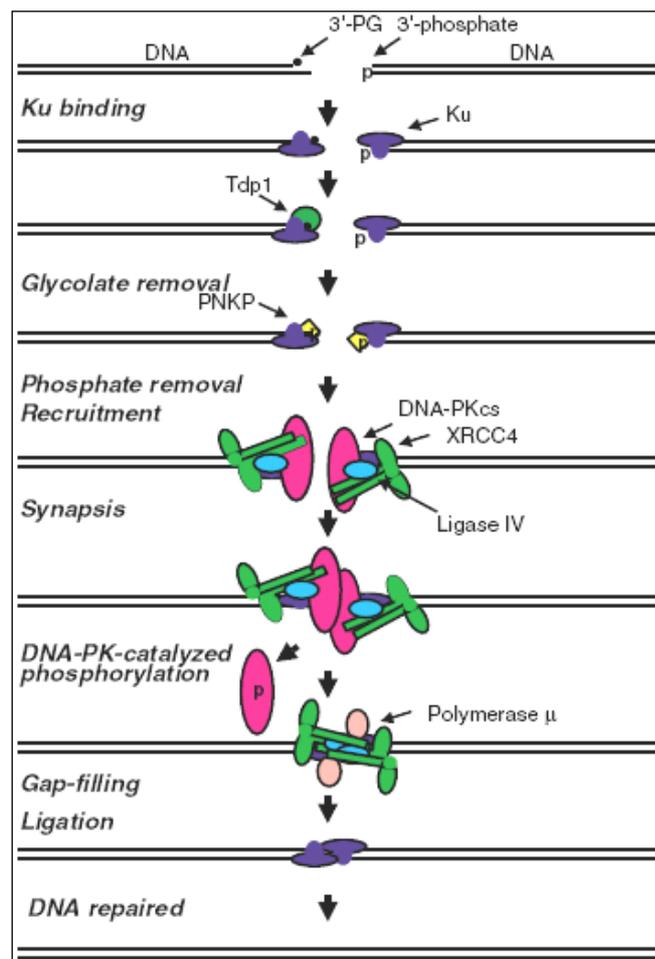


Abbildung 12: Schematische Darstellung des nicht homologen End-Joining (Valerie und Povirk, 2003)

Die DNA-PKcs ist ein 465 kDa schweres Polypeptid, das mit seiner C-terminalen Region zu den katalytischen Domänen einiger Proteine, die sogenannten PIKKs (Phosphatidylinositol 3-kinase-like-Proteinkinasen), eine gewisse Gemeinsamkeit aufweist. Einige dieser Proteine, unter anderem ATM (Ataxia teleangiectasia mutated), ATR (Ataxia teleangiectasia related) und TRRAP (transdormation/transcription domain-associated protein), sind neben der DNA-PKcs auch im Zusammenhang mit der DNA Reparatur zu sehen (Riballo et al., 2004).

Durch die Bindung der DNA-PK und ihrer enzymatisch wirksamen Untereinheit DNA-PKcs (*catalytic subunit*) werden verschiedene DNA-bindende Proteine (KU / WRN / XRCC4) und die DNA-PK selber phosphoryliert, wodurch sie von den jeweiligen Bruchenden der DNA dissoziieren. Der für die Ligation der DNA-Enden notwendige Komplex LIG4/XRCC4 lagert sich über KU und DNA-PK an die Bruchstelle an. Nach Dissoziation der Komplexe ist das NHEJ abgeschlossen. Falls eine terminale Schädigung oder die Enden nicht vollständig kompatibel vorliegen, ist eine enzymatische Prozessierung durch spezialisierte Polymerasen wie die Polymerase μ (Mahajan et al., 2002) und Polymerase 4 (Wilson und Lieber, 1999) notwendig. Ebenso scheint der Mre11-Rad50-Nbs1/Xrs2-Komplex (MRN-Komplex) eine Rolle beim NHEJ zu spielen was jedoch bisher nur in der *Saccharomyces cerevisiae* (Backhefe) sicher gezeigt werden konnte (Moore und Haber, 1996).

Der MRN-Komplex dient als eine Art Sensor für das Vorliegen von DSBs und rekrutiert die Ataxia-Teleangiectasia-mutated-kinase (ATM-Kinase) an der Stelle der Strangbrüche. ATM liegt zunächst in einem katalytisch inaktiven Komplex vor (Bakkenist et al., 2003) und wird durch Autophosphorylierung an Serin 1981, bei Vorliegen einer geringen Zahl von DSBs, aktiviert (Bakkenist et al., 2003; Buscemi et al., 2004). Eine vermehrte Aktivität von ATM-Kinasen ist auf die Anwesenheit des MRN-Komplexes zurückzuführen (Lee et al., 2004 und 2005; You et al., 2005), die deren Aktivität bestimmt.

Durch die aktivierten ATM-Kinasen werden wiederum andere Proteine aktiviert, darunter p53, SMC Protein (stability and maintainance of chromosomes), CHK2 (Checkpoint Kinase-2) und das Histon H2AX, denen allen weitreichende Funktionen im Rahmen der Zellzykluskontrolle und DSB-Reparatur zukommen.

Die Interaktion zwischen dem MRN-Komplex und ATM wird insbesondere dadurch deutlich, dass einerseits der MRN-Komplex zur Aktivierung von ATM benötigt wird (Bakkenist et al., 2003; Uziel et al., 2003) und ATM andererseits eine Phosphorylierung von NBS1 an mehreren Stellen verursacht (Gatei et al., 2000).

Als Resultat aus der Aktivierung von ATM wird das Histon H2AX am Serin 139 phosphoryliert (Rogakou et al., 1998). Nachfolgend bindet NBS1 zunächst über seine BRCT-Domäne in dem Bereich des DSBs. Weitere Komponenten des MRN-Komplexes wie MRE11 (meiotic recombination) und RAD50 werden angelagert (Tauchi et al., 2002). MRE11 dient bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen als dsDNA-Exonuklease, ssDNA-Endonuklease und unterstützt die Entwindung des Doppelstrangs (Paull et al., 1999). RAD50 hingegen ist für die Aufrechterhaltung der Chromosomenstruktur mitverantwortlich und bildet eine Konformation aus, die den Bruch der DNA überbrücken kann (D'Amours et al., 2002). Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der Röntgenkristallographie konnte die molekulare Struktur des MRN-Komplexes und dessen Bindungseigenschaften erstmalig dargestellt werden (Anderson et al., 2001; de Jager et al., 2001; Hopfner et al., 2002).

1.4.8 Die homologe Rekombination (HR):

Im Vergleich zum NHEJ sind bereits viele Aspekte seitens der homologen Rekombination bekannt. Für die DNA-Reparatur nach der homologen Rekombination ist eine homologe Sequenz in Form einer Schwesterchromatide notwendig.

Die homologe Rekombination ist ein relativ fehlerfreier Reparaturmechanismus und ist in der späten S- und G2 Phase des Zellzyklus am aktivsten (Takata et al., 1998). In diesem Mechanismus sind eine Reihe von Proteinen involviert wie RAD51, RAD52, RAD54, BRCA1, BRCA2, XRCC2, XRCC3 und der MRN Komplex (Karran, 2000; Thompson und Schild, 2001). Zusätzlich sind noch weitere Proteine oder Komplexe notwendig, die als sogenannte Sensoren für DNA Schäden dienen. Diese Sensoren schließen auch ATM, ATR und DNA-PK_{cs} ein, die ebenfalls für die Modifizierung und Regulation des Zellzyklus von Bedeutung sind (Abraham, 2001; Durocher und Jackson, 2001).

Ein schematisches Modell der homologen Rekombination ist in Abbildung 13 dargestellt. Der erste Schritt bei der homologen Rekombination ist wie bereits beschrieben die Detektion des DSB über die Sensor-Proteine, ATM und den MRN Komplex. Zur Reparatur wird der Doppelstrang im Bereich des Bruches aufgespaltet damit die Enden als Einzelstrang vorliegen. Dafür ist der MRN Komplex mit seinen Untereinheiten notwendig, die sowohl eine 3'-5' Endonukleaseaktivität als auch eine 5'-3' Exonukleaseaktivität aufweisen (Paull und Gellert, 1998; Trujillo et al., 1998).

An den entstandenen Einzelstrang-Enden lagert sich RPA (Replikations Protein A) an. BRCA2 und RAD51, die eine Rekombinaseaktivität aufweisen, ergänzen RPA am Bruchende. RAD52, RAD51 und RAD54 spielen ebenfalls eine große Rolle bei der homologen Rekombination (Thompson and Schild, 2001). RAD52 formt eine Ringstruktur bestehend aus sieben RAD52 Monomeren, die mit den Bruchenden interagieren (Van Dyck et al., 1998,

1999). RAD54 weist eine ATPase-Aktivität auf und scheint eine DNA-Helikase zu rekrutieren. Des Weiteren scheinen RAD54, RAD51 und RAD52 dabei zu helfen, die DNA an der Bruchstelle zu entwinden (Tan et al., 1999).

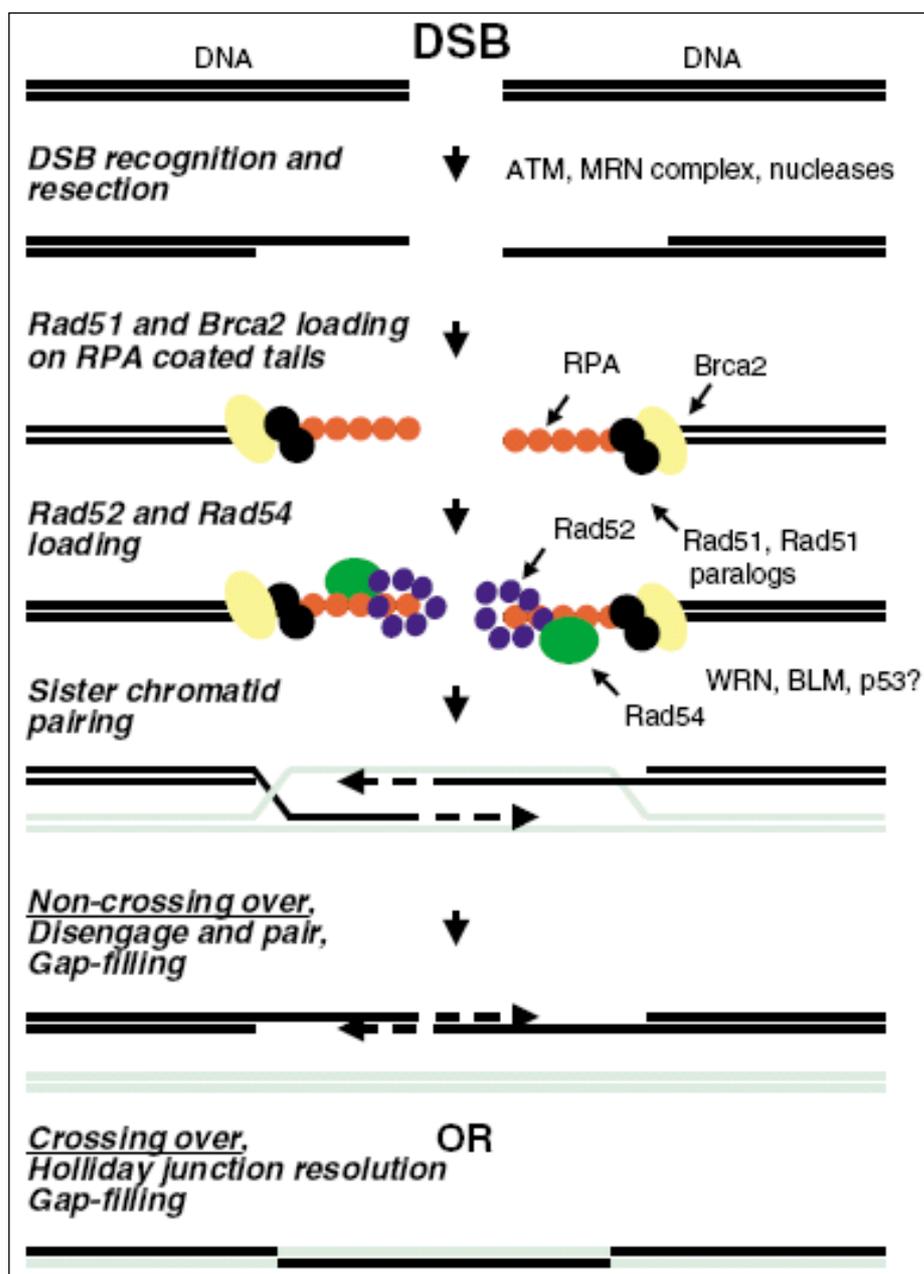


Abbildung 13: Modell der homologen Rekombination (Valerie et al., 2003).

Die BLM-Helikase (bloom syndrom protein) als weiteres Protein bei der homologen Rekombination (Hickson et al., 2001; Shen and Loeb, 2001) dient ebenfalls als Sensor von DNA Schäden (Wang Y et al., 2000). Das WRN Protein interagiert mit den Proteinen RPA, KU und P53 und wird durch die DNA-Proteinkinase phosphoryliert (Yannone et al., 2001).

WRN scheint eine wichtige Rolle sowohl bei der homologen Rekombination als auch beim NHEJ zu spielen (Oshima et al., 2002).

Zur eigentlichen Replikation werden über die DNA-Polymerase die geschädigten Informationen der Duplex-DNA kopiert und mit Hilfe der Ligase I ligiert.

1.4.9 Phosphorylierung von H2AX (γ -H2AX)

Die Phosphorylierung von H2AX am Serin 139 stellt einen der ersten Schritte in der Antwort auf DSBs dar (Modesti und Kanaar, 2001). ATM (Burma et al., 2001; Fernandez-Capetillo et al., 2002), ATR (Ward und Chen, 2001; Furuta et al., 2003) und die DNA-PK (Park et al., 2003; Stiff et al., 2004) katalysieren diese Phosphorylierung. Rogakou zeigte bereits 1998, dass es einen Zusammenhang zwischen DNA Doppelstrangbrüchen und dem Auftreten von phosphorylierten H2AX geben müsste. Da γ -H2AX sehr früh nach der Induktion von DSBs auftritt, ging man früher davon aus, dass die Phosphorylierung von H2AX unabdingbar für die Rekrutierung anderer DNA-Reparaturfaktoren (Paull et al., 2000; Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002) und Interaktion mit Checkpoint-Proteinen wie Nbs1, 53BP1 und MDC1, sei (Kobayashi et al., 2002; Stewart et al., 2003; Ward et al., 2003; Xu und Stern, 2003).

Folgende Studien zeigten, dass das γ -H2AX für eine suffiziente und schnelle Reparatur notwendig ist, jedoch für die Schadensantwort an sich abkömmlich zu sein scheint (Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002; Xie et al., 2004).

Da die Rekrutierung von anderen Faktoren scheinbar unabhängig von γ -H2AX verläuft (Celeste et al., 2003) geht man heute davon aus, dass das γ -H2AX nicht das initiale Signal für die DNA-Reparatur ist, sondern vielmehr eine Akkumulation von Reparatur- und Signalproteinen vermittelt. Mit dieser Feststellung rückte der MRN-Komplex wieder in den Vordergrund und gilt aktuell als wichtigster Sensor und initiale Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen (Petrini und Stracker, 2003; Lee und Paul, 2005; Paul und Lee, 2005; Lavin, 2007).

Unser Ziel war, durch die Untersuchung der *in vivo* Reparaturkinetiken von somatischen Zellen und männlichen Keimzellen unterschiedlicher Mäusstämme mit unterschiedlichen Reparaturdefekten, Erkenntnisse über das Reparaturverhalten von somatischen Zellen und Keimzellen bei therapeutischen Bestrahlungsdosen zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung wurde entsprechend dem Tierschutzgesetz im Tierstall für experimentelle Chirurgie durchgeführt. Die Mausstämme wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. 4-5 Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in einem Laminar Air Flow System mit konstanter Temperatur von ca. 22° Celsius, Luftfeuchtigkeit von 55% und Tag-Nachtrhythmus von 12 Stunden gehalten.

2.1.1 Verwendete Mausstämme

Insgesamt wurden 3 Mausstämme für die Experimente verwendet; männliche 12 Wochen alte C57/BL6 (wild-Typ, C57/BL/6NCrl), BALB/c und SCID (severe combined immunodeficiency; CB17/lcr-Prkdc SCID/Crl) Mäuse.

2.1.2 C57/BL6 Mäuse

C57/BL6 Mäuse sind die wohl am häufigsten verwendeten Mäuse in der medizinisch tierexperimentellen Forschung. 1921 wurde dieser Mausstamm von C.C. Little in New York gezüchtet und dient seitdem als klinisches Tiermodell. Der C57/BL6 Stamm war der erste, dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Ihre Nutzung in der onkologischen Forschung basiert auf der langen Lebenserwartung und der niedrigen Tumorzinzidenz.

2.1.3 BALB/c Mäuse

BALB/c Mäuse sind Albinomäuse die ebenfalls 1920 in New York gezüchtet wurden. Ihre Nutzung erfolgt vorwiegend in der Immunologie und Tumorforschung. In Western Blot Untersuchungen konnte 2000 erstmalig gezeigt werden, dass die katalytische Subeinheit der DNA Proteinkinase eine verminderte Aktivität und damit eine verminderte Reparaturkapazität vor allem bei dem NHEJ aufwies (Okayasu et al., 2000).

2.1.4 SCID Mäuse

SCID Mäuse weisen mehrere Gendefekte auf, die u.a. zu einer schweren Störung des Immunsystems führt. Ein deutlicher Mangel an T-/B-Lymphozyten macht die Mäuse sehr anfällig für Tumorentstehungen. Die untersuchten Mäuse (CB17/Icr-Prkdc SCID/Crl) zeichneten sich durch eine Mutation in der katalytischen Subeinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase aus (Charles River, 2004). Ein Funktionsverlust dieser katalytischen Subeinheit, die für die Reparatur von DSBs eine wichtige Rolle spielt, äußert sich in einer deutlichen Radiosensibilität. Eine erhöhte Induktion von Tumoren ist die Folge.

2.2 Bestrahlungsplanung und Durchführung

Die Bestrahlung erfolgte an einem Linearbeschleuniger (Siemens KD2) mit einer Energie von 6 MeV und mit einem Feldabstand von 100 cm.

200 Monitoreinheiten (MU) wurden während der Bestrahlung appliziert, was einer Dosisleistung von 2 Gy/min entsprach.

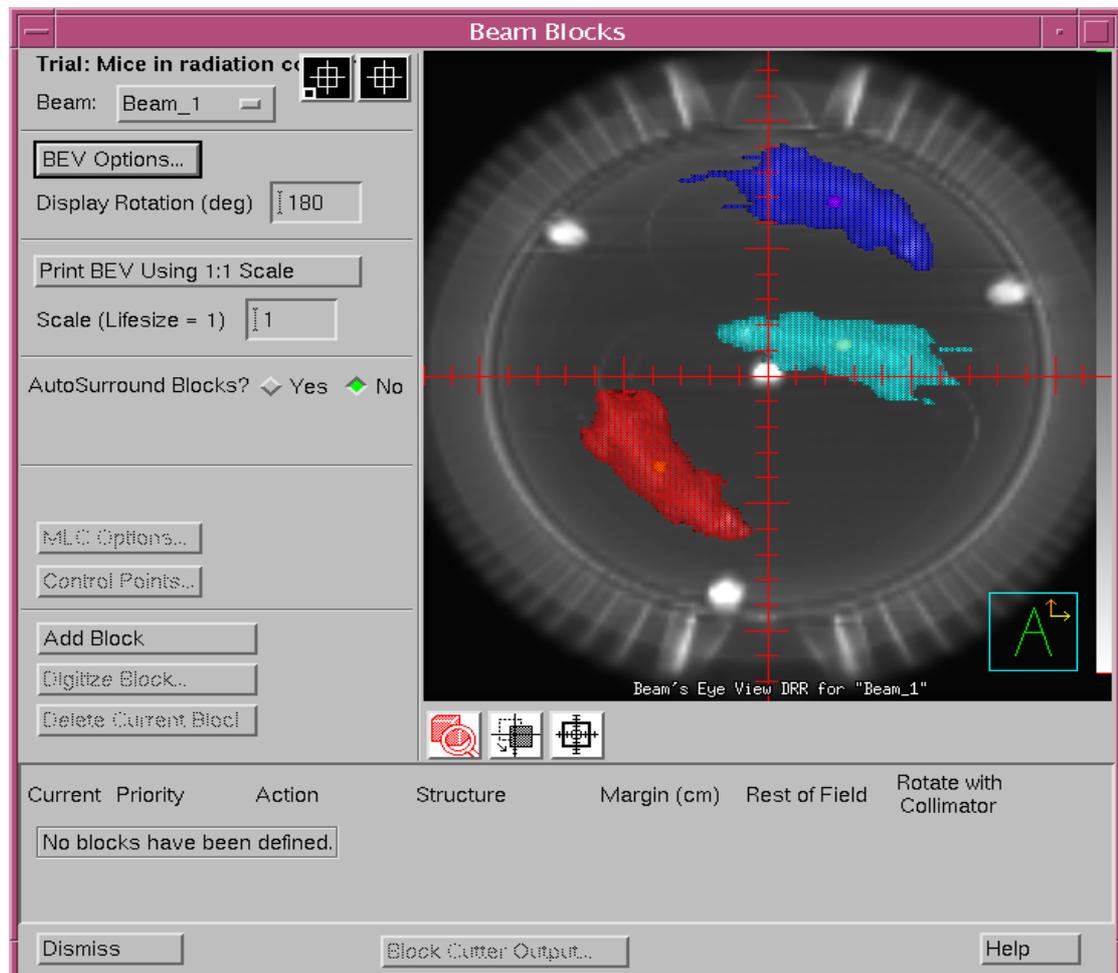


Abbildung 14: CT basierte Konturierung der Körper der Mäuse

Maximal drei nicht-narkotisierte Tiere wurden in einen ca. 40 cm hohen und 20 cm im Durchmesser messenden Zylinder platziert. Der Zylinder bestand aus einem gewebeäquivalenten Material (PMMA), mit einer Dicke von 1,5 cm. Zur Dosisaufsättigung und Homogenisierung der Strahlung wurde eine 1 cm dicke Acrylplatte innerhalb des Zylinders fixiert. Der beschriebene Zylinder wurde mit einem 40 x 40 cm großen Feld und einem Gantrywinkel von 0 Grad bestrahlt.

Zur Evaluierung der Bestrahlungstechnik erfolgte eine 3D-Bestrahlungsplanung an narkotisierten Mäusen zur Bestimmung der Dosisverteilung mit Hilfe vom ADAC Pinnacle Version 6.2b Planungssystem. Der gesamte Körper der Maus wurde als PTV (primary target volume) konturiert und erhielt 95% der verschriebenen Dosis.

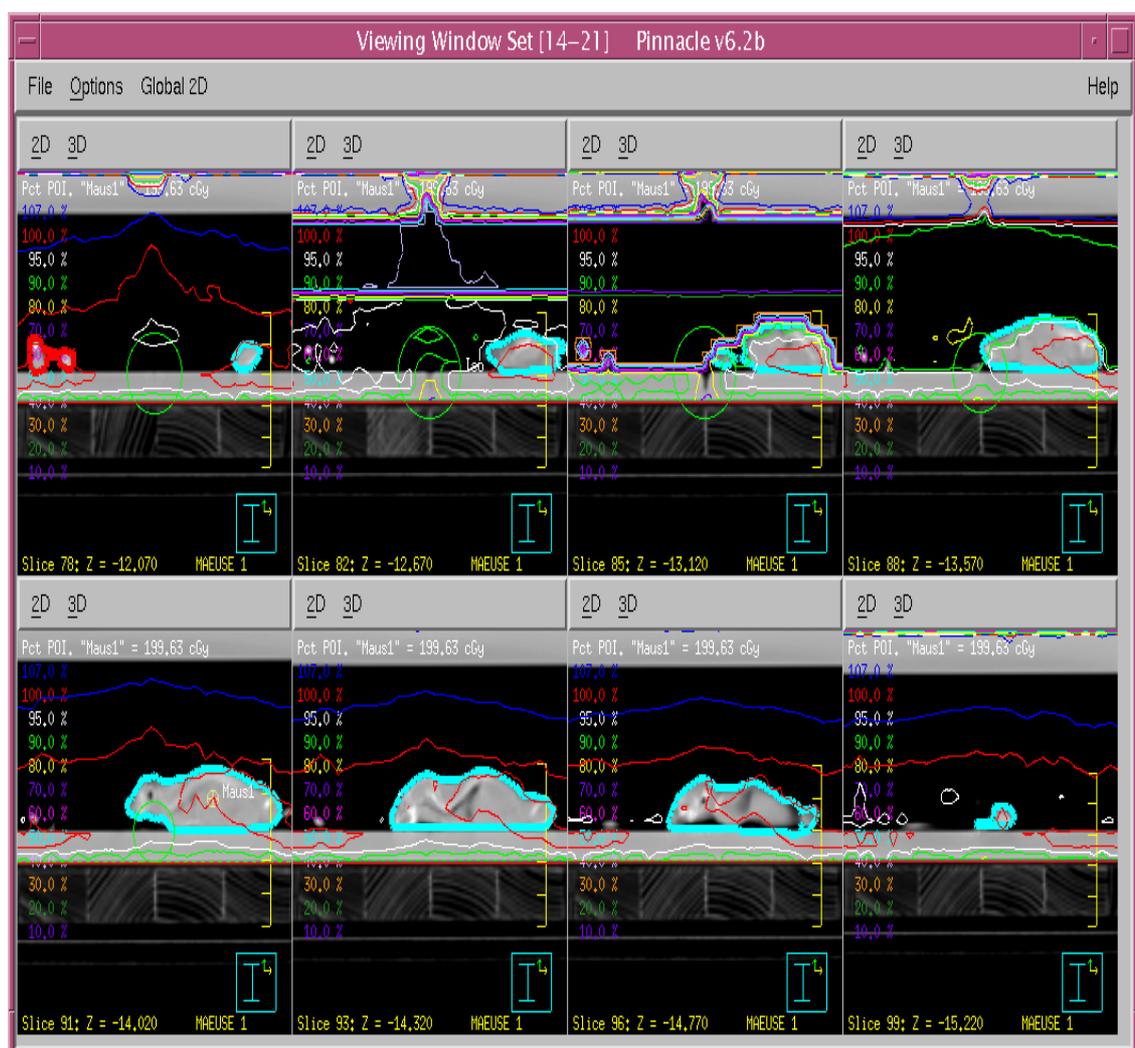


Abbildung 15: Isodosenverteilung mit Pinnacle Planungssystem Version 6.2b.
Die 95%- Isodose umschließt das PTV (ganze Maus).

2.3 Bestrahlung

Es wurden 12 Wochen alte C57/BL6, BALB/c und SCID Mäuse für die Dosiskorrelation einmalig mit 0,1 Gy, 0,5 Gy und 1 Gy bestrahlt und nach einem Intervall von 30 Minuten getötet. Anschließend wurden ihre Organe asserviert.

Für die Auswertung der Reparaturkinetik wurden die oben genannten Mausstämme mit einer Einzeldosis von 2 Gy bestrahlt und nach festgelegten Zeitpunkten von 30 Minuten, 2½ Stunden, 5 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden getötet.

Aus der Tabelle 3 und 4 wird die Anzahl der durchgeführten Experimente ersichtlich.

Dosis	Kontrolle	0,1 Gy	0,5 Gy	1 Gy
Zeitpunkt		30 Minuten	30 Minuten	30 Minuten
C57/BL6	2	2	2	2
BALB/c	2	2	2	2
SCID	2	2	2	2

Tabelle 3: Anzahl der Experimente der Dosiskorrelation nach Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen.

Dosis	Kontrolle	2 Gy	2 Gy	2 Gy	2 Gy	2 Gy
Zeitpunkt		0,5 h	2,5 h	5 h	24 h	48 h
C57/BL6	3	3	3	3	3	3
BALB/c	3	3	3	3	2	3
SCID	3	3	3	2	2	2

Tabelle 4: Anzahl der Experimente der Reparaturkinetik nach Ganzkörperbestrahlung mit 2 Gy Einzeldosis.

2.1 Gewebebegewinnung/Gewebeasservation und Lymphozytentrennung

Zur Gewebebegewinnung wurden alle Versuchstiere gemäß der Versuchstierverordnung mit einer intraperitonealen Injektion von Rompun® und Ketanest® anästhesiert (1 mL Rompun® und 0,75 mL Ketanest® auf 8,25 mL 0,9 % Natrium Chlorid Lösung; 0,15 mL pro 10 g Körpergewicht). Die Blutentnahme für die Asservation von Blutlymphozyten wurde durch eine linksventrikuläre Punktion durchgeführt. Die Blutabnahme von ca. 1 mL führte bei den Tieren zu einem hypovolämischen Schockzustand, in dem sie rasch verstarben. Die weitere Asservation der Organe erfolgte immer in der gleichen aufgeführten Reihenfolge: Herz, Lunge, Testis, Leber, Darm, Milz, Niere und Gehirn. Jedes Organ wurde separat in einer 4 %-igen neutral gepufferten Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit und der Dehydratation der Gewebe durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Vorbehandlung mit Xylol, wurden die Organe in Paraffin eingebettet und in 4 µm dünne Scheiben am Mirkotom geschnitten (Leica RM 2235). Die eingebetteten Paraffinblöcke lagerten vor dem Schneiden ca. 30 min in einem Gefrierfach bei -20° Celsius.

Zur weiteren Behandlung und Vorbereitung auf die immunhistologischen/-fluoreszenz Färbungen wurden sämtliche Schnitte auf Objektträger (Histo Band, Marienfeld; Laboratory Glassware; Lauda-Königshofen, Germany) aufgebracht. Die Fixierung auf dem Objektträger erfolgte in einem 50° Celsius warmen Wasserbad. Durch die Wärme des Wasserbads breiteten sich die Paraffinschnitte aus und konnten auf dem Objektträger fixiert werden. Anschließend wurden die fixierten Paraffinschnitte in einem Brutschrank (Binder Tuttlingen, Deutschland) bei 37° Celsius zum Trocknen aufbewahrt.



Abbildung 14: Lymphozytentrennung mit Ficoll nach Zentrifugation mit 1200g in ihre Phasen.

Für die Lymphozytentrennung wurde ein Trennungsmedium (Ficoll, PAA) verwendet. Nach Zentrifugierung der mit RPMI verdünnten Blutproben bei 1200g zeigte sich eine Trennung der festen Bestandteile des Blutes (siehe Abbildung 14).

Während die leichten Thrombozyten in der Plasmaphase (weiß) verbleiben, reichern sich die peripheren Lymphozyten und Monozyten in der weißlich erscheinenden Phase zwischen Plasma und Ficoll (Interphase) an.

Die Granulozyten und Erythrozyten diffundieren durch die Ficollschicht und bilden das Pellet (dunkelrot). Die Interphase (weißer Pfeil) kann mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgezogen werden. Die Zellpopulation wird anschließend mit mehreren Waschschrritten und erneuter Zentrifugation mit 300g von Restbestandteilen des Ficolls befreit. Nach Gelatinisierung einiger Deckgläser werden die gereinigten Lymphozyten auf die Deckgläser aufgebracht und für die Färbung bereitgestellt.

2.5 γ -H2AX Immunfluoreszenzfärbung im Gewebe

Zur Detektierung der DSBs wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen γ -H2AX durchgeführt. Die eingebetteten histologischen Schnitte wurden jeweils 10 Minuten in 100%igem Xylol (Xylol Pharm. Helv. 4, Isomerengemisch, Hedinger, Stuttgart) entwacht und in einer absteigenden Alkoholreihe von Ethanol absolut über 96% Ethanol, 90% Ethanol, 80% Ethanol und 70% Ethanol rehydriert.

Im Anschluss wurde jeder Schnitt für 5 Minuten im destilliertem Wasser gelagert und 60 Minuten bei 96° Celsius in einem Citratpuffer (DAKRO Retrieval puffer, #S-2031, Glostrup, Dänemark) zur Demarkierung der Antigene gekocht. Anschließend folgen weitere Waschschrte mit Aqua dest. und PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung; pH 7,2-7,4; Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes). Zur Sättigung nicht-spezifischer Bindungsstellen wurden die Organschnitte für eine Stunde in PBS/NS (normales Kälberserum; cat. 642921 ICN; Irvine; CA; USA) bei Raumtemperatur geblockt. Nach Abkühlung über einen Zeitraum von 20 Minuten wurden die Schnitte für 60 Minuten in Ziegen-Serum (goat serum #642921 ICN, Irvine/CA/USA) geblockt und anschließend mit einem primären, polyklonalen Hase-Antikörper (primary rabbit polyclonal antibody gegen γ -H2AX, Bethyl, #IHC-0059, Montgomery, TX), mit einer Verdünnung von 1:200 bei 4° Celsius über Nacht für 24 Stunden inkubiert. Der sekundäre Ziege anti-Hase Antikörper (Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody Invitrogen, cat #A11008) wurde am Folgetag für 1 Stunde in einer Dunkelkammer bei Raumtemperatur inkubiert und letztendlich in DAPI enthaltenen Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) asserviert. Die Aushärtung der Objektträger erfolgte abgedunkelt bei 4° Celsius für mindestens 12 Stunden.

2.6 γ -H2AX Immunfluoreszenzfärbung bei Blutlymphozyten

Nach der Fixierung auf den Deckgläsern werden die Zellen im Methanolbad bei -20° Celsius für 30 Minuten fixiert und anschließend mit Aceton bei -20° Celsius permeabilisiert. Danach erfolgten Waschschrirte, analog der Färbung des Gewebes sowie Verwendung der bereits erwähnten Primär- und Sekundärantikörper.

2.7 Erfassung der strahleninduzierten Doppelstrangbrüche mit der γ -H2AX Methode

Zur quantitativen Auswertung der strahleninduzierten DSBs wurden die Schnitte unter einem Mikroskop (Nikon Eclipse E600) mit einer Fluoreszenzlampe und mit Hilfe einer integrierten Kamera (Digital Sight DS-2MBWc; Nikon) sowie dazugehöriger Software festgehalten. Für die Analyse waren zwei Filter notwendig. Mit Hilfe des DAPI Filters konnten die gefärbten Zellen kenntlich gemacht werden.

Der FITC Filter hingegen wurde für die Darstellung der γ -H2AX Foci, die als hell leuchtende Punkte in der Zelle sichtbar waren, verwendet. Bei einer Vergrößerung von x60 wurden die Foci manuell gezählt, dabei musste in der optischen Z-Achse des Mikroskops durch die unterschiedlichen Ebenen des Zellkerns fokussiert werden. Für die Quantifizierung der γ -H2AX Foci wurde die Verteilung der Foci pro Zelle ausgewertet. Insgesamt wurden jeweils pro Schnitt entweder 80 Zellen pro Untersuchungszeitpunkt/-dosis, oder mindestens 40 Foci gezählt. Da es auch spontan zum Auftreten von DSBs kommen konnte, wurden in den unbestrahlten Kontrollgruppen an die 1000 Zellen ausgezählt, um auf die erforderlichen Anzahlen von Foci zu kommen.

3. Ergebnisse:

3.1 Kontrollmessung anhand unbestrahlter Proben

Ein Auftreten von DSBs kann nicht nur durch ionisierende Strahlen, sondern auch durch andere Noxen oder spontan auftreten. Um dieses Ereignis besser einschätzen zu können, wurden zu jedem Experiment unbestrahlte Kontrollgruppen untersucht und deren γ -H2AX Foci ausgewertet. Die Anzahl der Foci pro Zelle belief sich bei den C57/BL6 Mäusen auf 0,0405 Foci pro Zelle, bei den BALB/c Mäusen auf 0,039 Foci pro Zelle und bei den SCID Mäusen auf 0,038 Foci pro Zelle. Der Standardfehler betrug 0,01 Foci pro Zelle. Dabei zeigten sich keine Unterschiede in den unbestrahlten Kontrollen der 3 Mausstämme, so dass bei den folgenden Auswertungen der Hintergrund nicht berücksichtigt wurde.

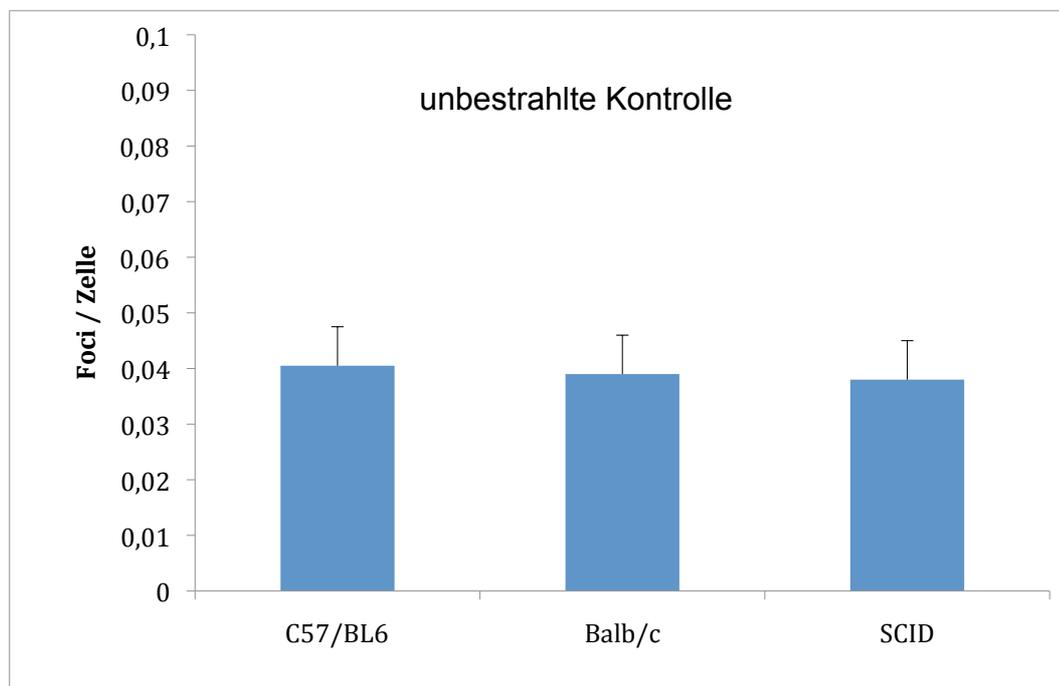


Abbildung 16: Darstellung der Foci pro Spermatozyt bei unbestrahlten C57/BL6, BALB/c und SCID-Mäusen

3.2. Dosiskorrelation nach Bestrahlung

Im ersten Teil dieser experimentellen Arbeit wurden C57/BL6- BALB/c- und SCID-Mäuse mit Einzeldosen von 0,1 Gy, 0,5 Gy und 1 Gy zur Evaluierung der Dosis-Wirkungsbeziehung bestrahlt. Die Mäuse wurden im Anschluss an die Bestrahlung im Labor für molekulare Radioonkologie nach 30 Minuten getötet und deren Organe und Blut asserviert.

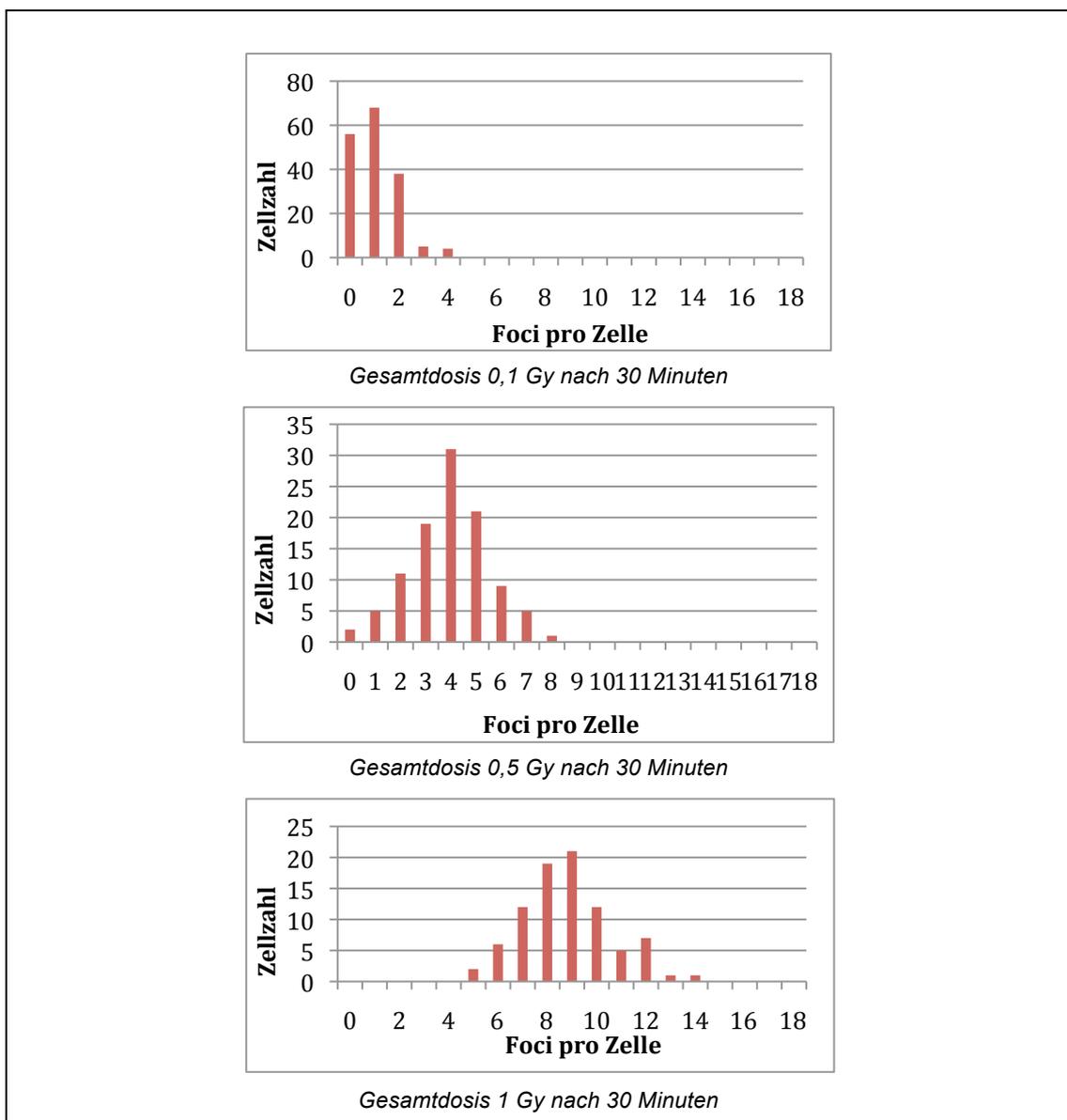


Abbildung 17: Darstellung der Verteilung anhand der Dosiskorrelation von Spermatozyten der SCID-Mäuse mit Einzeldosen von 0,1 Gy, 0,5 Gy und 1 Gy.

Zur Evaluierung der erfassten Ergebnisse wurden der Mittelwert und Standardfehler für die jeweiligen Verteilungen ermittelt. Abbildung 18 zeigt exemplarisch eine Verteilung von γ -H2AX Foci pro Spermatozytenzelle einer SCID-Maus 30 Minuten nach Applikation einer Gesamtdosis von jeweils 0,1 Gy, 0,5 Gy bzw. 1 Gy.

Nach einer Applikation von 0,1Gy und einer Induktionszeit von 30 Minuten wurden 1,02 γ -H2AX Foci pro Zelle bei SCID-Zellen der Testis beobachtet; nach Applikation einer Dosis von 0,5 Gy bzw. 1 Gy und einer Induktionzeit von 30 Minuten 3,94 γ -H2AX Foci pro Zelle bzw. 9,05 γ -H2AX Foci pro Zelle.

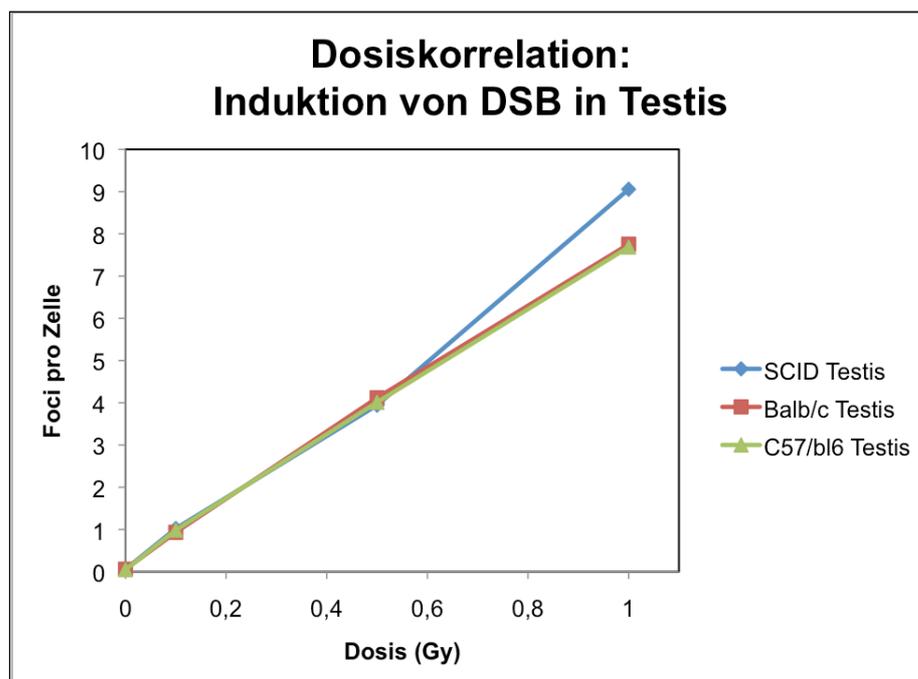


Abbildung 18: Dosiskorrelation; Abhängigkeit zwischen Dosis und Anzahl der Foci pro Spermatozyt.

Bei Untersuchungen der C57/BL6 und BALB/c Zellen der Spermatozyten zeigten diese ebenfalls eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen Dosis und Auftreten von γ -H2AX Foci im Zellkern (siehe Abbildung 18). Bei C57/BL6 Mäusen wurde nach 0,1Gy 0,98 Foci pro Zelle, nach 0,5Gy 4,01 Foci pro Zelle und nach 1 Gy 7,68 Foci pro Zelle beobachtet.

Bei BALB/c Mäusen wurden nach 0,1 Gy 0,93 Foci pro Zelle, nach 0,5 Gy 4,11 Foci pro Zelle und nach 1 Gy 7,75 Foci pro Zelle beobachtet.

Nach Applikation einer Gesamtdosis von 0,1 Gy und 0,5 Gy zeigte sich zwischen den unterschiedlichen Mausstämmen kein Unterschied in der Induktion von γ -H2AX Foci. Nach einer Gesamtdosis von 1 Gy zeigte sich ein Trend zur einer erhöhten Induktion von γ -H2AX Foci bei SCID-Mäusen.

Im Rahmen des Projektes wurden periphere Lymphozyten aus dem Blut der Mäuse asserviert und ebenfalls mit Hilfe der γ -H2AX Methode gefärbt.

Nach Applikation einer Gesamtdosis von 0,5 Gy konnte beim SCID-Mausstamm 4,73 Foci pro Zelle und nach 1 Gy 8,87 Foci pro Zelle festgestellt werden. Beim C57/BL6 Mausstamm waren es nach 0,5 Gy 4,60 Foci pro Zelle und nach 1 Gy 7,61 Foci pro Zelle. Beim BALB/c Mausstamm waren es nach 0,5 Gy 4,02 Foci pro Zelle und nach 1 Gy 7,27 Foci pro Zelle (siehe Abbildung 19). Auch hier zeigte sich eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen der Dosis und dem Auftreten von γ -H2AX Foci.

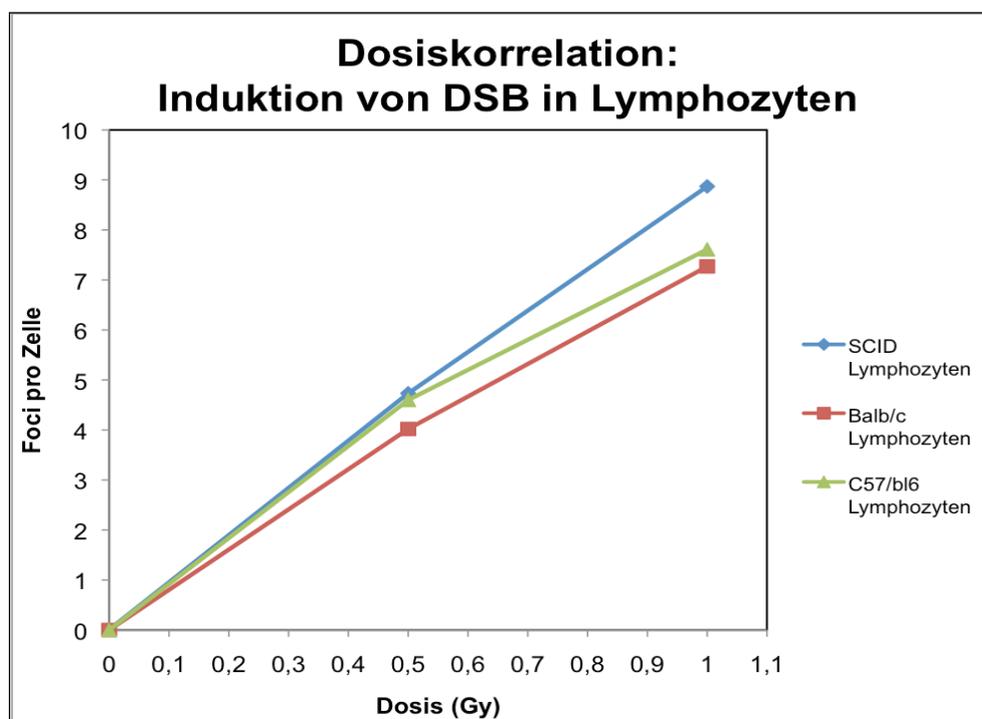


Abbildung 19: Dosiskorrelation; Abhängigkeit von Dosis und Anzahl der Foci pro Lymphozytenzelle.

Abbildung 20 zeigt repräsentative γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen am Beispiel des C57/BL6 Mausstamms nach Bestrahlung mit Einzeldosen von 1 Gy, 2 Gy und 4 Gy sowie eine unbestrahlte Kontrolle (links oben). Für die Auswertungen wurden die Spermatozyten der 2. Ordnung analysiert.

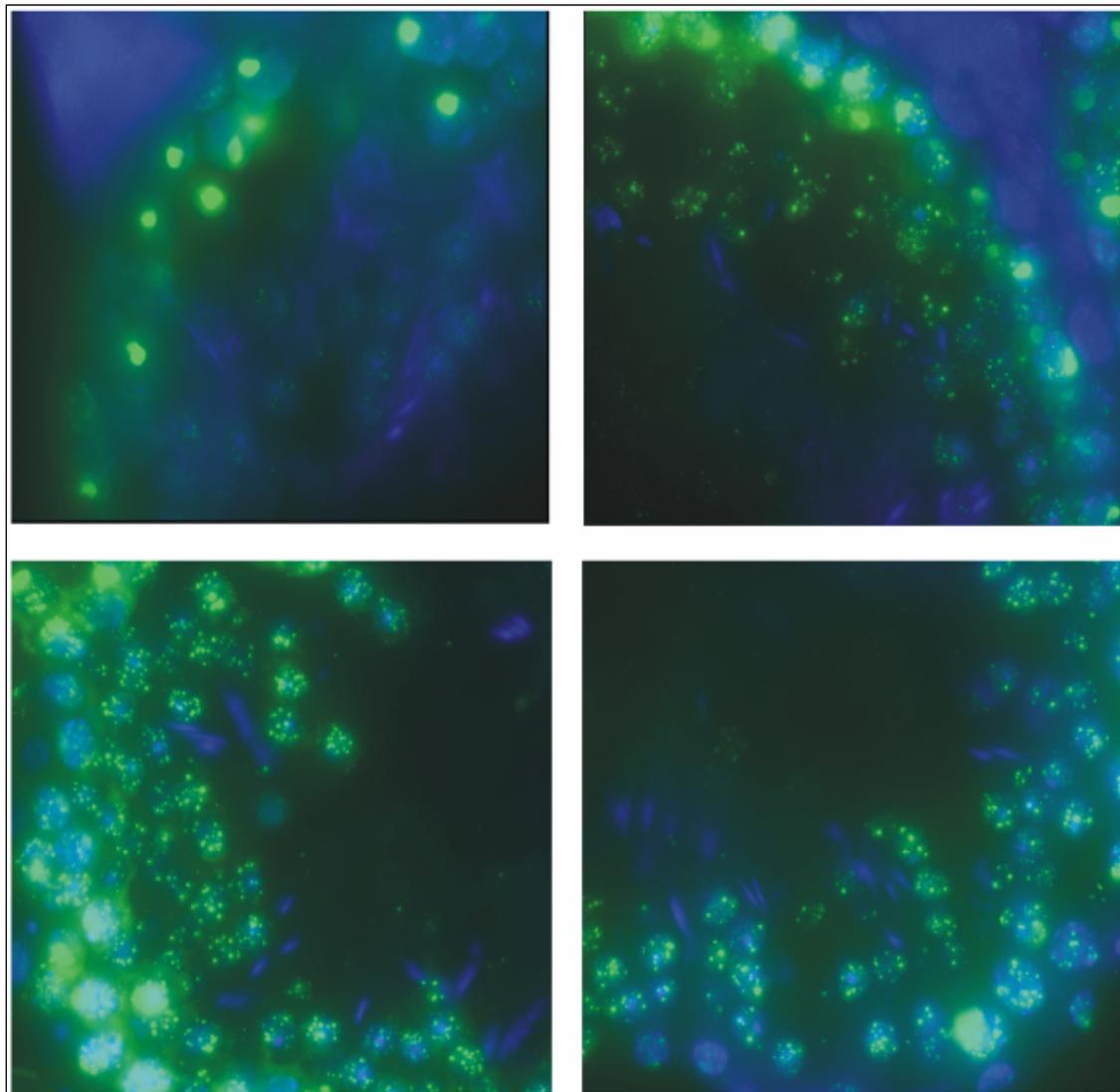


Abbildung 20: γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung im Tubulus seminiferus am Beispiel einer C57/BL6 Maus zur Dosiskorrelation.

3.3 DNA-Doppelstrangbruch Reparaturkinetik nach Bestrahlung:

Im weiteren Teil dieser Arbeit wurden die bereits beschriebenen Mausstämme mit einer in der Strahlentherapie gängigen Einzeldosis von 2 Gy bestrahlt. Nach fixen Zeitpunkten (0,5h, 2,5h, 5h, 24h und 48h) wurden die Spermatozyten und Lymphozyten der Mäuse hinsichtlich ihrer Induktion und Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe der γ -H2AX Methode untersucht. Eine Kontrollgruppe für jeden Mausstamm wurde unbestrahlt untersucht.

Abbildung 21 und 22 gibt die γ -H2AX Foci pro Zelle der unterschiedlichen Mausstämme für Spermatozyten und periphere Lymphozyten an, in Abhängigkeit von der Zeit. Nach der Induktion (0,5h nach Bestrahlung) waren bei den Spermatozyten der C57/BL6 Mäuse $9,05 \pm 0,6$ Foci pro Zelle zu beobachten. Bei den BALB/c Mäusen waren es $10,49 \pm 0,65$ Foci pro Zelle und bei den SCID Mäusen $12,22 \pm 0,46$ Foci pro Zelle. Nach 2,5 Stunden waren es bei den Spermatozyten der C57/BL6 Mäuse $6,45 \pm 0,28$ Foci pro Zelle, bei denen der BALB/c Mäuse $7,22 \pm 0,73$ Foci pro Zelle und bei denen der SCID Mäuse $8,70 \pm 0,20$ Foci pro Zelle. Nach 5 Stunden waren es bei den Spermatozyten der C57/BL6 Mäuse $4,46 \pm 0,11$ Foci pro Zelle, bei denen der BALB/c Mäuse $4,86 \pm 0,55$ Foci pro Zelle und bei denen der SCID Mäuse $6,70 \pm 0,16$ Foci pro Zelle zu beobachten. Nach einem anfänglichen starken Abfall der γ -H2AX Foci nach 5 Stunden, zeigte sich im weiteren Verlauf der Abfall weniger stark ausgeprägt.

Nach 24 Stunden zeigte sich bei den Spermatozyten der C57/BL6 Mäuse $1,97 \pm 0,24$ Foci pro Zelle, bei denen der BALB/c Mäuse $2,72 \pm 0,23$ Foci pro Zelle und bei denen der SCID Mäuse $4,78 \pm 0,57$ Foci pro Zelle. Nach 48 Stunden bei den Spermatozyten der C57/BL6 Mäuse $1,04 \pm 0,07$ Foci pro Zelle, bei denen der BALB/c Mäuse $1,83 \pm 0,21$ Foci pro Zelle und bei denen der SCID Mäuse bei $3,14 \pm 0,63$ Foci pro Zelle.

Bei den Untersuchungen der peripheren Lymphozyten waren nach Induktion bei den C57/BL6 Mäusen $12,82 \pm 0,45$ Foci pro Zelle, bei den BALB/c Mäusen $13,33 \pm 0,73$ Foci pro Zelle und bei den SCID Mäusen $18,78 \pm 0,90$ Foci pro Zelle beobachtet worden. Nach 2,5 Stunden bei den C57/BL6 Mäusen $8,44 \pm 0,31$ Foci pro Zelle, bei den BALB/c Mäusen $8,36 \pm 0,56$ Foci pro Zelle und bei den SCID Mäusen $15,05 \pm 1,16$ Foci pro Zelle. Nach 5 Stunden wurden bei den C57/BL6 Mäusen $4,14 \pm 0,30$ Foci pro Zelle, bei den BALB/c Mäusen $5,18 \pm 0,34$ Foci pro Zelle und bei den SCID Mäusen $11,31 \pm 1,08$ Foci pro Zelle beobachtet. Ebenso wie bei den Untersuchungen der Spermatogonien zeigte sich bei den peripheren Lymphozyten ein schneller Rückgang der γ -H2AX Foci innerhalb der ersten 5 Stunden.

Nach 24 Stunden wurden in den peripheren Lymphozyten der C57/BL6 Mäuse $0,95 \pm 0,24$ Foci pro Zelle, bei den BALB/c Mäusen $1,95 \pm 0,21$ Foci pro Zelle und bei den SCID Mäusen $8,11 \pm 0,50$ Foci pro Zelle beobachtet. Nach 48 Stunden bei den peripheren Lymphozyten der C57/BL6 Mäuse noch $0,47 \pm 0,05$ Foci pro Zelle, bei den BALB/c Mäusen $0,70 \pm 0,14$ Foci pro Zelle und bei den SCID Mäusen $6,77 \pm 0,16$ Foci pro Zelle. Der Rückgang der γ -H2AX Foci nach 5 Stunden war insgesamt langsamer als in den kurzen Zeitpunkten (0,5 h, 2,5 h und 5 h) nach der Bestrahlung.

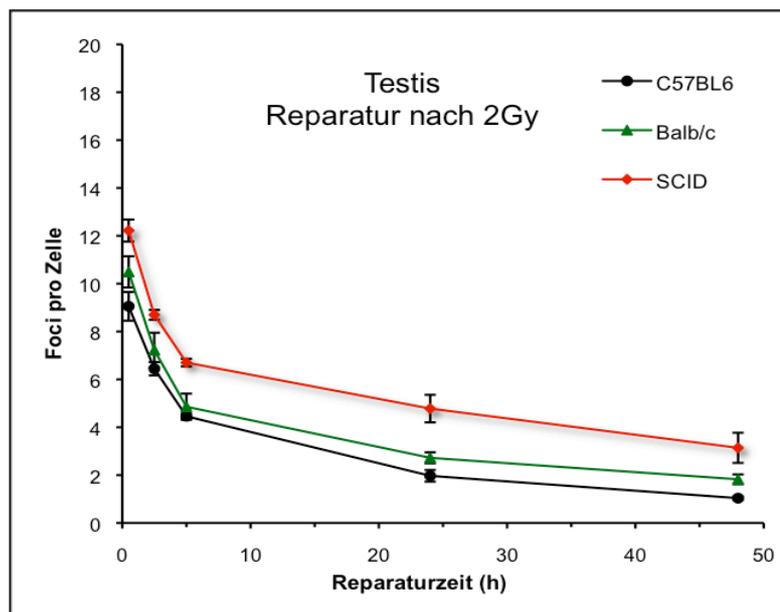


Abbildung 21: Bestrahlung mit 2 Gy Einzeldosis bei 3 Mausstämmen (C57/BL6, BALB/c, SCID) und Reparaturzeiten von 0,5 h, 2,5 h, 5 h, 24 h und 48 h von Spermatozyten. Darstellung der Anzahl der Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit. Der Standardfehler wird über die Fehlerbalken angegeben.

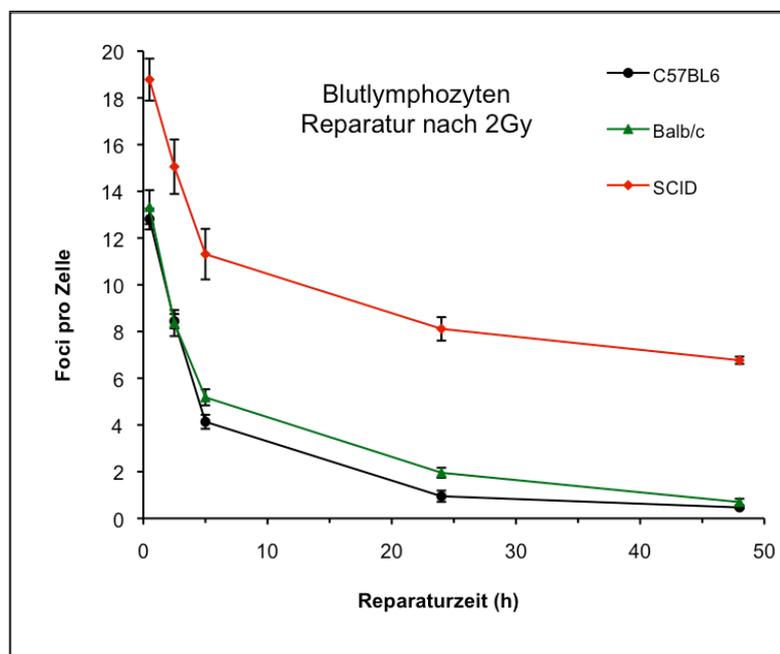


Abbildung 22: Bestrahlung mit 2 Gy Einzeldosis bei 3 Mausstämmen (C57/BL6, BALB/c, SCID) und Reparaturzeiten von 0,5 h, 2,5 h, 5 h, 24 h und 48 h von Spermatozyten. Darstellung der Anzahl der Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit. Der Standardfehler wird über die Fehlerbalken angegeben.

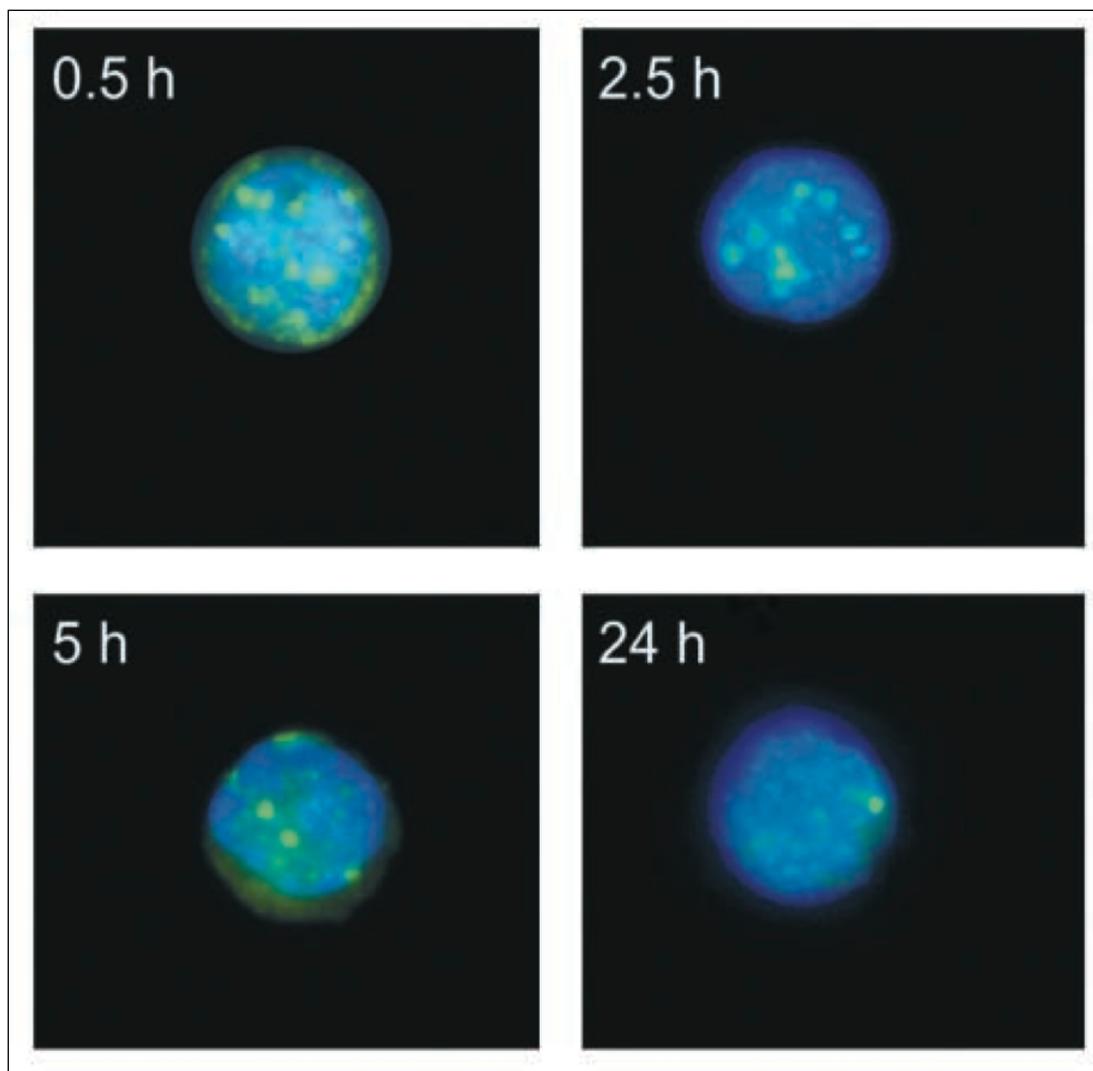


Abbildung 23: γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung in Lymphozyten von Mäusen nach Applikation einer Gesamtdosis von 2 Gy in vivo und unterschiedlichen Zeitpunkten (0,5h, 2,5h, 5h und 24h) (Rübe et al., 2008).

Abbildung 23 zeigt exemplarisch jeweils einen Blutlymphozyten einer C57/BL6 Maus nach Bestrahlung von 2 Gy. Nach 0,5 h zeigen sich eine Vielzahl von γ -H2AX Foci (gelb-grünliche Punkte) im blauen Zellkern. Ein deutliches Nachlassen der γ -H2AX Foci ist nach 2,5 h, 5 h und 24 h zu beobachten.

Für die Induktion von DSBs konnte eine klare lineare Dosiskorrelation für γ -H2AX Foci der unterschiedlichen Mausstämmen sowohl bei den peripheren Lymphozyten als auch bei den Spermatozyten beobachtet werden mit nur einem äußerst geringen Hintergrund in den Kontrollgruppen. Durch Auszählen des Verlustes an γ -H2AX Foci über die Zeit können die genetischen DNA Reparaturdefizite der SCID und auch der BALB/c Mäuse dargestellt werden. Reparaturprofiziente C57BL/6 Mäuse hingegen zeigten einen sehr schnelle Abnahme an γ -H2AX Foci und nur noch residuelle Schäden 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung. Im Gegensatz hierzu zeigten SCID Mäuse eine höhere Anzahl an γ -H2AX Foci bei allen untersuchten Zeitpunkten. Auch die radiosensiblen BALB/c Mäuse zeigten eine leichte Erhöhung an γ -H2AX Foci im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen bei allen Zeitpunkten bei den Spermatozyten jedoch nicht bei den Lymphozyten. Nach 48 Stunden glich sich die Reparaturkapazität von C57BL/6 Mäusen und BALB/c Mäusen bei peripheren Lymphozyten an, wohingegen bei den Spermatozyten weiterhin eine höhere Anzahl an Foci nach 48 Stunden verblieben.

Residuelle Schäden sind im direkten Vergleich zwischen somatischen Zellen und männlichen Keimzellen nach 24 und 48 Stunden bei den Spermatozyten höher als bei den peripheren Lymphozyten. Eine Ausnahme stellen die SCID Mäuse dar. Ihre residuellen Schäden nach 24 und 48 Stunden sind in peripheren Lymphozyten höher als in Spermatozyten.

Somatische Zellen ohne stärkere Reparaturdefizite (C57/BL6 und BALB/c) reparieren DNA Schäden in kurzer Zeit suffizient, Keimzellen hingegen verzeichnen noch leichte Schäden.

Mögliche Einflüsse auf die vorliegenden Ergebnisse sind einerseits auf die unterschiedlichen Mechanismen von HR und NHEJ und andererseits auf die Art und Komplexität des DNA-Reparaturdefizites zurückzuführen.

4. Diskussion:

4.1 Quantifizierung von DNA Doppelstrangbrüchen mit der γ -H2AX Methode und Zeitpunkt der Quantifizierung

Zur Quantifizierung von DNA Doppelstrangbrüchen sind mehrere Nachweisverfahren etabliert. Eine frühe Methode war die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), eine direkte Methode zum Nachweis von DNA Fragmenten nach Bestrahlung. Für diesen Nachweis waren jedoch sehr hohe Dosen von über 40 Gy nötig, um Unterschiede in der Fragmentierung zu erkennen. Weitere Methoden, wie die Chromosomenanalysen zum Nachweis von Dizentrischen Chromosomen (Stephan et al., 2007), konnten Schäden auch bei niedrigeren Dosen von 100 mGy nachweisen. Ein Nachteil dieser Methode war, dass nicht jeder DNA Doppelstrangbruch unweigerlich in einen Chromosomenabbruch mündet. Einen ersten Überblick über das Reparaturverhalten bei sehr niedrigen Dosen konnte erst über die indirekte Quantifizierung von DNA Doppelstrangbrüchen mit Hilfe der γ -H2AX Methode, dem Nachweis von phosphorylierten H2AX im Bereich des DNA Schadens, erfolgen. Experimente konnten dabei die Korrelation zwischen Dosis und Anzahl der γ -H2AX Foci erstmalig herstellen (Rogakou et al., 1999; Sedelnikova et al., 2002; Rothkamm und Löbrich, 2003) und die Sensitivität deutlich erhöhen. Mit Hilfe dieser Methode liegt die Nachweisgrenze von DNA Doppelstrangbrüchen im Bereich von 1 mGy. Auch wenn man heute nicht mehr davon ausgeht, dass γ -H2AX die erste Antwort/Signal auf einen DNA Schaden ist, ist deren Auftreten in einem engen Zusammenhang mit dem Ereignis des Doppelstrangbruchs zu sehen. Für die Analysen ist festzuhalten, dass für die γ -H2AX Methode das Vorhandensein von H2AX als Histon unabdingbar ist.

In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich während der Spermio-genese eine Remodulierung der Histone als Packungsstruktur der DNA vollzieht.

Der Austausch von Histonen zu Protaminen lässt den Verlust von γ -H2AX Foci in elongierten Spermatiden erklären.

Nach zeitintensiver Etablierung der Immunfluoreszenz-Färbung mit γ -H2AX zeigte sich der Prozess weiterhin anfällig für Fehler. Insbesondere die Permeabilität der Zellen und die Freilegung der Antigene und Antikörperbindung stellten im weiteren Verlauf der Arbeit eine stetige Herausforderung dar.

Des Weiteren zeigte sich die manuelle Auszählung als sehr zeitintensiv und war nach internen Untersuchungen vom jeweiligen Untersucher abhängig. Es wurden daraufhin interne Kriterien für die Durchführung der Zählung festgelegt. So wurden die Proben anfänglich doppelt ausgezählt. Für die Ergebnisse wurde jeweils der Mittelwert jeder einzelnen Zählung ermittelt und für den Vergleich der Ergebnisse herangezogen.

Die Unterschiede bezüglich der Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen zwischen den somatischen Zellen und den Gewebezellen sind mit der Art der histologischen Aufbereitung zu erklären. Die Lymphozyten liegen als einzelne ganze Zelle vor. Die asservierten Gewebe sind in 4 μ m große Schnitte geschnitten. Folglich sind einige Zellen angeschnitten und damit die DNA Doppelstrangbrüche ebenfalls nur teilweise erfasst. Für die Analyse der Gewebeschnitte galt, dass γ -H2AX Foci in den Zellen in mehreren Ebenen des Mikroskops sichtbar sein mussten, um diese für die Auswertung zu benutzen. Eine geringe Induktion ist damit durch die Unterschätzung der γ -H2AX Foci zu erklären.

Um die Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen zu detektieren, wurden die vorliegenden Daten von Bonner et al. 2008 und Rogakou et al. 1998 zugrunde gelegt.

Diese Daten zeigen bereits nach wenigen Minuten eine Induktion von γ -H2AX Foci, die sich nach ca. 30 Minuten maximal ausgeprägt hatten. Aufgrund der erforderlichen Zeit für die Gewebegewinnung und Tötung der Tiere lag die Wahl von 30 Minuten nahe.

Die Tiere wurden erst nach Bestrahlung anästhesiert und der Einfluss der Organentnahme nach 30 Minuten war nicht so ausgeprägt wie nach 10 Minuten.

Voruntersuchungen zu dieser Arbeit konnten ähnliche Ergebnisse bezüglich früherer Induktionszeiten und auftreten von Foci zeigen und somit die Ergebnisse von Bonner et al. und Rogakou et al. nachvollziehen.

4.2 γ -H2AX – Grenzen der Immunofluoreszenz-Färbung

DNA- Doppelstrangbrüche stellen die wichtigsten strahleninduzierten Läsionen dar und die Beeinträchtigung der Reparatur korreliert mit der Radiosensitivität der Zellen. Im Vergleich zu den physikalischen Methoden z.B. der PFGE, wo nicht-physiologische Dosen benötigt werden, um DNA Fragmente zu detektieren, ist die γ -H2AX Immunofluoreszenz-Färbung in der Lage auch in Bereichen unterhalb von 5 Gy verlässliche Aussagen über die DNA Reparatur zu treffen. Es gibt eine sehr enge Korrelation zwischen γ -H2AX Formationen und Anzahl von DSBs und zwischen der Abnahme an γ -H2AX Foci und der DNA Reparatur. Allerdings können γ -H2AX Foci ebenfalls durch Einzelstrangbrüche (ssDNA) nach Aktivierung der ATR Kinasen entstehen (Löbrich et al., 2010). Somit repräsentieren γ -H2AX Foci nicht zwangsläufig DSBs. Des Weiteren repräsentiert die γ -H2AX Analyse eine lediglich indirekte Methode zur Detektierung von DSBs und genetische Faktoren können sowohl die Entstehung von γ -H2AX Foci als auch die Dephosphorylierung nach Reparatur beeinflussen. Zuletzt korreliert die Zeit bis zur Abnahme der Foci nicht komplett mit der DSB Reparatur.

Derzeit ist noch unklar, ob die Abnahme sichtbarer Foci mit dem letzten Schritt des Wiederverbindungsprozesses der DNA Reparatur einhergeht oder ob eine Verzögerung von einigen Stunden besteht, die zur vollständigen Rekonstruktion der Chromatinstruktur benötigt wird (Kinner et al., 2008). Solange man diese Unsicherheiten in der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt, stellte die γ -H2AX Immunofluoreszenz-Färbung eine sensible Nachweismethode im physiologischen Dosisbereich dar.

4.3 γ -H2AX im Kontext der Chromatinstruktur

Die Chromatinstruktur unterliegt ständigen dynamischen Veränderungen und scheint eine hohe Bedeutung für die Erkennung und Prozessierung von DNA Schäden zu besitzen. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass dynamische Veränderungen der Chromatinstruktur, sowie lokale Proteinmodifikationen den Reparaturproteinen erst den Zugang zum DNA Schaden ermöglichen. Grundsätzlich werden zwei unterschiedliche Strukturen hierbei hervorgehoben. Das Euchromatin als Bereich des aufgelockerten Chromatingerüsts in dem sich, aufgrund der weniger gepackten Form, die meisten Gene und Genaktivität befinden und das Heterochromatin als Bereich, welcher stark an Histone und Proteine gebunden ist. Diese strukturelle Barriere des Heterochromatins scheint maßgeblich an der Detektion von DSBs beteiligt zu sein, da erst durch Prozessierung chromatin-modifizierender Proteinen die DNA Reparatur ablaufen kann. (Rübe et al., 2011).

Hierbei stellt die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) im Gegensatz zur Immunfluoreszenz-Mikroskopie eine neue hochauflösende Methode dar, um intranukleäre Prozesse wie die Chromatin-Modifikation während und nach dem DNA Reparaturprozessen besser zu verstehen.

Erste Ergebnisse mit Gold-markierten Reparaturproteinen des NHEJ, wie Ku70-Ku80 Heterodimer und 53BP1 konnten zeigen, dass die Sensitivität zur Detektion von DSBs gegenüber den lichtmikroskopischen Immunofluoreszenz-Methoden deutlich überlegen ist (Rübe et al., 2011; Lorat et al., 2012). Es markierten sich bei der TEM DSBs die lichtmikroskopisch nach γ -H2AX Immunofluoreszenz-Färbung nicht sichtbar waren. Es wurden im Durchschnitt lediglich 8 Foci pro Gray bei der Immunofluoreszenz Färbung detektiert was sich mit vorangegangenen Untersuchungen deckte. Die Daten zur PFGE bei humanen Zellen zeigte hingegen eine deutlich erhöhte Anzahl von ca. 35-40 DSBs pro Nukleus pro Gray was zunächst auf den geringeren DNA Gehalt der Mauszellen zurückgeführt wurde.

Bei der TEM Analyse fanden sich 28 53BP1-Kluster pro Nukleus pro Gray was ungefähr den Daten der PFGE entsprach. Darüber hinaus offenbarte die TEM Analyse, dass die untersuchten Proteine, die strahleninduzierte DSBs reparieren, sich nicht gleichmäßig über den gesamten Zellkern verteilen, sondern ausschließlich im Heterochromatin vorkommen.

Weitere Untersuchungen werden in Zukunft die Zusammenhänge zwischen Chromatinstruktur im Euchromatin und Heterochromatin und der DNA-Reparatur Antwort näher untersuchen.

4.4 Unterschiede in der DNA Reparaturkinetik zwischen reparatur-suffizienten C57/BL6 und defizienten BALB/c und SCID Mäusen in männlichen Keimzellen und peripheren Lymphozyten

Die Ziele dieser Untersuchung war einerseits, durch ein besseres Verständnis für die Reparaturkapazität somatischer Zeller und Keimzellen, einen Prädiktor für die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit normaler Gewebe zu ermitteln, andererseits den *in vivo* Nachweis von DSB Reparatur profizienter und defizienter Mausstämmen nach Bestrahlung.

In unseren Untersuchungen wurden C57/BL6, BALB/c und SCID Mäuse mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten, bis zu 48 Stunden wurden die Tiere getötet, um ihre Blutlymphozyten als Beispiel einer somatischen Zelle und die Spermatozyten als Beispiel einer Keimzelle auf ihre DNA-Reparaturkinetik hin zu untersuchen. Sowohl bei den männlichen Keimzellen als auch bei den somatischen Zellen konnte gezeigt werden, dass es zu einer verlangsamten Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen und zu einer erhöhten Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen bei SCID Mäusen im Vergleich zu C57/BL6 Mäusen kam. Die Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen lag bei den Lymphozyten um ca. 46% höher und bei den männlichen Keimzellen um 35%. 48 Stunden nach Bestrahlung waren bei den männlichen Keimzellen noch ca. 25% residuelle γ -H2AX Foci und bei den Lymphozyten noch ca. 36% residuelle γ -H2AX Foci nachweisbar. Bei den BALB/c Mäusen kam es im Verlauf der DNA Reparaturkinetik zur einer Verlangsamung der Reparatur. Die Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen zeigte sich hierbei im Vergleich zu den C57/BL6 Mäusen nahezu gleich.

Ein leichter Trend zu einer erhöhten Induktion bei BALB/c Mäusen war zu erkennen, jedoch nicht signifikant. Im Verlauf der DNA Reparaturkinetik zeigte sich jedoch bei den Zeitpunkten 5 Stunden und 24 Stunden nach Bestrahlung im Vergleich zu den C57/BL6 Mäusen ein leichter Unterschied. Dieser Unterschied wiederum ging bei den somatischen Zellen nach 48 Stunden wieder verloren und manifestierte sich nur bei den männlichen Keimzellen im Vergleich zu den Zellen der C57/BL6 Mäuse mit einer Erhöhung von γ -H2AX Foci nach 48 Stunden. Dieser Unterschied könnte auf eine verminderte Reparaturkapazität der männlichen Keimzellen zurückzuführen sein.

Es ist zu vermuten, dass der Unterschied der BALB/c Mäuse zu den der C57/BL6 Mäuse im weiteren Verlauf nach z.B. 72 Stunden einen Ausgleich gefunden hätte. Da die Untersuchungszeiträume auf 48 Stunden beschränkt waren, sind diese Vermutungen nicht belegbar.

Unsere Untersuchungen konnten somit im Gegensatz zu den bisherigen Daten bei denen kein Unterschied in der Reparaturkinetik von Wildtyp Mäusen und SCID Mäusen gefunden wurden (Hamer et al. 2003) bezüglich der Induktion und Reparaturkinetiken Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen festgestellt werden.

4.5 Unterschiedliche Expression von DNA Reparaturproteinen in männlichen Keimzellen

In mehreren experimentellen Arbeiten wurden die unterschiedlichen Expressionsmuster der bekannten Reparaturproteine bereits untersucht (Hamer et al. 2003, Goedecke et al. 1999, Ahmed et al. 2007). Es zeigte sich eine große Varianz bei den männlichen Keimzellen, jeweils abhängig vom Stadium der meiotischen Teilung im Vergleich mit denen der somatischen Zellen. MRE11, als Sensor-Protein für die DNA-Doppelstrangbrüche, und KU70, als Schlüsselprotein, spielen bei den somatischen Zellen eine große Rolle. Im Vergleich hierzu ist MRE11 in frühen Spermatozyten sehr stark exprimiert. KU70 hingegen weist keine Expression in diesen Zellen auf und scheint somit keine Rolle während der meiotischen Rekombination und unterschiedlicher Regulation von Reparaturproteinen in meiotischen Zellen zu spielen (Goedecke et al., 1999; Hamer et al., 2003).

Auch die DNA-PK_{cs} als wichtiges Regulationsprotein in der DNA Reparatur des nicht homologen End-Joining wird in den runden Spermatozyten nicht exprimiert (Hamer et al., 2003), obwohl das NHEJ der wichtigste Reparaturmechanismus bei diesen haploiden Zellen darstellt.

Auf der anderen Seite sind einige der bereits bei somatischen Zellen vorkommenden Reparatur- oder Regulationsproteine wie ATM, CHK2 und H2AX auch in frühen Spermatozyten vorhanden, in denen im Rahmen der meiotischen Rekombination DNA-Doppelstrangbrüche auftreten können (Bartkova et al., 2005). Wie sich anhand weniger Beispiele zeigen lässt, folgt die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen in männlichen Keimzellen nicht unbedingt der von somatischen Zellen.

Weitere Untersuchungen in der Expression von MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1), γ -H2AX und 53BP (P53 binding protein) weisen auf weitere Unterschiede in der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen in männlichen Keimzellen hin (Ahmed et al., 2007).

MDC1 interagiert mit γ -H2AX nach Entstehung eines DNA Doppelstrangbruchs und führt zu einer Etablierung eines γ -H2AX Clusters am Bruchende (Goldberg et al., 2003; Stewart GS et al., 2003). Eine Kolokalisierung von MDC1 und γ -H2AX während der meiotischen Teilung scheint den Regeln der mitotischen Teilung zu folgen und ist in Stadien der Prophase I (Leptotän) und in späteren Entwicklungsstufen der Spermatozyten sowie runden Spermatiden zu finden. Keine Expression von MDC1 ist in Spermatogonien und in Zellen im Stadium des frühen Pachytän der meiotischen Teilung zu finden (Ahmed et al., 2007).

53BP1 wiederum wird in Spermatogonien und präleptotänen Stadium der Spermatozyten exprimiert und ist kolokalisiert mit γ -H2AX (Ahmed et al., 2007). In mehreren Studien an somatischen Zellen konnte gezeigt werden, dass 53BP1 eine Rolle beim nicht homologen End-Joining nicht aber bei der homologen Rekombination spielt (Nakamura K et al., 2006).

Während der meiotischen Teilung wird 53BP1 nicht exprimiert und scheint für den Prozess der meiotischen Rekombination nicht benötigt zu werden. Die Abwesenheit von 53BP1 und KU70 während der meiotischen Prophase I weist auf eine Anwesenheit des NHEJ hin (Nakamura et al., 2006; Ward et al., 2003).

4.6 Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen in männlichen Keimzellen im Vergleich zu somatischen Zellen

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnten nicht nur die Unterschiede zwischen den einzelnen Mausstämmen und ihrer DNA Kapazität gezeigt werden, sondern auch die Unterschiede zwischen den Reparaturkapazitäten somatischer Zellen und männlicher Keimzellen im *in vivo* Mausmodell.

In vorangegangenen Untersuchungen der Spermiogenese konnten innerhalb weniger Minuten nach Bestrahlung bereits γ -H2AX Foci und MDC1 Foci beobachtet werden. Ihre maximale Ausprägung waren 30 Minuten nach Bestrahlung erreicht (Bonner et al., 2008). γ -H2AX Foci konnten in Spermatogonien und allen anderen prä- und postmeiotischen Phasen, mit Ausnahme der elongierten Spermatiden, beobachtet werden. Eine Abnahme von 40% von γ -H2AX und 53BP1 Foci war 16 Stunden nach Bestrahlung in Spermatogonien und präleptotänen Spermatozyten festzustellen. Eine Reduktion von 70% war hingegen bei runden Spermatiden und postmeiotischen Spermatozyten zu beobachten (Ahmed et al., 2007).

Die Reparaturkapazität von Spermatogonien und runden Spermatiden im Vergleich zu somatischen Zellen (z.B. Nierenzellen), wurde in weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe analysiert. Zu festgelegten Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit γ -H2AX und 53BP1 durchgeführt und die Anzahl der Foci im Vergleich zu denen von somatischen Zellen evaluiert.

Im Vorfeld konnte bereits gezeigt werden, dass somatische Zellen eine sehr schnelle Abnahme der Anzahl der Foci mit der Zeit aufweisen und nur noch geringe Restschäden nach 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung zurückbehalten (Rübe et al., 2008, 2010).

DNA-DSBs in Spermatogonien und runden Spermatiden hingegen zeigten nach 24 und 48 Stunden jeweils eine signifikante höhere Anzahl von Rest-Foci nach Bestrahlung.

Hierbei konnte bestätigt werden, dass die langsame DNA-Reparatur runder Spermatoziden unabhängig von dem DNA-PK abhängigen NHEJ ist (Ahmed et al., 2010; Rube et al., 2010). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Reparatur von DNA-DSBs in Spermatoziden und runden Spermatoziden im Vergleich zu somatischen Zellen unterschiedlich reguliert wird. In somatischen Zellen werden DSBs im direkten Vergleich vorwiegend über das DNA-PK abhängigen NHEJ repariert.

Es wird vermutet, dass die ausgedehnte Remodulierung der Chromatinstruktur während der Spermiogenese, in der eine Vielzahl von Histonen durch keimzell-spezifische Proteinen ausgetauscht werden, einen großen Einfluss auf die Reparaturmechanismen und deren Proteine hat.

4.7 Klinische Relevanz der Untersuchung

Unsere Ergebnisse belegen, dass die Quantifizierung von γ -H2AX Foci in verschiedenen Geweben eine empfindliche Methode für den Nachweis der Induktion und Reparatur von strahleninduzierten DSBs bei klinisch relevanten Dosen *in vivo* darstellt. Die Kinetiken von γ -H2AX Foci in Testis waren ähnlich denen von peripheren Lymphozyten. Eine Blutprobe zum Screenen der DSB-Reparatur könnte somit als Prädiktor für die klinische Strahlenempfindlichkeit genutzt werden. Die Unterschiede zwischen Keimzellen und somatischen Zellen sollten dabei jedoch stets beachtet werden.

5. Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse

DSBs stellen einen der schwersten Schäden der DNA und somit der Integrität des Genoms dar. Je nach Mechanismus erfolgt die fehlerfreie Reparatur oder lediglich die Ligierung des DNA Schadens. Die Reparatur von DSBs dient einerseits der Stabilität des Genoms und damit verminderter Mutagenität und andererseits die Möglichkeit die Teilungsfähigkeit zu erhalten. Anhand dieser Arbeit konnten die *in vivo* DNA-Reparaturkinetiken von reparaturdefizienten und –suffizienten Mausstämmen an somatischen Zellen und männlichen Keimzellen gezeigt werden. Dabei zeigte sich die Reparaturfähigkeit von somatischen Zellen der Reparaturfähigkeit von männlichen Keimzellen überlegen. Diese Unterschiede scheinen auf unterschiedlichen Reparaturmechanismen und deren Proteinkomplexe auf intranukleären Prozessen und Anpassung der Chromatinstruktur während der Meiose zu beruhen.

6. Literatur

Abraham RT. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.*, 15, 2177–2196.

Adler, I-D. (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutation Research*. 352: 169-172

Ahmed, E.A., Van der Vaart, A., Barten, A., Kal, H.B., Chen, J., Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Bartkova, J., Bartek, J., De Boer, P. and De Rooij, D.G. (2007) Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: Lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. *DNA Repair* 6: 1243-1254.

Bakkenist CJ, Kastan MB. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499–506.

Bartkova J, Bakkenist CJ, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Sehested M, Lukas J, Kastan MB, Bartek J. ATM activation in normal human tissues and testicular cancer. *Cell Cycle* 2005; 4: 838-845.

Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Yan C, Alt F. (2002) Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8173–8178

Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y.: GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(12):957-67

Burma S., Chen Benjamin P., Murphy Michael, Kurimasa Akihiro und Chen David J.: ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Biol Chem*. 2001; 276(45): 42462-42467

Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Daniel Camerini-Otero R, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. (2002) Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science* 296: 922–927.

Charles River Laboratories Severe Combined Immunodeficiency 2004

D'Amours, D. und Jackson, S.P. (2002) The MRE11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signaling. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 317-327.

Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1986). *Molecular Cell Biology*. 1.Auflage, New York. Scientific American Books

Davey, C.A. and Richmond, T.J. (2002) DNA-dependent divalent cation binding in the nucleosome core particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11169-11174.

Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W. and Richmond, T.J. (2002) Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. *J Mol Biol.*, 319, 1097-1113.

DiBiase SJ, Zeng ZC, Chen R, Hyslop T, Curran WJ, Jr., Iliakis G. DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res* 2000; 60: 1245-1253.

Durocher D and Jackson SP. (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13, 225–231.

Fernandez-Capetillo Oscar, Chen Hua-Tang, Celeste Arkady, Ward Irene, Romanienko Peter J., Morales Julio C., Naka Kazuhito, Xia Zhenfang, Camerini-Otero R. Daniel, Motoyama Noboru, Carpenter Phillip B, Bonner William M., Chen Junjie, Nussenzweig André :DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol.* 2002; 4(12): 993-997

Furuta Takahisa, Haruyuki Takemura, Zhi-Yong Liao, Gregory J. Aune, Christophe Redon, Olga A. Sedelnikova, Duane R. Pilch, Emmy P. Rogakou, Arkady Celeste, Hua Tang Chen, Andre Nussenzweig, Mirit I. Aladjem, William M. Bonner und Yves Pommier: Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replicationdependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem.* 2003; 278(22): 20303-20312

Gatei M, Zhou BB, Hobson K, Scott S, Young D and Khanna KK. (2001). *J. Biol. Chem.*, 276, 17276–17280.

Goedecke W, Eijpe M, Offenbergh HH, van Aalderen M, Heyting C. Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* 1999; 23: 194-198.

Govin J., Caron C., Lestrat C., Rousseaux S., Khochbin S. (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* 271, 3459–3469.

Hamer G, Roepers-Gajadien HL, van Duyn-Goedhart A, Gademan IS, Kal HB, van Buul PP, Ashley T, de Rooij DG. Function of DNA-protein kinase catalytic subunit during the early meiotic prophase without Ku70 and Ku86. *Biol Reprod* 2003; 68: 717-721.

Hamer G, Roepers-Gajadien HL, van Duyn-Goedhart A, Gademan IS, Kal HB, van Buul PPW & de Rooij DG. DNA double-strand breaks and gammaH2AX signaling in the testis. *Biol Reprod* 2003; 68, 628-34.

Handel, M.A. (1987). Genetic control of spermatogenesis in mice. *Results and Problems in Cell Differentiation*, Vol. 15, Springer-Verlag, Berlin: S. 1-62

Heyting, C. (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology.* 8: 389-396

Herceg Z, Li H, Cuenin C, Shukla V, Radolf M, Steinlein P, Wang ZQ. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the HAT cofactor Trrap in conditional knockout cells. *Nucleic Acids Res.* 2003 Dec 1;31 (23):7011-23

Hickson ID, Davies SL, Li JL, Levitt NC, Mohaghegh P, North PS and Wu L. (2001). Role of the Bloom's syndrome helicase in maintenance of genome stability. *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 201– 204.

Hoeijmakers JH. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature (Lond.)* 411: 366–374

Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BA, Karcher A, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CT, Carney JP, Petrini JH, Tainer JA. (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418: 562–566.

Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res* 2004; 104: 14-20.

de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C, Kanaar, R. und Wyman, C. (2001) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell* 8: 1129-1135.

Karran, P. (2000) DNA double-strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 10: 144–150

Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand-breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008; 36:5678-94.

Kimmins S., Sassone-Corsi P. (2005) Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 31: VOL 434

Kobayashi, J., Tauchi, H., Sakamoto, S., Nakamura, A., Morishima, K., Matsuura, S., Kobayashi, T., Tamai, K., Tanimoto, K. und Komatsu, K. (2002) NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr. Biol.* 12: 1846- 1851.

Lahn, B.T., Tang, Z.L., Zhou, J., Barndt, R.J., Parvinen, M., Allis, C.D. & Page, D.C. Previously uncharacterized Histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99 (2002), 8707–8712.

Lee S, Cavallo L, Griffith J. (1997) Human p53 binds holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J Biol Chem* 272: 7532–7539.

Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 712–720

Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. (2010) *Cell Cycle*. 15;9(4):662-9. Epub 2010 Mar 2.

Lorat Y, Schanz S, Schuler N, Wennemuth G, Rube C, Rube CE. Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS One*. 2012;7(5):e38165. Epub 2012 May 30

Mahajan KN, Nick McElhinny SA, Mitchell BS, Ramsden DA. (2002) Association of DNA Polymerase μ (pol μ) with Ku and Ligase IV: Role for pol μ in end-Joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 22: 5194–5202.

Modesti M. und Kanaar R. (2001) DNA repair: spot(light)s on chromatin *Curr Biol* 11(6): R229-232

Morgan WF, Corcoran J, Hartmann A, Kaplan MI, Limoli CL, Ponnaiya B. (1998) DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutat Res* 404: 125–128

Nakamura K, Sakai W, Kawamoto T, Bree RT, Lowndes NF, Takeda S, Taniguchi Y. Genetic dissection of vertebrate 53BP1: a major role in non-homologous end joining of DNA double strand breaks. *DNA Repair* 2006; 5: 741-749.

O'Driscoll M, Jeggo PA. (2006) The role of double-strand break repair: insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7: 45–54.

Okayasu R et al. A Deficiency in DNA Repair and DNA-PKcs Expression in the Radiosensitive BALB/c Mouse *Cancer Res* 2000;60:4342-4345.

Olive PL. (1998) The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res* 150: S42–51

Oshima J, Huang S, Pae C, Campisi J and Schiestl RH. (2002). Lack of WRN results in extensive deletion at nonhomologous joining ends. *Cancer Res.*, 62, 547–551.

Park EJ, Chan DW, Park JH, Oettinger MA, Kwon J. : DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner *Nucleic. Acids Res.* 2003.; 31(23): 6819-6827

Paul A. Marks, Richard A. Rifkind, Victoria M. Richon, Ronald Breslow, Thomas Miller & William K. Kelly Histone deacetylases and cancer; causes and therapies *Nature Reviews Cancer* 1, 194-202 (December 2001)

Paull TT and Gellert M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell*, 1, 969–979.

Paull, T.T. und Gellert, M. (1999) Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes. Dev.* 13: 1276-1288.

Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM.: A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* 2000; 10(15): 886-895

Peterson, C.L. and Laniel, M.A. (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol*, 14, R546-551.

Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S. & Khochbin, S. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003), 5354–5365.

Riballo E, Kuhne M, Rief N, A. Doherty, G.C. Smith, M.J. Recio, C. Reis, K. Dahm, A. Fricke, A. Krempler, A.R. Parker, S.P. Jackson, A. Gennery, P.A. Jeggo, M. Lobrich, A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci, *Mol. Cell.* 13 (2004) 715–724.

Richter, C., Park, J.-W. und Ames, B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Prog. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6465-6467.

Rieger, R., Michaelis, A., Green, M.M. (1976). Glossary of Genetics and Cytogenetics. Gustav Fischer Verlag, Jena. 4. Auflage: S. 434

Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S. und Bonner W. M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 *J Biol Chem* 273(10): 5858-5868

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

Ross, Rohen, Lütjen-Drecoll, Kaye (eds) (1995) Atlas der Histologie. Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden

Rothkamm K, Löbrich M. (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5057–5062.

Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5706-5715.

Rübe CE, Grudzenski 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 - 14(20):6546-55.

Rübe CE, Dong X, Kühne M, Fricke A, Kaestner L, Lipp P, Rübe C : DNA double-strand break rejoining in complex normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 72(4):1180-7

Rübe CE, Lorat Y, Schuler N, Schanz S, Wennemuth G, Rübe C: DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA Repair* 2011 Apr 3;10(4):427-37

Rübe CE, Zhang S, Miebach N, Fricke A, Rübe C: Protecting the heritable genome: DNA damage response mechanisms in spermatogonial stem cells. *DNA Repair (Amst).* 2011 Feb 7;10(2):159-68. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.10.007. Epub 2010 Nov 30.

Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panuytin IG, Bonner W. (2002) Quantitative detection of ¹²⁵Idu-induced DNA double strand breaks with γ -H2AX antibody. *Radiat Res* 158: 486-492

Shen J and Loeb LA. (2001). Unwinding the molecular basis of the Werner syndrome. *Mech. Ageing Dev.*, 122, 921–944.

Stewart GS, Wang B, Bignell CR, A. Taylor MR und Elledge SJ: MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*. 2003; 421(6926): 961- 966

Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA.: ATM and DNA- PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer Res*. 2004; 64(7):2390-6

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.

Tan TL, Essers J, Citterio E, Swagemakers SM, de Wit J, Benson FE, Hoeijmakers JH and Kanaar R. (1999). Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr. Biol.*, 9, 325–328.

Thompson LH and Schild D. (2001). Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat. Res.*, 477, 131–153.

Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY and 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.

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 und Povirk LF. (2003) Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* (2003) 22, 5792–5812.

Van Dyck E, Hajibagheri NM, Stasiak A and West SC. (1998). Visualisation of human rad52 protein and its complexes with hRad51 and DNA. *J. Mol. Biol.*, 284, 1027–1038.

Van Dyck, E. Stasiak, A.Z., Stasiak, A. und West, S.C. (1999) Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 398: 728-731.

Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2: 196–206

Wang H, Zeng ZC, Bui TA, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Iliakis G. Efficient rejoining of radiation- induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* 2001; 20: 2212-2224.

Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ and Qin J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.*, 14, 927–939.

Ward I. M. und Chen J.: Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem.* 2001; 276(51): 47759-47762

Ward IM, Minn K, van Deursen J, Chen J. p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 2556-2563.

West SC. (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 435–445.

Widom J Structure,dynamics and function of chromatin in vitro. *Annu Rev Biomol Struct* 1998 27:285-327

Xu X und Stern DF: NFB1/MDC1 regulates ionizing radiation-induced focus formation by DNA checkpoint signaling and repair factors. *FASEB J.* 2003; 17(13):1842-8

Yannone SM, Roy S, Chan DW, Murphy MB, Huang S, Campisi J and Chen DJ. (2001). Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 276, 38242– 38248.

7. Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53-binding protein 1
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia</i> mutated
ATR	<i>Ataxia teleangiectasia</i> related
BALB/c	radiosensitives Mausmodell
BRCA1/2	Breast cancer susceptibility protein-1/2
BRDT	Bromodomain testis-specific protein
C57/BL6	wild-typ Mausmodell
CDC2	Cell division control-2
CHK2	Checkpoint Kinase-2
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	DNA-abhängige Proteinkinase (catalytic subunit)
dsDNA	doppelsträngige DNA
ssDNA	single strand DNA
DSB	Doppelstrangbruch
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
Gy	Gray (Energiedosis)
H2AX/H2A/H2B	Varianten vom Histon H2
<i>gamma</i> H2AX	phosphorylierte Form der Histonvariante H2AX
HMG	high mobility group
HR	Homologe Rekombination
LIG 4	Ligase 4
KU70/80	Proteinkomplex (Heterodimer der DSB Reparatur)
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint protein 1
MeV	Megaelektronenvolt
MRE11	DNA-Reparaturprotein
MRN	Mre11-Rad50-NBS1
MU	Monitorunits
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrom Protein 1

NHEJ	Nicht-homologes End-joining
P53	Tumorsuppressorprotein
PBS	Phosphate buffered saline (Puffer)
PBS/NS	Puffer mit Normalserum
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RPA A	Replikationsprotein A
RAD 50/51/52/54	Reparaturproteine
rs-SCID	Radiosensitive - severe combined immunodeficiency
SCID	Severe combined immunodeficiency
SSB	single strand break (Einzelstrangbruch)
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TRRAP	transdormation/transcription domain-associated protein
V(D)J	V - variable, D - diversifying, J - joining
WRN	Werner Protein
XRCC1-4	X-ray-complementing Chinese hamster gene 1-4

8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** S: Septen, Sg: Spermatogonien, Sp: Spermatozyten
1.Ordnung X: Tubuli seminiferi contorti, BV: Blutgefäße; Ross, Rohen, Lütjen-Drecoll, Kaye (eds) (1995) Atlas der Histologie. Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden
- Abbildung 2:** Schematisches Modell des Zellzyklus und den Reparaturmechanismen im Laufe des Zellzyklus (Rothkamm et al., 2003)
- Abbildung 3:** Mitose (Darnell et al., 1986)
- Abbildung 4:** Meiose a) Leptotän, b) Zygotän, c) Pachytän, d) Diplotän, e) Diakinese, f)Metaphase I, g) Anaphase I, h) Telophase I, i) Interkinese, k) Metaphase II, l) Anaphase II, m) Telophase II (Rieger et al., 1976)
- Abbildung 5:** Schema der Reifung der Spermatogenesestadien. SC Sertoli-Zellen, Ap Typ A Spermatogonium, blass, AD, Typ A Spermatogonium, dunkel, B Typ B Spermatogonium, MP Spermatozyt aus dem mittleren Pachytän, ES frühe (runde) Spermotide, LS späte (verlängert und kondensiert) Spermotide, LM Basalmembran (Handel, 1987)
- Abbildung 6:** Spermio-genese (Handel, 1987)

-
- Abbildung 7:** Das Core-Protein des Nukleosoms besteht aus Histon H2A, H2B, H3 und H4. Jeweils zwei Kopien sind im Nukleosom verpackt damit sich die DNA (schwarzes Band) um das entstandene Oktamer winden kann (Paul et al., 2001).
- Abbildung 8:** Vom Nukleosom zur höheren Ordnung der Chromatinstruktur und ihre unterschiedlichen Stadien der DNA Verpackung (Griffiths et al., 2004).
- Abbildung 9:** Remodellierung von Histonen während der Spermiogenese (Kimmins und Sassone-Corsi, 2005)
- Abbildung 10:** Signaltransduktion von DNS Doppelstrangbrüchen (Khanna et al., 2001)
- Abbildung 11:** DNA Reparationssysteme (HR und NHEJ) (Lee et al., 2006)
- Abbildung 12:** Schematische Darstellung des nicht homologen End-Joining (Valerie und Povirk, 2003)
- Abbildung 13:** Modell der homologen Rekombination (Valerie et al., 2003).
- Abbildung 14:** Lymphozytentrennung nach Zentrifugation mit 1200g in ihre Phasen.
- Abbildung 14:** CT basierte Konturierung der Körper der Mäuse
- Abbildung 15:** Isodosenverteilung mit Pinnacle Planungssystem Version 6.2b. Die 95%-Isodose umschließt das PTV (ganze Maus).
- Abbildung 16:** Darstellung der Foci pro Spermatozytenzelle bei unbestrahlten C57/BL6, BALB/c und SCID-Mäusen

-
- Abbildung 17:** Darstellung der Verteilung anhand der Dosiskorrelation von Spermato gonien der SCID-Mäuse mit Einzeldosen von 0,1Gy, 0,5Gy und 1Gy.
- Abbildung 18:** Dosiskorrelation; Abhängigkeit zwischen Dosis und Anzahl der Foci pro Spermatozyten.
- Abbildung 19:** Dosiskorrelation; Abhängigkeit von Dosis und Anzahl der Foci pro Lymphozytenzelle.
- Abbildung 20:** *gamma*H2AX-Immunfluoreszenzfärbung im Tubulus seminiferus am Beispiel einer C57/BL6 Maus zur Dosiskorrelation.
- Abbildung 21:** Bestrahlung mit 2 Gy Einzeldosis bei 3 Mausstämmen (C57/BL6, BALB/c, SCID) und Reparaturzeiten von 0,5h, 2,5h, 5h, 24h und 48h von Spermatozyten. Darstellung von Anzahl der Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit. Der Standardfehler wird über die Fehlerbalken angegeben.
- Abbildung 22:** Bestrahlung mit 2 Gy Einzeldosis bei 3 Mausstämmen (C57/BL6, BALB/c, SCID) und Reparaturzeiten von 0,5h, 2,5h, 5h, 24h und 48h von Spermatozyten. Darstellung von Anzahl der Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit. Der Standardfehler wird über die Fehlerbalken angegeben.
- Abbildung 23:** *gamma*H2AX-Immunfluoreszenzfärbung in Lymphozyten von Mäusen nach Applikation einer Gesamtdosis von 2 Gy in vivo und unterschiedlichen Zeitpunkten (0,5h, 2,5h, 5h und 24h) (Rübe et al., 2008).

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadien der Spermatogenese und ihre Dauer (in Tagen) bei Maus und Mensch (abgeändert nach Adler, 1996)

Tabelle 2: Überblick von Histonmodifikationen und ihrer möglichen biologischen Funktion (Peterson and Laniel, 2004)

Tabelle 3: Anzahl der Experimente der Dosiskorrelation nach Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen.

Tabelle 4: Anzahl der Experimente der Reparaturkinetik nach Ganzkörperbestrahlung mit 2Gy Einzeldosis.

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Herrn Prof. Dr. med. Christian Rübe, sowie der Leiterin des Labors für molekulare Radioonkologie und Oberärztin der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Frau Prof. Dr. med. Claudia E. Rübe, für die Bereitstellung des Themas dieser Doktorarbeit und stetiger wissenschaftlicher Unterstützung.

Weiterhin danke ich Martin Kühne für die Unterstützung und kritische Betrachtung meiner Ergebnisse.

Daniela Ludwig für eine tatkräftige Unterstützung bei der Etablierung der Methodik und täglicher Unterstützung bei den Herausforderungen der täglichen Laborarbeit.

Egil Gleditsch für die Unterstützung bei der Präparation der Tiere.

Meinen Eltern die mich jahrelang während und nach dem Studium unterstützt haben.