

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Rube

**Auswirkungen  
von Einzeit- und Fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung  
auf Lungengewebe**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2013

vorgelegt von: Elias Lukas Theodor Flockerzi  
geb. am: 22.01.1989 in Homburg

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Zusammenfassung .....	1
2. Einleitung .....	4
2.1. Grundlagen der ionisierenden Strahlung und Strahlentherapie .....	6
2.1.1. Physikalische Grundlagen .....	6
2.1.2. Effekte ionisierender Strahlung .....	7
2.1.3. Fraktionierte Bestrahlung .....	8
2.1.4. Effekte ionisierender Strahlung im Normalgewebe .....	9
2.2. Der DNA-Doppelstrangbruch und seine Reparatursysteme .....	11
2.2.1. Der DNA-Doppelstrangbruch.....	11
2.2.2. Der Zellzyklus und die Grundlagen der DNA-Reparaturmechanismen.....	12
2.2.3. Die Homologe Rekombination (HR).....	13
2.2.4. Das Non-Homologous-End-Joining (NHEJ).....	15
2.3. Reparaturproteine der zellulären Antwort .....	18
2.3.1. Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Protein .....	18
2.3.2. $\gamma$ H2AX.....	20
2.3.3. 53BP1 .....	21
2.4. Untersuchte Immundefizienz-Syndrome .....	22
2.4.1. Ataxia Teleangiektasia (AT) / Louis-Bar-Syndrom .....	22
2.4.2. Severe Combined Immunodeficiency (SCID).....	24
2.5. Folgen der pulmonalen Bestrahlung .....	26
2.6. Fragestellungen im Rahmen dieses Projekts .....	30
3. Material und Methodik .....	31
3.1. Mauslinien .....	31
3.1.1. C57BL/6N .....	31
3.1.2. ATM-Zucht.....	31
3.1.3. SCID-Zucht .....	31
3.1.4. Tierhaltung .....	31
3.2. Bestrahlung .....	32
3.2.1. Planung und Anordnung .....	32
3.2.2. Einzeit-Niedrigdosisbestrahlung .....	32
3.2.3. Fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung .....	32

3.2.4. Übersicht und Anzahl der untersuchten Präparate und Tiere .....	34
3.2.5. Gewebeentnahme.....	35
3.2.6. Immunhistochemische Färbemethodik.....	35
3.2.7. Ausgewertete Zellpopulationen.....	37
3.2.8. Quantifizierung der 53BP1 Foci.....	37
4. Ergebnisse.....	39
4.1. Mikroskopischer Überblick .....	39
4.2. 53BP1 Foci in den unbestrahlten Kontrollen .....	40
4.3. 53BP1 Foci nach Einzeitbestrahlung.....	43
4.4. 53BP1 Foci nach fraktionierter Bestrahlung .....	51
4.4.1. C57 Bronchialepithelzellen .....	51
4.4.2. C57 Alveolarzellen .....	55
4.4.3. Fraktionierte Bestrahlung 10 mGy, 24 Stunden .....	59
4.4.4. Fraktionierte Bestrahlung 100 mGy, 24 Stunden .....	62
4.4.5. Fraktionierte Bestrahlung 10 mGy, 72 Stunden .....	64
4.4.6. Fraktionierte Bestrahlung 100 mGy, 72 Stunden .....	67
4.4.7. Fluoreszenzmikroskopische 53BP1 Foci der verschiedenen Mauslinien.....	70
4.5. Proliferation, Apoptose und inflammatorische Reaktion .....	73
5. Diskussion .....	79
5.1. Fragestellung und Ergebnisse.....	79
5.2. Methodik.....	86
5.3. Klinische Relevanz .....	90
6. Literaturverzeichnis .....	95
7. Publikationen.....	102
8. Lebenslauf .....	103
9. Dank .....	104

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Zell-Überlebenskurven nach einer fraktionierten Bestrahlung.....	8
Abbildung 2-2: Die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	11
Abbildung 2-3: Das Prinzip der Homologen Rekombination (HR).....	14
Abbildung 2-4: Das Prinzip des Non-Homologous-End-Joinings (NHEJ).....	17
Abbildung 2-5: Funktionen von ATM in der zellulären Schadensantwort .....	19
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung .....	33
Abbildung 4-1: Mikroskopischer Überblick .....	39
Abbildung 4-2: Foci pro Zelle in den unbestrahlten Kontrollen .....	42
Abbildung 4-3: Foci pro Zelle nach Einzeitbestrahlung mit 10 mGy C57 .....	44
Abbildung 4-4: Foci pro Zelle nach Einzeitbestrahlung mit 100 mGy C57 .....	45
Abbildung 4-5: Foci pro Zelle nach Einzeitbestrahlung mit 100 mGy ATM <sup>+/-</sup> .....	47
Abbildung 4-6: Foci pro Zelle nach Einzeitbestrahlung mit 100 mGy ATM <sup>-/-</sup> .....	48
Abbildung 4-7: Foci pro Zelle nach Einzeitbestrahlung mit 100 mGy SCID.....	50
Abbildung 4-8: Fraktionierte Bestrahlung mit 10 mGy, Bronchialepithelzellen C57 .....	52
Abbildung 4-9: Fraktionierte Bestrahlung mit 100 mGy, Bronchialepithelzellen C57 .....	53
Abbildung 4-10: Fraktionierte Bestrahlung mit 10 mGy, Alveolarzellen C57 .....	56
Abbildung 4-11: Fraktionierte Bestrahlung mit 100 mGy, Alveolarzellen C57 .....	57
Abbildung 4-12: Fraktionierte Bestrahlung aller Mauslinien, 10 mGy, 24 Stunden .....	60
Abbildung 4-13: Fraktionierte Bestrahlung aller Mauslinien, 100 mGy, 24 Stunden .....	62
Abbildung 4-14: Fraktionierte Bestrahlung aller Mauslinien, 10 mGy, 72 Stunden .....	65
Abbildung 4-15: Fraktionierte Bestrahlung aller Mauslinien, 100 mGy, 72 Stunden .....	68
Abbildung 4-16: Übersicht 53BP1 Foci in Bronchialepithelzellen (A), Alveolarzellen (B) ...	71
Abbildung 4-17: Übersichtsaufnahmen.....	72
Abbildung 4-18: Übersicht Ki-67 in Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen.....	74
Abbildung 4-19: Übersicht PARP-1 in Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen.....	75
Abbildung 4-20: Übersicht TGF-β1 in Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen .....	78

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2-1: Übersicht Mauslinien .....	30
Tabelle 3-1: Anzahl der unbestrahlten Kontrollen .....	34
Tabelle 3-2: Anzahl der Einzeitbestrahlungen .....	34
Tabelle 3-3: Anzahl der fraktionierten Bestrahlungen mit 10 mGy .....	34
Tabelle 3-4: Anzahl der fraktionierten Bestrahlungen mit 100 mGy .....	35
Tabelle 4-1: Fraktionierte Bestrahlung mit 10 mGy C57 .....	55
Tabelle 4-2: Fraktionierte Bestrahlung mit 100 mGy C57 .....	58

## Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53 Binding Protein 1
$\gamma$ H2AX	phosphoryliertes Histon H2AX
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase Färbung
Alv	Alveolarzellen (Abk. in Abbildungen)
AT	Ataxia Teleangiektasia
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated Protein
ATR	ATM-and-Rad3-related-Kinase
BRCA1 / BRCA2	Breast Cancer gene 1 / 2
BRCT	BRCA1 C-Terminus
Bro	Bronchialepithelzellen (Abk. in Abbildungen)
°C	Grad Celsius
Cdc	Cell division cycle Kinase
CdK	Cyclin dependent Kinase
ChK	Checkpoint Kinase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Färbung
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA, DNS	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonucleinsäure
DNA-PKcs	DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit
DSB	Doppelstrangbruch
e <sup>-</sup>	Elektron
ESB	Einzelstrangbruch
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Gy	Gray (1 Gray = 1 Joule pro Kilogramm)
GAR	glycine-arginine-rich region
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser

HR	Homologe Rekombination
IL	Interleukin
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
KAP1	KRAB-Assoziiertes Protein 1
KRAB	Krüppel Associated Box (Domäne von Transkriptionssuppressorproteinen)
MDC1	Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1
mGy	Milligray (1 mGy = 0,001 Gy)
MRX-Komplex	Reparaturproteinkomplex aus Mre11p, Rad50p und Xrs2p (Hefen)
MRN-Komplex	Reparaturproteinkomplex aus Mre11p, Rad50p und NBS1 (Vertebraten)
NHEJ	Non-Homologous-End-Joining
OH	Hydroxyl-Gruppe
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1
p53	Tumorsuppressorprotein
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphat gepufferte Salzlösung pH: 7,2-7,4
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIKK	PI3K-like-Kinase
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
RAG	Recombination Activating Genes
RNF8	Ring Finger Protein 8
RPA	Replikationsprotein A
RS-SCID	Radio-Sensitive SCID
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SH	Thiol-Gruppe
Sv	Sievert (1 Sv = 1 Joule pro Kilogramm)
TGF- $\beta$	Transforming-Growth-Factor- $\beta$ (ein Zytokin)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (ein Zytokin)
V(D)J (variable, (diversifying), joining) – Rekombination	Rekombinationsmechanismus für die Variabilität von Antikörpern

## **1. Zusammenfassung**

### **Zielsetzung**

Bei der Bestrahlung im Rahmen der klinischen Strahlentherapie ist in der Regel eine Belastung gesunden Gewebes unumgänglich. Im Rahmen neuer Bestrahlungstechniken wie der Intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) kommt es insgesamt sogar zu einer tendenziell höheren Belastung gesunden Normalgewebes. Ziel dieser Arbeit ist es, anhand von *in vivo* Mausmodellen herauszufinden, inwieweit auch niedrigste Applikationsdosen bei fraktionierter Bestrahlung schädigende Auswirkungen auf die DNA von Zellen der Lunge haben. Dabei werden neben reparaturprofizienten Wildtyp-Tieren (C57BL/6N, ATM<sup>WT</sup>) auch Tiere mit genetisch determinierten DNA-Reparaturdefekten (ATM<sup>+/-</sup>, ATM<sup>-/-</sup>, SCID) untersucht. Bisher liegen hierzu im Hinblick auf die Lunge keine Untersuchungen vor. Die erzielten Ergebnisse könnten auch Schlüsse auf die zellspezifische und interindividuelle Strahlensensibilität der Lunge beim Menschen erlauben.

### **Material und Methodik**

Reparaturprofiziente (C57BL/6N, ATM<sup>WT</sup>), für ATM heterozygote (ATM<sup>+/-</sup>) und reparaturdefiziente Tiere (ATM<sup>-/-</sup>, SCID) werden mit niedrigen Dosen (10 oder 100 mGy) bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgt als Ganzkörperbestrahlung a) einmalig und b) fraktioniert über mehrere Wochen analog der strahlentherapeutischen Schemata beim Menschen. Anschließend werden zu definierten Zeitpunkten (0,5 Stunden nach einmaliger, 24 und 72 Stunden nach fraktionierter Bestrahlung) entnommene Proben von Lungengewebe auf DNA-Doppelstrangbrüche hin untersucht. Dies erfolgt über die Darstellung der DNA-Doppelstrangbrüche durch immunhistochemische Anfärbung von 53BP1 Foci und deren Quantifizierung. Dafür wurden insgesamt 37.698 Bronchialepithelzellen und 62.536 Alveolarzellen von 172 Tieren ausgewertet.

### **Ergebnisse**

Unabhängig vom Bestrahlungsmodus weisen die Zellen der beiden Wildtyp-Linien (C57BL/6N, ATM<sup>WT</sup>) signifikant weniger Foci pro Zelle auf als Zellen der beiden reparaturdefizienten Linien. Mit zunehmender Anzahl an Bestrahlungen akkumulieren die Foci aber auch in den Zellen der Wildtyp-Tiere. Hinsichtlich der Anzahl der Foci pro Zelle der heterozygoten ATM<sup>+/-</sup> Tiere und der Foci pro Zelle der Wildtyp-Tiere besteht nahezu kein



Unterschied. Insgesamt ist die Zahl der Foci pro Bronchialepithelzelle im Vergleich zur Anzahl pro Alveolarzelle signifikant höher.

### **Schlussfolgerung**

Niedrige Bestrahlungsdosen im mGy-Bereich führen sowohl bei Einzeit- als auch fraktionierter Applikation zu einer messbaren und mit zunehmender Bestrahlungsdosis stärkeren Akkumulation von DNA-Schäden in den Zellpopulationen der Lunge. Die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse ergibt sich durch die Belastung gesunden Gewebes bei Bestrahlung auch mithilfe neuer Bestrahlungstechniken wie der IMRT. In der Lunge zeigte sich das Bronchialepithel im Vergleich zu den Zellen des Alveolarraumes als strahlensensitiver. Die Strahlensensitivität ist darüber hinaus abhängig vom Genotyp der Tiere. Die hier untersuchten reparaturdefizienten Tiere akkumulieren in den Zellen der Lunge in höherem Ausmaß 53BP1 Foci, da strahleninduzierte Doppelstrangbrüche nicht in gleichem Maße repariert werden können wie bei gesunden Tieren. Dies gilt sowohl für das Bronchialepithel als auch für die Zellen des Alveolarraums. Parallel durchgeführte erste orientierende Untersuchungen zeigen zudem, dass sich zum frühen Zeitpunkt (24h) bei reparaturdefizienten Tieren tendenziell eine geringfügige Zunahme an detektierbarem TGF- $\beta$ 1 als Marker für die inflammatorische Reaktion der Lunge nach Bestrahlung nachweisen lässt.

### **Summary**

#### **Purpose**

Despite mostly fractionated irradiation, stressing healthy tissue often is inevitable in radiotherapy. Novel treatment technologies like the intensity-modulated radiotherapy (IMRT) also result in an increase of low-dose radiation volumes to normal tissues. The purpose of this study is to evaluate whether fractionated low-dose radiation may cause severe injury upon DNA based on an *in vivo* mouse model. In intention to work out whether radiosensitivity may be determined genetically, there are also mouse lines examined which have an inherited repair defect. Consequently, differences between repair-proficient and repair-deficient mice can lead to assertions about radiosensitivity in humans with different genetic backgrounds.

## **Methods and Material**

Repair-proficient mice (C57BL/6N, ATM<sup>WT</sup>), a heterozygous ATM<sup>+/-</sup> mouse line and repair-deficient mice (ATM<sup>-/-</sup> and SCID) are exposed to 10 or 100 mGy a day for several weeks. Therefore, the whole body is irradiated once or fractionated. 24 or 72 hours after the last fraction, lung tissues are taken and 53BP1 foci are quantified after immunofluorescence staining to detect radiation-induced DNA-damage. Altogether, 37.698 cells of the bronchiolar epithelium and 62.536 alveolar cells obtained from 172 animals were analyzed.

## **Results**

The repair-proficient C57BL/6N and ATM<sup>WT</sup> mice turn out to be less radiosensitive than the repair-deficient mice. Nevertheless, the more fractions of radiation applied, the more foci accumulate in both bronchial epithelial and alveolar cells. Strikingly, there is almost no difference in radiosensitivity of C57BL/6N, ATM<sup>WT</sup> and the heterozygous ATM<sup>+/-</sup> mice. The repair-deficient mice (ATM<sup>-/-</sup> and SCID), however, show many more 53BP1 foci than repair-proficient mice after fractionated irradiation.

In addition, alveolar cells turn out to accumulate significantly less foci than bronchial epithelial cells of lung tissue.

## **Conclusion**

Low-dose radiation of some mGy applied as a single dose or in form of multiple fractions causes an increasing amount of DNA-damage in cells of lung tissue. Assertions about radiosensitivity of lung tissue have to distinguish between alveolar and bronchial epithelial cells, because bronchial epithelial cells turned out to accumulate more 53BP1 foci. These results may help to understand the impact of low-dose radiation upon lung tissue, as it is applied for example by IMRT.

Radiation-induced DNA-damage is repaired more slowly and less effective in repair-deficient mice. Consequently, there is a greater accumulation of 53BP1 foci in bronchial epithelial cells compared to alveolar cells. These results underline the fact, that radiosensitivity is determined by the genotype of the irradiated organism. In repair-deficient mice, fractionated low-dose radiation also tends to result in a slightly increased detectability of TGF- $\beta$ 1 as a marker for an inflammatory response to irradiation.

## **2. Einleitung**

Die Strahlentherapie spielt heute im Spektrum der Behandlungsmöglichkeiten von insbesondere Krebserkrankungen eine zunehmend wichtige Rolle. Neben der strahlentherapeutischen Behandlung gutartiger Erkrankungen oder anatomischer Anomalien wie beispielsweise des Fersenspornes liegen aktuell onkologische Erkrankungen mit all ihren Facetten im Focus der Radiotherapie, dies umso mehr in Anbetracht des steigenden Durchschnittsalters der Bevölkerung, welches mit zunehmenden Inzidenzraten an Krebserkrankungen einhergeht. So werden in Deutschland die jährlichen Krebs-Neuerkrankungen auf rund 490.000 beziffert (Deutsche Krebshilfe, 2013), wobei das Prostatakarzinom mit einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren beim Mann und das Mammakarzinom mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 65 Jahren die häufigsten malignen Erkrankungen darstellen. Die Tendenz ist steigend; bis zum Jahr 2050 wird eine Zunahme onkologischer Erkrankungen um 30% erwartet (Deutsche Krebshilfe, 2013). Etwa 60 bis 70% der Tumorpatienten erhalten im Rahmen ihrer Behandlung eine Radiotherapie (Kauffmann et al., 2006). Bei der strahlentherapeutischen Behandlung eines Tumors soll dieser unter maximaler Schonung des umgebenden Normalgewebes bestrahlt werden. In der konventionellen Radiotherapie kommt es zu einer Applikation vergleichsweise hoher Dosen auf Normalgewebe. Die konformale Radiotherapie ist bestrebt, durch Mehrfeldertechniken die Mitbelastung von gesundem Normalgewebe zu minimieren, welche sich allerdings in der Regel nicht ganz vermeiden lässt. Bei der Intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der konformalen Radiotherapie. Dabei erfolgt durch Unterteilung der einzelnen Bestrahlungsfelder eine Modulation der einzelnen Strahlungsbündel (Bortfeld, 2006), was eine optimierte Applikation noch höherer Bestrahlungsdosen auf das Planungs-Zielvolumen zulässt (Nutting et al., 2000). Dies führt jedoch auch zu einer höheren Belastung des gesunden Normalgewebes mit Dosen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit appliziert wurden. Wie im Tumorgewebe, wo es erwünscht ist, verursacht die ionisierende Strahlung auch im mitbestrahlten gesunden Normalgewebe eine Vielzahl an DNA-Schäden. Neben Einzelstrangbrüchen, Basenmodifikationen sowie DNA-Vernetzungen gilt als schwerwiegendste Komplikation der vollständige DNA-Doppelstrangbruch (Jackson, 2002).

Obwohl der menschliche Organismus über mehrere Reparaturmechanismen für DNA-Schäden verfügt, sind sowohl Strahlensensibilität als auch Nebenwirkungen der

Radiotherapie bei gleicher Bestrahlungsdosis interindividuell verschieden. Dies zeigte sich nicht nur in der klinischen Radiotherapie, sondern auch nach Strahlungsunfällen wie in Hiroshima, Nagasaki oder Tschernobyl. Von diesen Vorfällen unmittelbar Betroffene haben schon ab relativ niedrigen Expositionsdosen ( $< 0,2$  Gy) ein erhöhtes Risiko, an Leukämie, Schilddrüsentumoren, Brust- oder Lungenkrebs zu erkranken, dies jedoch in Abhängigkeit des Alters zum Expositionszeitpunkt (Ron, 2002), wobei vor allem eine Exposition in jungen Jahren besonders kritisch ist. Dennoch werden lediglich 5 bis 8% der zwischen 1958 und 1987 neu aufgetretenen Krebserkrankungen in Hiroshima und Nagasaki ätiopathogenetisch auf die Strahlung zurückgeführt (Ron, 2002). Diese beobachteten interindividuellen Unterschiede lassen den Schluss zu, dass die Strahlensensibilität des Einzelorganismus möglicherweise genetisch determiniert ist. Dafür spricht auch, dass bei Menschen mit seltenen schweren Immundefekten wie Ataxia Teleangiectasia (AT) oder Severe Combined Immunodeficiency (SCID) eine deutlich höhere Strahlensensibilität sowie eine vermehrte Neigung zur Entwicklung maligner Neoplasien nach Bestrahlung bestehen.

Dass hohe Bestrahlungsintensitäten, wie sie in der Radiotherapie auf das Zielvolumen zum Einsatz kommen, das langfristige Krebsrisiko beim Menschen erhöhen, ist mehrfach nachgewiesen worden (Brenner et al., 2003). Die genauen Auswirkungen von Strahlung im Niedrigdosisbereich sind jedoch nicht eindeutig geklärt. Einerseits wird einer langfristigen Exposition gegenüber Strahlung im Niedrigdosisbereich (1 bis 300 mGy) ein protektiver Effekt in Bezug auf Neoplasien zugesprochen (Cuttler, 2007), andererseits wird vor dem Hintergrund des Strahlenschutzes und des Strahlenschutzgesetzes eine größtmögliche Minimierung der Exposition angestrebt.

Derzeit existierende Daten basieren weitestgehend auf Extrapolierung der Daten von Hochdosisbestrahlung auf Niedrigdosisbestrahlung. Diese Berechnungen bergen jedoch das Risiko, die Folgen der Niedrigdosisexposition zu über-, aber auch zu unterschätzen (Brenner et al., 2003). Nach Paracelsus ist die Dosis einer Substanz für eine toxische Wirkung entscheidend. Um festzustellen, ob sich diese Aussage auch auf niedrige Bestrahlungsdosen anwenden lässt, gilt es zu untersuchen, inwiefern DNA-Doppelstrangbrüche in den einzelnen Organen nach Niedrigdosisbestrahlung akkumulieren, um weitere Aussagen über die Auswirkungen von Niedrigdosisbestrahlung auf Gewebe treffen zu können.

## 2.1. Grundlagen der ionisierenden Strahlung und Strahlentherapie

### 2.1.1. Physikalische Grundlagen

Ionisierende Strahlung, wie sie in der Medizin zum Einsatz kommt, vermag Atome durch Herauslösen von Elektronen aus der Atomhülle zu ionisieren. Dabei kann die Wirkung entweder direkt oder indirekt erfolgen. Überträgt die Strahlung ihre Energie unmittelbar auf das Zielmolekül, so spricht man von direkter Strahlung. Indirekte Strahlung bezeichnet die Übertragung der Strahlungsenergie auf ein Zwischenmolekül, welches als Radikal diese Energie an Makromoleküle des Absorbens weitergibt (Herrmann and Baumann, 1997).

Unabhängig von der Wirkung wird weiter unterschieden zwischen Photonen- und Korpuskularstrahlung. Während die Korpuskularstrahlung aus geladenen oder ungeladenen Teilchen besteht (Kauffmann et al., 2006), umfasst die Photonenstrahlung oder elektromagnetische Strahlung die diagnostisch eingesetzte niedrigerenergetische Röntgenstrahlung sowie die therapeutisch bedeutsame hochenergetische Gammastrahlung. Die Röntgenstrahlung wird in einer Röntgenröhre erzeugt. Dabei werden Elektronen durch Aufheizen von einer Kathode aus freigesetzt und in einem elektrischen Feld zur Anode hin beschleunigt. Beim dortigen Auftreffen entsteht die Röntgenstrahlung. Für die Gammastrahlung werden radioaktive Isotope benötigt, welche beim radioaktiven Zerfall Strahlung emittieren.

Von den Anfängen mit den Röntgen-Strahlen hat sich die Radiotherapie über die therapeutisch eingesetzten Cobalt- und Caesium-Strahler am Ende des 20. Jahrhunderts hin zur Nutzung von Linearbeschleunigern in der Routinetherapie entwickelt. Diese erzeugen nach dem Prinzip der Röntgenröhre über das ausschließliche Beschleunigen von Elektronen ultraharte Röntgenbremsstrahlung. Eine direkte Nutzung von Elektronen oder auch Protonen ist ebenfalls möglich. Dabei haben die Protonen den Vorteil des so genannten "bragg-peaks": Sie geben ihre Energie überwiegend erst am Ende der zurückgelegten Wegstrecke und damit im Zielvolumen ab, wodurch das umgebende gesunde Gewebe geschont bleibt (Kauffmann et al., 2006).

Die Effekte ionisierender Strahlung auf das Gewebe werden über die Energiedosis und die effektive Äquivalenzdosis beurteilt. Unter der Energiedosis (Einheit Gray (Gy)) versteht man die von einer bestrahlten Masse absorbierte Energie. Die effektive Äquivalenzdosis setzt sich zusammen aus der Summe sämtlicher auf ein Organ applizierter Bestrahlungsdosen

multipliziert mit einem organabhängigen Wichtungsfaktor und wird in Sievert (Sv) angegeben. Insbesondere die effektive Äquivalenzdosis ermöglicht durch die Miteinbeziehung der unterschiedlichen Strahlensensibilität verschiedener Organe eine Kanzerogenese-Risikoabschätzung (Kauffmann et al., 2006).

### 2.1.2. Effekte ionisierender Strahlung

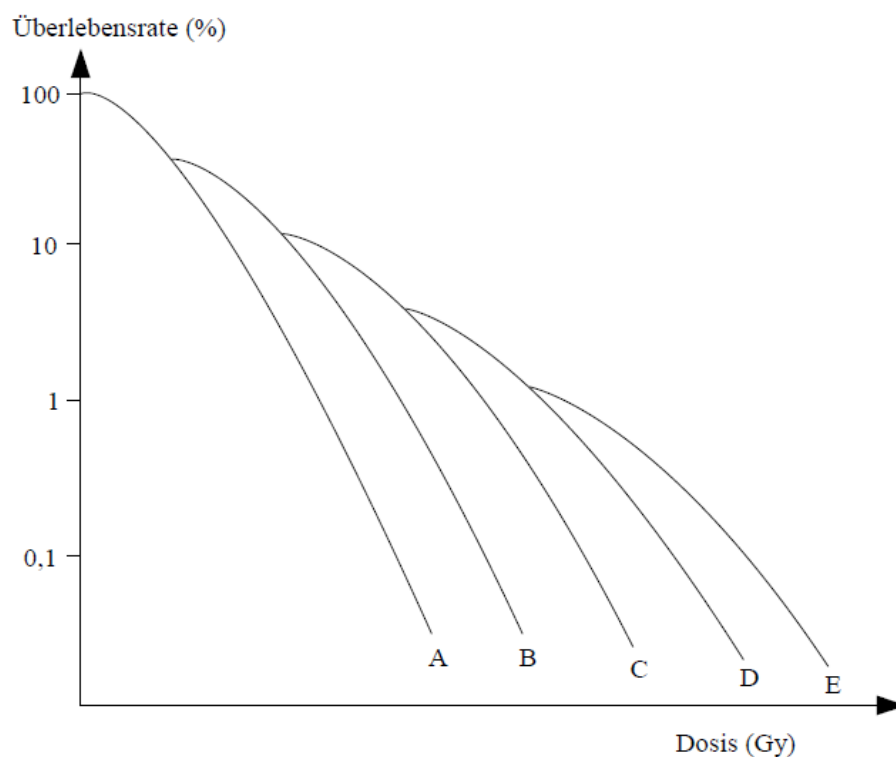
Eine Bestrahlung mit 1 Gray (1 Joule pro kg) vermag bei einer Zelle knapp 5000 DNA-Schäden zu verursachen. Diese Zahl setzt sich unabhängig vom Zelltyp (Olive, 1998) zusammen aus rund 2000 Basenschäden, 1000 Einzelstrangbrüchen, 1500 Veränderungen der Zuckermoleküle, 200 Crosslinks (DNA-DNA- oder DNA-Proteinvernetzungen) und etwa 50 Doppelstrangbrüchen (Kauffmann et al., 2006; Prise et al., 2005).

Diese DNA-Schäden können durch direkte und indirekte Treffer entstehen. Die indirekte Wirkung betrifft zunächst den Hauptbestandteil der Zelle, das Wasser. Durch Radiolyse des Wassers entstehen zunächst hauptsächlich  $\text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$ . Durch weiteren Zerfall des kurzlebigen  $\text{H}_2\text{O}^+$  entstehen in einer Reaktionsabfolge auch  $\text{H}\cdot + \cdot\text{OH}$  (Rink, 1971). So entstehen durch mehrfache Radiolyse des Wassers  $\cdot\text{OH}$  (Hydroxyl-) Radikale, die sich an die Doppelbindung der Basen der DNA anlagern oder in der Lage sind, Protonen aus den Zuckermolekülen der DNA herauszuberechnen. Die dadurch entstehenden DNA-Radikale können durch SH-Verbindungen wie Cystein oder Glutathion (Kauffmann et al., 2006), die ein  $\text{H}^+$  abgeben, neutralisiert werden. Ist jedoch Sauerstoff in ausreichender Konzentration vorhanden, so verhindert er durch seine große Affinität zum DNA-Defekt kompetitiv die DNA-Reparatur. Daher ist in der Strahlentherapie die Oxygenierung für den Therapieerfolg mit entscheidend; die Strahlensensibilität ist in Gegenwart von Sauerstoff zwei bis drei mal höher als bei Anoxie (Kauffmann et al., 2006; Mottram, 1936).

Über die DNA-Schäden und auch über die Beschädigung der Zellmembran kann die ionisierende Strahlung zur Apoptose der Zielzelle führen (Jonathan et al., 1999). Dabei wird im Rahmen des Zellzyklus die DNA auf Schäden untersucht. Werden DNA-Schäden detektiert, so kann der Zellzyklus arretiert werden und Reparaturmechanismen setzen ein, um diese zu beheben. Ist eine Reparatur nicht möglich, so wird die Zelle über eine p53-abhängige Kaskade, die regulatorisch in ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Mediatoren eingreift, in die Apoptose geschickt (Verheij and Bartelink, 2000).

### 2.1.3. Fraktionierte Bestrahlung

Um die kurative Wirkung der Radiotherapie zu verstärken und zugleich dem Normalgewebe Zeit zur Regeneration zu geben, werden Fraktionierungsschemata angewandt. Dabei wird die therapeutische Dosis nicht einmalig in voller Größe appliziert, sondern aufgeteilt in kleinere Fraktionen bis 2 Gy, denen das Zielvolumen fünfmal pro Woche ausgesetzt wird. Bei diesem als „konventionelle Fraktionierung“ bezeichneten Schema ergibt sich für das umliegende Normalgewebe jeweils ein Zeitraum von 24 Stunden zur Regeneration. Induzierte DNA-Schäden können durch DNA-Reparatursysteme ausgeglichen werden (Wannenmacher, 2006), was im Normalgewebe schneller als im Tumorzielvolumen geschieht (Grégoire, 2005). Zeichnet man die Überlebensrate fraktioniert bestrahlter gesunder Zellen in Abhängigkeit von der Dosis in Gray auf, so erhält man eine so genannte Schulter (Abb. 2-1), welche als Elkind-Erholung vom subletalen Strahlenschaden bezeichnet wird (Wannenmacher, 2006):



**Abbildung 2-1: Zell-Überlebenskurven nach einer fraktionierten Bestrahlung**

Die Abbildung zeigt Zell-Überlebenskurven nach einer fraktionierten Bestrahlung: Kurve A repräsentiert die Überlebenskurve nach einer Einzeitbestrahlung, die Kurven B bis E entsprechen einer fraktionierten Bestrahlung mit zunehmender Anzahl der Einzelfraktionen. Für jede hinzukommende Fraktionierung ergibt sich eine neue Schulter nach dem Elkind-Modell, entsprechend nimmt die Zahl überlebender Zellen zu (modifiziert nach Kauffmann et al., 2006).

*In vitro*-Studien haben gezeigt, dass für eine Zelle zwei bis drei Stunden ausreichen, um sich von subletalen Strahlenschäden zu erholen. Innerhalb eines Gewebes muss allerdings mit einer erheblich längeren Zeit zur Restitution gerechnet werden (Herrmann and Baumann, 1997). Die „hyperfraktionierte Fraktionierung“ wird insbesondere bei der Behandlung schnell wachsender Tumoren eingesetzt. Dabei werden die rasch proliferierenden und damit strahlensensitiveren Tumorzellen mehrfach pro Tag bestrahlt. Wie auch bei der „akzelerierten Fraktionierung“ (tägliche Steigerung der applizierten Bestrahlungsdosis) muss allerdings mit einem höheren strahlentoxischen Risiko gerechnet werden.

Dosislimitierend sind somit die unmittelbaren, aber auch die später zu erwartenden Effekte der Strahlung auf das umgebende zu schonende Normalgewebe (Stone et al., 2003).

#### **2.1.4. Effekte ionisierender Strahlung im Normalgewebe**

Im Normalgewebe werden Früheffekte und Spätfolgen nach Bestrahlungen unterschieden. Frühe Normalgewebsschäden finden sich vor allem in rasch proliferierenden und regenerativen Gewebearten (Stone et al., 2003) und treten während der Behandlung bis 90 Tage nach Bestrahlungsbeginn auf (Herrmann and Baumann, 1997).

Spätfolgen hingegen sind demgegenüber unberechenbarer: Sie erscheinen Monate bis Jahre nach der Radiotherapie, in seltenen Fällen sogar 20 bis 34 Jahre später und können unterschiedliche Schweregrade zeigen (Stone et al., 2003). Damit ist das Vorkommen und die Ausprägung von Strahlenfolgen im Normalgewebe einerseits abhängig von Zielvolumen und Bestrahlungsdosis, aber andererseits auch von der Art des bestrahlten Gewebes sowie dem genetischen Hintergrund des Patienten oder des Tiermodells: Patienten mit schweren Immundefekten entwickeln besonders gravierende Normalgewebsschäden nach Bestrahlung (Stone et al., 2003).

Gewebearten werden strahlentherapeutisch eingeteilt in Gewebe vom H-Typ (hierarchisch) und F-Typ (flexibel, Herrmann and Baumann, 1997). Gewebe vom hierarchischen Typ sind gekennzeichnet durch einen klar strukturierten Aufbau aus Stammzellen, Transitzellen und reifen Zellen sowie einen ständigen Zellumsatz. Diesem Charakteristikum zufolge spricht man von einem „high turnover-tissue“ (Herrmann and Baumann, 1997), bei dem entsprechend die Strahlensensibilität deutlich höher ist als beim flexiblen Typ, der durch eine niedrigere Zellteilungsrate gekennzeichnet ist. Diese Gewebe entsprechen den spät reagierenden Gewebearten; hier kann jede Zelle sowohl als Stamm- als auch als Funktionszelle fungieren.



Ein F-Typ Gewebe und damit ein spät reagierendes Gewebe ist die Lunge, deren radiogene Reaktion als eine der schwersten Spätkomplikationen der Strahlentherapie gilt (Marks et al., 2003).

Die Zell- und Gewebeantwort auf ionisierende Strahlung wird beschrieben über das so genannte linear-quadratische Modell nach Kellerer und Rossi (1973), das zwischen einer linearen Komponente  $\alpha$  und einer quadratischen Komponente  $\beta$  unterscheidet. Als linear werden zwei räumlich eng benachbarte DNA-Doppelstrangbrüche betrachtet, die durch ein Elektron bzw. eine Bestrahlung verursacht werden. Die Häufigkeit dieser Ereignisse steigt mit zunehmender Dosis, gleichzeitig nimmt der Anteil überlebender Zellen linear ab. Werden zwei nahe beieinander liegende DNA-Doppelstrangbrüche durch zwei Elektronen oder Mehrfachbestrahlung verursacht und sind diese Schäden einzeln für sich noch reparabel, so ergibt sich ein quadratischer Zusammenhang: Für beide einzeln betrachtet steigt die Wahrscheinlichkeit linear an, je höher die Dosis, desto höher die Elektronenzahl, desto höher die Wahrscheinlichkeit eines DNA-Doppelstrangbruchs. Für Wechselwirkungen der beiden DNA-Doppelstrangbrüche untereinander steigt aber die Wahrscheinlichkeit im quadratischen Zusammenhang, in gleichem Maße sinkt die Zellüberlebensrate (Stöver and Feyer, 2010). Eine Verdopplung der Dosis kann somit eine Vervierfachung des induzierten Schadens nach sich ziehen. Damit sind  $\alpha$  direkt und  $\beta$  im Quadrat proportional zur Strahlendosis und lassen sich somit als  $\alpha/\beta$ -Wert zusammenfassen.

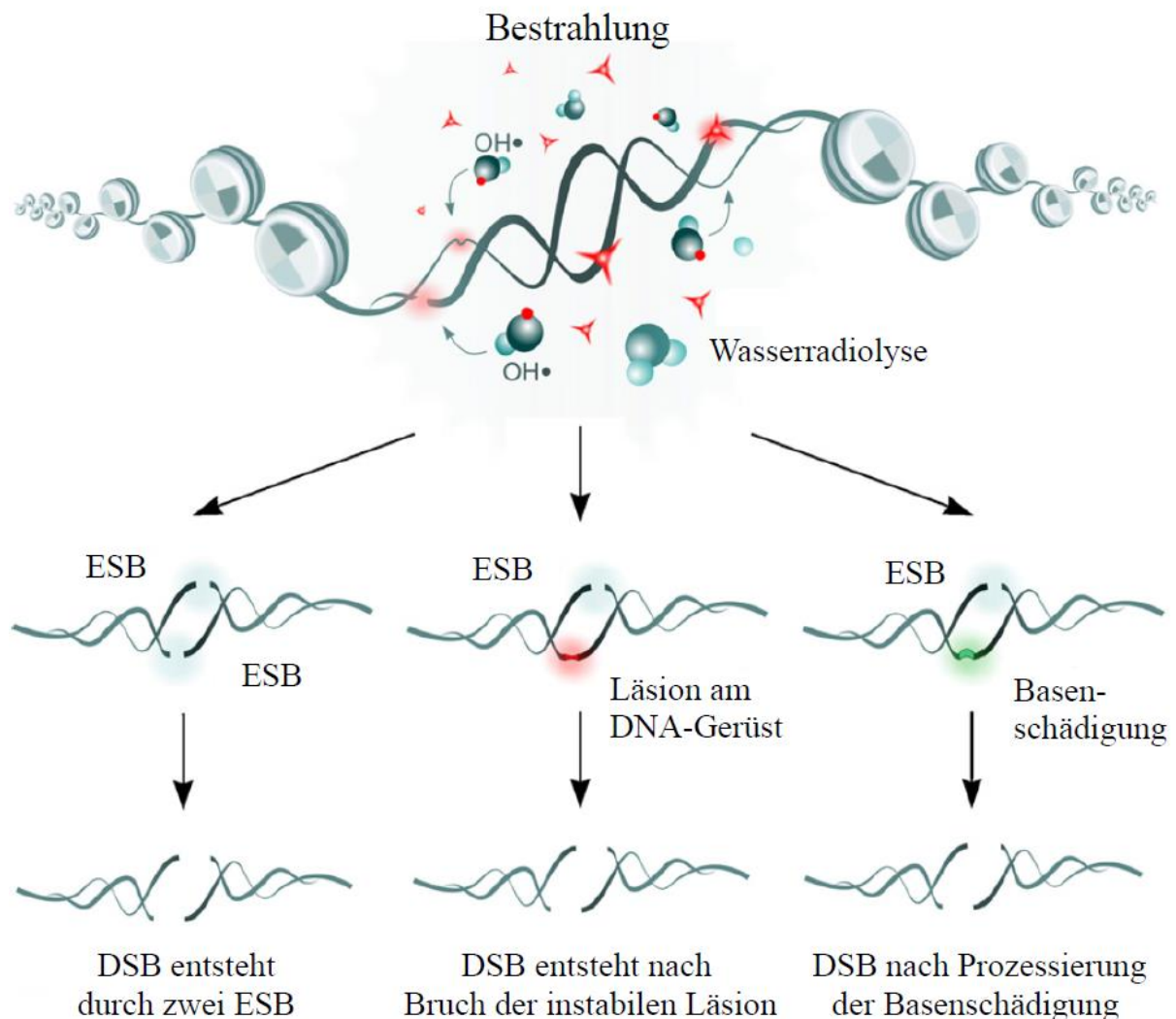
Der  $\alpha/\beta$ -Wert des linear-quadratischen Modells bezeichnet die Dosis, bei welcher linearer und quadratischer Wert den gleichen Anteil am strahleninduzierten Zelltod haben. Für große  $\alpha/\beta$ -Werte überwiegt der lineare Effekt, die Bestrahlungsdosis ist hoch, das Zellüberleben niedrig, es gibt kaum Fraktionierungseffekte. Wird aber fraktioniert bei niedriger Dosis bestrahlt, so überwiegt der quadratische Anteil und damit eine höhere Reparaturkapazität.

Dementsprechend zeichnen sich früh reagierende Gewebe vom H-Typ wie Schleimhäute, Knochenmark sowie die meisten malignen Tumoren durch einen hohen  $\alpha/\beta$ -Wert von etwa 7 bis 20 Gy, spät reagierende Gewebe vom F-Typ wie Gehirn, Rückenmark, Haut, Niere und Lunge durch einen niedrigeren  $\alpha/\beta$ -Wert im Rahmen von 0,1 bis 5 Gy aus (Kauffmann et al., 2006).

## 2.2. Der DNA-Doppelstrangbruch und seine Reparatursysteme

### 2.2.1. Der DNA-Doppelstrangbruch

Verschiedene Möglichkeiten zur Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung zeigt Abbildung 2-2.



**Abbildung 2-2: Die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen**

Aus der Wasserradiolyse infolge einer Bestrahlung resultiert die Bildung reaktiver Hydroxyl-Radikale ( $\text{OH}\cdot$ ). Kommt es an zwei benachbarten DNA-Regionen in beiden DNA-Einzelsträngen zu einem Einzelstrangbruch (ESB, links), so führen beide ESB zu einem Doppelstrangbruch (DSB). Die  $\text{OH}\cdot$  Radikale können  $\text{H}^+$  Ionen aus den Zuckermolekülen der DNA herausbrechen (Bildmitte) und somit instabile Läsionen am DNA-Gerüst verursachen. Zudem vermögen sie sich an die Doppelbindung der Basen der DNA anzulagern und diese zu destabilisieren (rechts) (modifiziert nach Mladenov and Iliakis, 2011).

Im Focus der Strahlenbiologie liegen die Auswirkungen der Radiotherapie auf die Desoxyribonucleinsäure (DNS, im Englischen und im Folgenden DNA). Die DNA besteht aus zwei hinsichtlich ihrer Orientierung antiparallelen Polydesoxyribonucleotidsträngen. Die beiden Einzelstränge werden zusammengehalten durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen jeweils zwei Basen. Die Basenpaarung erfolgt komplementär, womit von der Basensequenz des einen Stranges auf die des anderen geschlossen werden kann. DNA-Doppelstrangbrüche entstehen unter anderem infolge zweier Einzelstrangbrüche in benachbarten Regionen zweier DNA-Stränge (vgl. Abb. 2-2, S. 11). Physiologisch treten DNA-Doppelstrangbrüche im Rahmen der V(D)J-Rekombination in Lymphozyten beim gesunden Menschen auf und sind Grundlage für die Antikörpervielfalt, welche das Funktionieren des Immunsystems gewährleistet (Lees-Miller and Meek, 2003). Eine der Hauptursachen für DNA-Doppelstrangbrüche ist beim behandelten Patienten neben reaktiven Sauerstoffspezies oder bestimmten Zytostatika (Aktories et al., 2009) die Behandlung mit ionisierender Strahlung.

In der Radiotherapie gehen die DNA-Doppelstrangbrüche von den verschiedenen durch Radiotherapie auf DNA-Ebene verursachten Schäden mit der höchsten Zellmortalität einher (Olive, 1998). Eine unvollständige Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen hingegen schwächt die Stabilität des Genoms und kann letztendlich die Entwicklung maligner Neoplasien begünstigen. Auf Höhe Normalnull ist auch der gesunde Mensch stündlich rund 300 Millionen Partikeln ionisierender Strahlung ausgesetzt, deren eine Hälfte kosmischer Strahlung entspricht, wogegen sich die andere Hälfte aus der individuellen Umweltexposition zusammensetzt. Diese Belastung hat täglich schätzungsweise 10 DNA-Doppelstrangbrüche pro Zelle (Lieber, 2010) zur Folge, welche durch komplexe und hocheffektive DNA-Reparaturmechanismen kompensiert werden. Diese werden jeweils zu bestimmten Phasen des Zellzyklus aktiviert.

### **2.2.2. Der Zellzyklus und die Grundlagen der DNA-Reparaturmechanismen**

Der Zellzyklus gliedert sich in Interphase und Mitosephase, wobei die Interphase nochmals unterteilt wird in G1-Phase, S-Phase (Verdopplung des Erbmaterials) und G2-Phase. Er kann zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch Mediatoren gestoppt und an den so genannten Checkpunkten oder Restriktionspunkten angehalten werden. Diese Restriktionspunkte finden sich am Ende der G1-Phase vor Beginn der S-Phase, während der S-Phase sowie in der abschließenden G2-Phase vor Beginn der M-Phase (Kastan and Bartek, 2004). Kommt es zu

einer Schädigung des Erbguts, wird dies an den Checkpunkten registriert, und der Zellzyklus kann über unterschiedliche Effektormechanismen so lange angehalten werden, bis der Schaden repariert ist. Dieser Vorgang wird als „Zelluläre Schadensantwort“ bezeichnet. Ist eine Reparatur nicht möglich, so wird in der betroffenen Zelle die Apoptose induziert (Löffler et al., 2003).

Dient bei einem Einzelstrangbruch der komplementäre DNA-Einzelstrang als Vorlage für die Reparatur durch Basenexzisions- oder Nucleotidexzisionsreparatur (Löffler et al., 2003), so fehlt diese Möglichkeit bei einem DNA-Doppelstrangbruch. Dieser kann durch zwei Mechanismen repariert werden: die Homologe Rekombination (HR) und das Non-Homologous-End-Joining (NHEJ).

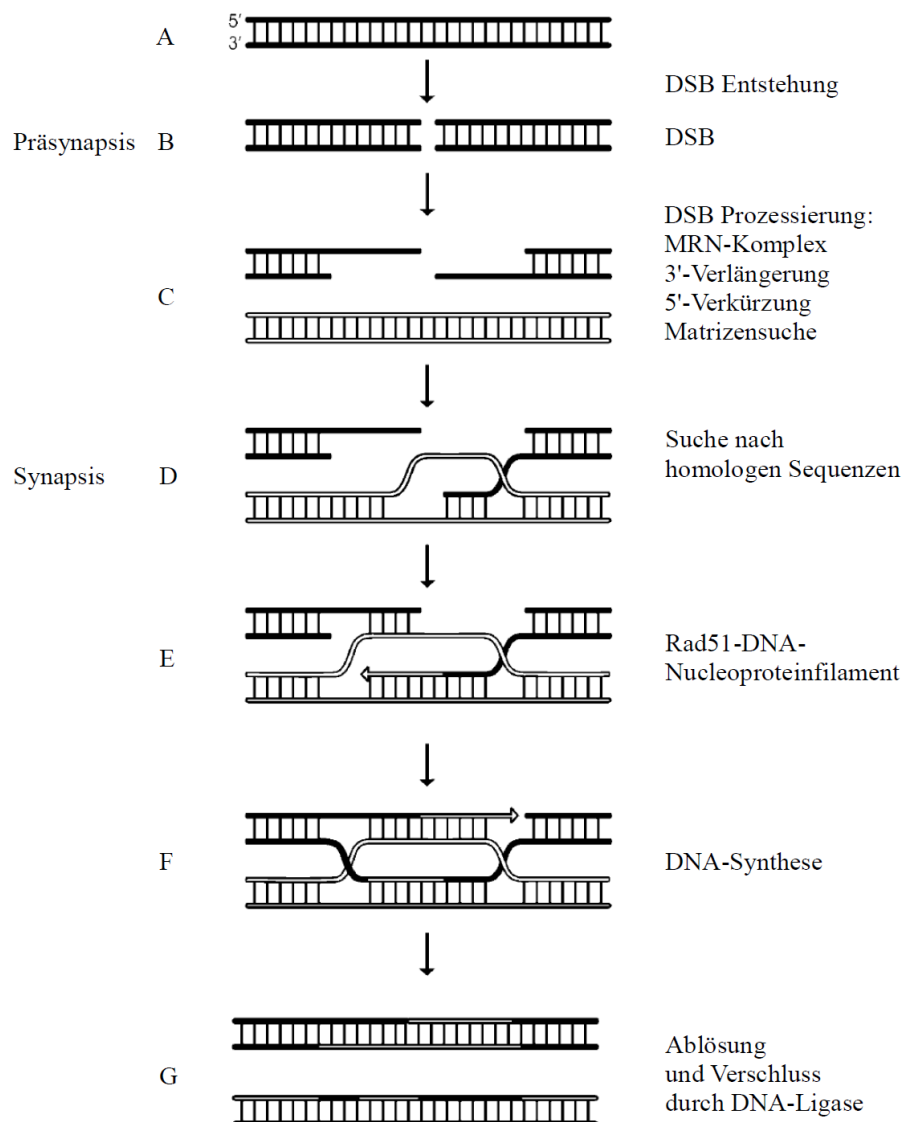
### **2.2.3. Die Homologe Rekombination (HR)**

Die Homologe Rekombination nutzt analog dem Schema der Einzelstrangbruchreparatur intakte DNA als Matrize: Die Vorlage stellt hier ein homologes Chromosom oder auch ein Schwesterchromatid dar. Ein vollständiges Schwesterchromatid ist lediglich in der G<sub>2</sub>-Phase oder mit fortschreitender S-Phase des Zellzyklus verfügbar. Mithilfe eines homologen Chromosoms ist eine Reparatur auch in den G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phasen möglich. Sie findet allerdings nur in eingeschränktem Maße statt (Saleh-Gohari and Helleday, 2004).

Die Homologe Rekombination in 5'-3'-Richtung wird nach der Detektion eines DNA-Doppelstrangbruches eingeleitet vom so genannten MRX- (Hefen) bzw. MRN-Komplex (Vertebraten), bestehend aus Mre11p, Rad50p und Xrs2p (Hefen) oder NBS1 (bei Vertebraten, Jackson, 2002). Ist die Zusammensetzung des MRN-Komplexes nicht gegeben oder beschädigt, resultiert eine erhöhte Strahlensensibilität (Li and Heyer, 2008). Die ersten Schritte der Homologen Rekombination werden auch als Präsynapsis bezeichnet (Li and Heyer, 2008): Dabei wird die Stelle des DNA-Doppelstrangbruchs moduliert, indem der Einzelstrang in 3'-Richtung verlängert und in 5'-Richtung verkürzt wird (vgl. Abb. 2-3, C, S. 14). An dieser Prozessierung ist nicht nur der MRN-Komplex beteiligt, sondern auch die 5'-3'-Exonuclease Exo1 (Li and Heyer, 2008).

An das nun überhängende 3'-Ende bindet aufgrund seiner höheren Affinität zur DNA zunächst das Replikationsprotein A (RPA), das anschließend ersetzt wird durch Rad51, welches wie Rad50 ein Produkt der Genfamilie RAD50 ist (Jackson, 2002; Li and Heyer, 2008).

Diese ersten sowie die folgenden Schritte der Homologen Rekombination werden schematisch in der folgenden Abbildung 2-3 dargestellt.



### Abbildung 2-3: Das Prinzip der Homologen Rekombination (HR)

Nach Entstehung eines DNA-Doppelstrangbruchs (B) kommt es unter Mitwirkung des MRN-Komplexes zur Prozessierung der Enden in der Bruchregion, in 5' Richtung wird der Einzelstrang verkürzt (C). Die bisher beschriebenen Prozesse sind der Präsynapsis zugeordnet. Am überhängenden 3'-Ende bildet sich das Rad51-DNA-Nucleoproteinfilament, welches sich an eine intakte Matrize anlagert und damit die Synapsis einleitet (D). Unter Stabilisierung durch das Rad51-DNA-Nucleoproteinfilament (E) erfolgt nach dem Auffinden homologer Sequenzen die DNA-Synthese (F) und nach erfolgter Reparatur Ablösung und Verschluss mittels DNA-Ligase (modifiziert nach Wyman et al., 2004).

Die Ablösung von RPA durch Rad51 wird katalysiert durch einen Komplex aus Rad52, Rad55 und Rad57 aus der RAD50 Gruppe (Li and Heyer, 2008). Eine regulatorische Funktion

kommt dabei auch dem Tumorsuppressor BRCA2 zu: Rad51 hat Bindungsstellen für BRCA2. Es wird vermutet, dass BRCA2 dadurch regulatorisch in diesen Reparaturmechanismus eingreift (Li and Heyer, 2008). Ist Rad51 gebunden, so wird die DNA entspiralisiert und gespannt (San Filippo et al., 2008), dann beginnt die Suche nach einem Homologen als Matrize. Ist eine Vorlage gefunden, lagert sich das nun entstandene Rad51-DNA-Nucleoproteinfilament an diese an und sucht nach homologen Sequenzen (vgl. Abb. 2-3, D, S. 14). Dieser Vorgang wird der Bezeichnung für die vorhergehende Präsynapsis folgend Synapsis genannt. Eine wichtige Rolle dabei spielt Rad54, welches das Rad51-DNA-Nucleoproteinfilament stabilisiert (Mazin, 2003) und zugleich die Anlagerung an die intakte DNA katalysiert (Li and Heyer, 2008, vgl. Abb. 2-3, E, S. 14). Nach Reparatur der beiden Einzelstrangbrüche durch DNA-Polymerasen bewirkt Rad54 darüber hinaus die Ablösung von Rad51 von der nun reparierten DNA (Li and Heyer, 2008), deren verbleibende Lücke anschließend durch eine DNA-Ligase verschlossen wird (vgl. Abb. 2-3, G, S. 14). Damit sind die beiden defekten Einzelstränge des DNA-Doppelstrangbruchs wieder verbunden und fehlerfrei repariert. Ihre Reparatur hat parallel nach gleichem Muster stattgefunden, lediglich die Ausrichtung erfolgte durch die Reparatur am jeweiligen 3'-Ende antiparallel.

#### **2.2.4. Das Non-Homologous-End-Joining (NHEJ)**

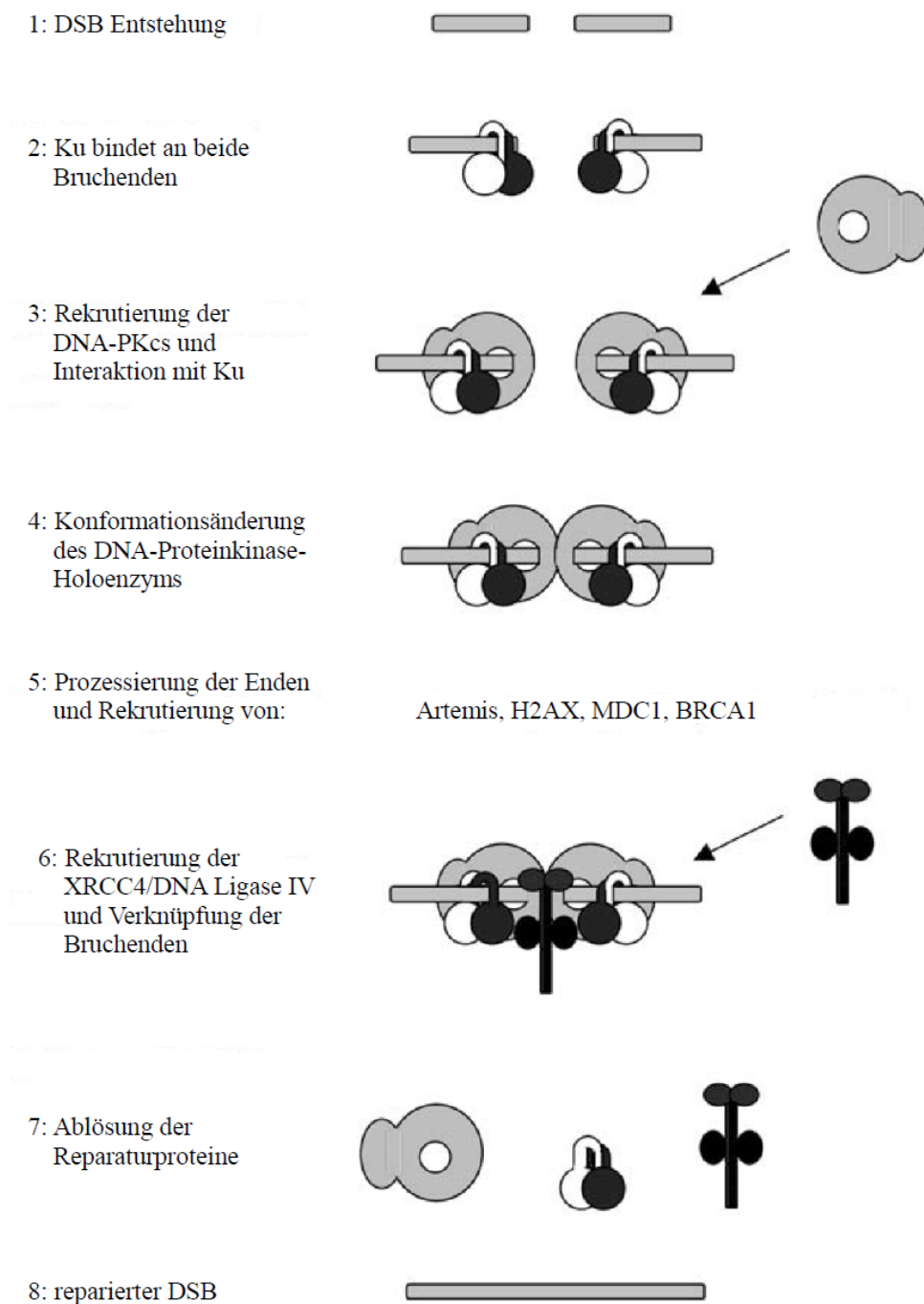
Außerhalb von G2- und S-Phase, also in G0- oder G1-Phase, existiert das Non-Homologous-End-Joining (NHEJ) als bevorzugter Reparaturmechanismus (Lieber, 2010). Das Prinzip des NHEJ beruht auf einer Verbindung der beiden DNA-Bruchstücke durch eine DNA-Ligase und ist damit stets fehlerbehaftet (Mladenov and Iliakis, 2011).

Die zentrale Rolle in diesem Reparaturmechanismus hat das Protein Ku inne, welches aus den beiden Untereinheiten Ku70 und Ku80 zusammengesetzt ist (Jackson, 2002). Ku bindet auf beiden Seiten an einen neu aufgetretenen DNA-Doppelstrangbruch (Lieber, 2010) und bildet eine Ringstruktur um die DNA. Dieser Ring gleitet ein Stück weit über die DNA (Mahaney et al., 2009), lässt so die Bruchstelle zu Reparatur frei und fungiert damit als Türöffner für die weiteren Reparaturproteine. Die der intakten DNA zugewandte Seite hat dabei eine protektive und stabilisierende Funktion, die der Bruchstelle zugewandte, weiter geöffnete Seite ist der Grundpfeiler für die folgende Reparatur (Jackson, 2002). Die Bindung von Ku an die DNA bewirkt eine Konformationsänderung des C-Terminus in den beiden Untereinheiten Ku70 und

Ku80: Während der C-Terminus von Ku70 an die DNA bindet (Lees-Miller and Meek, 2003), bildet der C-Terminus von Ku80 einen längeren Arm zur Protein-Protein-Interaktion sowie eine Bindungsstelle für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase, DNA-PKcs) aus. Die nun folgende Interaktion zwischen Ku und DNA-PKcs funktioniert nur in Gegenwart von DNA (Suwa et al., 1994). Die Bindung der DNA-PKcs an Ku hat eine an 16 Stellen erfolgende Autophosphorylierung der DNA-PKcs zur Folge (Douglas et al., 2002). Diese Reaktion ermöglicht vermutlich eine Konformationsänderung des so entstandenen DNA-Proteinkinase-Holoenzym (DNA-PK) aus Ku und DNA-PKcs, welche für die weiteren Schritte der Reparatur (Prozessieren der Enden bei schweren Schäden, Polymerisation und Ligation) notwendig ist (Mladenov and Iliakis, 2011). Die Prozessierung der Enden ermöglicht das Entfernen weiterer DNA-Schäden in der Bruchregion (Mahaney et al., 2009). Zu den daran beteiligten Enzymen zählt Artemis, welches nach Bindung an den DNA-PK Komplex sowohl als Endonuclease als auch als Exonuclease fungieren kann und damit tiefergehende Schäden aus der Bruchregion herausschneidet (Lieber, 2010). Ist die Aktivität von Artemis gestört, resultiert beim Menschen ein schwerer radiosensibler Immundefekt (Severe Combined Immunodeficiency, SCID, Mahaney et al., 2009). Bei der intakten Reparatur wird Artemis vermutlich aktiviert über Phosphorylierung durch die DNA-PKcs. Dieser Schritt wird allerdings kontrovers diskutiert, da Artemis auch durch die ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated Protein) Kinase phosphoryliert wird (Bhatti et al., 2011). Wie die DNA-PKcs aktiviert sich die ATM Kinase durch Autophosphorylierung selbst (Keegan et al., 1996). Danach kommt es zur Rekrutierung und Phosphorylierung von mehreren Substraten, die an der Reparatur beteiligt sind: Dazu gehören neben H2AX (Burma et al., 2001) auch MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1, ein Mediator des 1. Restriktionspunkts im Zellzyklus) und BRCA1 (Breast Cancer gene 1, Cortez, 1999) sowie p53 (Banin, 1998), Artemis und DNA-PKcs (Czornak et al., 2008).

Nach dem Prozessieren der Bruchenden mit Hilfe der ausgesandten Mediatoren werden die Enden der Bruchstelle durch die XRCC4/DNA Ligase IV verknüpft, welche verkürzt auch als DNA Ligase IV bezeichnet wird (Lieber, 2010). Damit ergibt sich ein Reparaturmechanismus, der durch das Prozessieren der Bruchstücke und das Fehlen einer Restitution der beschädigten Region fehlerhaft ist, aber in der Zelle gegenüber der Homologen Rekombination bevorzugt wird, da er zu allen Zeitpunkten des Zellzyklus einsetzen und rascher als die Homologe Rekombination erfolgen kann.

Die Phasenabfolge des Non-Homologous-End-Joining zeigt die folgende Abbildung 2-4:



**Abbildung 2-4: Das Prinzip des Non-Homologous-End-Joinings (NHEJ)**

*Nach Entstehung eines DNA-Doppelstrangbruchs (1) kommt es zunächst zur Bindung von Ku an beiden Bruchenden (2). Anschließend wird die DNA-PKcs zum Schadensort zitiert (3). Nach Autophosphorylierung der DNA-PKcs ändert sich die Konformation des DNA-Proteinkinase-Holoenzym (4) und die Bruchenden werden unter Rekrutierung weiterer Reparaturproteine prozessiert (5). Um die Bruchenden zu verknüpfen, wird nach erfolgter Prozessierung die XRCC4/DNA Ligase IV rekrutiert (6). Danach kommt es zur Ablösung der Reparaturproteine (7), der DSB ist repariert (modifiziert nach Lees-Miller and Meek, 2003).*



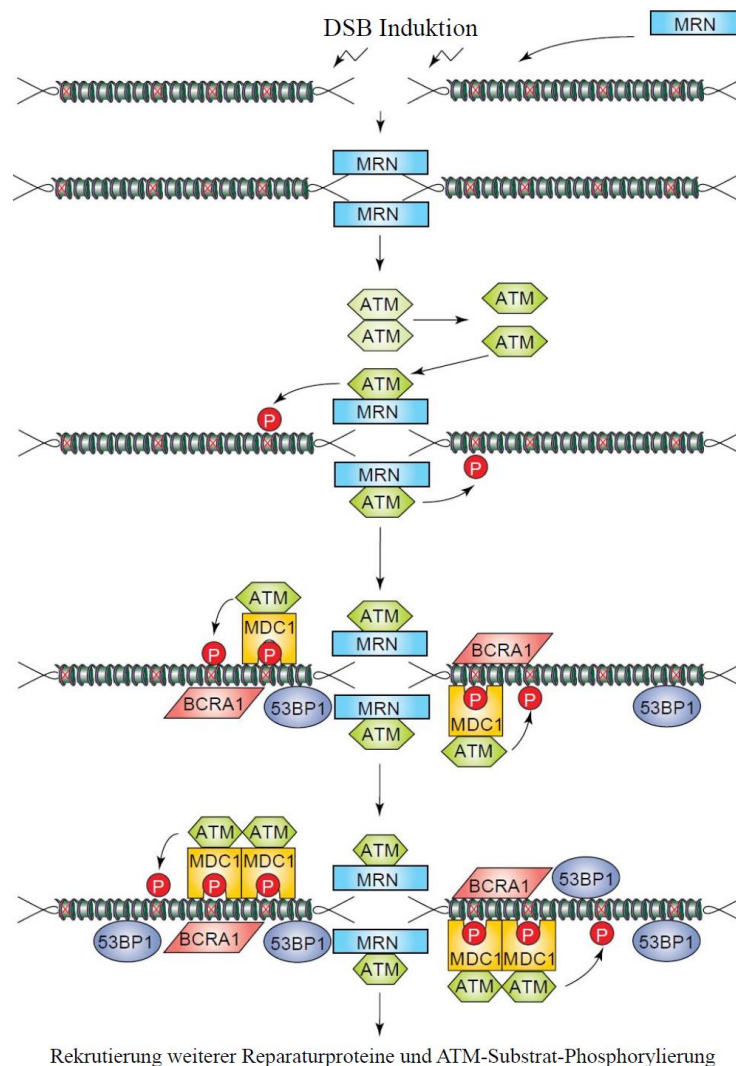
## 2.3. Reparaturproteine der zellulären Antwort

### 2.3.1. Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Protein

Ergibt sich ein DNA-Doppelstrangbruch, so adhären binnen kürzester Zeit verschiedenste Reparaturproteine und Reparaturenzyme, darunter die DNA-PKcs, ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated Protein) und ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad-3-related Protein), welche den Zellzyklus verlangsamen und arretieren können.

Bei ATM handelt es sich um eine 350 kDa große Serin-Threonin-Kinase, der im Rahmen der Reparaturmechanismen nach Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen eine wichtige Rolle zukommt. Ihr Aufbau ähnelt dem der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K), daher wird sie auch als PI3K-like Kinase bezeichnet (PIKK, Bhatti et al., 2011). Diesen PIKK-Aufbau teilt ATM mit zwei weiteren Proteinen: der ATM-and-Rad3-related-Kinase (ATR) und der DNA-PKcs. Gemeinsam ist ihnen eine ähnliche Zusammensetzung der Kinaseregion aus FAT- und FATC-Domänen sowie einer Kinaseuntereinheit (McKinnon, 2012). Die Bezeichnung ATM entspringt der ursprünglichen Beobachtung, dass Mutationen in diesem Gen ursächlich für die Entstehung der Ataxia Teleangiektasia beim Menschen sind.

Nach Detektion eines DNA-Doppelstrangbruchs (vgl. Abb. 2-5, S.19) kommt es abhängig vom MRN-Komplex, der als Sensor für Doppelstrangbrüche fungiert (Lee and Paull, 2007), zur Aktivierung von ATM über Autophosphorylierung an verschiedenen Serinresten, vor allem aber am Serinrest 1981, sowie zur Acetylierung von Lysinrest 3016. Diese Aktivierung von ATM geht mit einer Konformationsänderung einher: Liegt ATM normalerweise als inaktives Dimer vor, so wird es durch die Prozessierung umgewandelt in aktive Monomere (Bakkenist and Kastan, 2003). *In vitro* ist allerdings auch eine Monomerisierung von ATM ohne vorhergehende Autophosphorylierung beobachtet worden (Lee and Paull, 2007). Dies legt den Schluss nahe, dass für die Monomerisierung die Präsenz sowohl von DNA als auch des MRN-Komplexes maßgeblich entscheidend sind. Ferner ist die Aktivität von ATM Regulationsmechanismen unterworfen: *In vivo* wird die Autophosphorylierung von ATM mitgesteuert von der Protein-Phosphatase 2A (PP2A), welche möglicherweise auch ATM dephosphoryliert (Lee and Paull, 2007). Liegt ATM als Monomer vor, beginnt es, eine Reihe von Substraten zu phosphorylieren, die in die Regulation des Zellzyklus eingreifen. Ein Teil dieser Aktivierungskaskade um ATM ist im folgenden Schema (Abb. 2-5, S. 19) abgebildet:



**Abbildung 2-5: Funktionen von ATM in der zellulären Schadensantwort**

Nach Detektion eines DNA-Doppelstrangbruchs kommt es in Gegenwart von DNA und gebundenem MRN-Komplex zur Autophosphorylierung und Monomerisierung von ATM. Das ATM Monomer bindet an den MRN-Komplex und rekrutiert weitere Substrate im Rahmen der DNA-Reparatur: Dazu gehören beispielsweise MDC1, BCRA1 und 53BP1. Die Histonvariante H2AX, welche in der Abbildung mit einem roten X markiert ist, wird von ATM phosphoryliert. Siehe Text zur Erläuterung dieser und weiterer Faktoren (modifiziert nach Shiloh, 2006).

Ein weiteres von ATM phosphoryliertes Substrat ist das KRAB (Krüppel Associated Box, Domäne von Transkriptionssuppressorproteinen) -Assoziierte Protein 1 (KAP1), welches eine Schlüsselrolle in der DNA-Reparatur innehat: Es verursacht eine Relaxierung des Chromatins (Ziv et al., 2006) und ermöglicht so erst den Zugang der Reparaturproteine zu den Bruchstellen in der DNA. Daneben phosphoryliert ATM BRCA1, welches eine regulatorische Kontrolle über die Kinaseaktivität von ATM ausübt (Lee and Paull, 2007), und MDC1, das an der Aufrechterhaltung der ATM-DNA-Interaktion beteiligt ist.

Weitere Substrate der ATM und auch der ATR Kinasen sind die Checkpunkt-Kinasen (ChK). Über die Steuerung dieser Kinasen sind ATM/ATR in der Lage, den Zellzyklus nicht nur zu verlangsamen, sondern auch die G1- oder G2-Phase anzuhalten (Kastan and Bartek, 2004). Eine der Checkpunkt-Kinasen ist die ChK2, zu deren Substraten Cdc25A und Cdc25C (Cdc: Cell division cycle Kinase) gehören. Diese beiden Substrate wirken unphosphoryliert als treibende Kräfte auf den Zellzyklus. Cdc25A aktiviert die Cdk2 (Cyclin dependent Kinase) und gibt die Zelle zur S-Phase frei, während Cdc25C die Cdc2 aktiviert und nach der G2-Phase den Weg in die Mitose eröffnet (Zgheib et al., 2005). Erfolgt allerdings im Rahmen einer DNA-Schädigung eine Phosphorylierung dieser Enzyme, so werden sie dadurch in ihrer Funktion inhibiert. Damit wird der Zellzyklus angehalten.

Neben den ChK kann von ATM auch p53 aktiviert werden (Banin, 1998): p53 ist Substrat sowohl von ATM als auch von ChK2 (Zgheib et al., 2005). Zunächst wird p53 über ATM phosphoryliert und aktiviert, danach verstärkt sich das Signal durch eine weitere Rekrutierung von p53 durch ChK2. Aktiviertes p53 wirkt über mehrere Mechanismen: Einerseits induziert es p21, welches über die Inhibition der Cdk2 den Zellzyklus in der G1-Phase arretiert, andererseits wirkt p53 auch als Transkriptionsfaktor für Apoptose-induzierende Genprodukte (Zgheib et al., 2005). Weiteres Substrat von ATM ist die Histonvariante H2AX (Burma et al., 2001).

### 2.3.2. $\gamma$ H2AX

Die DNA findet sich im Zellkern in einem Komplex mit Proteinen, den Histonen, als Chromatin. Unter Assoziation mit den Histonen bildet die DNA Nucleosomen aus, was eine maximale Kondensation der DNA ermöglicht.

Eines dieser Histonproteine ist H2AX als Variante von H2A. Kommt es zu einem DNA-Doppelstrangbruch, so wird H2AX (vgl. Abb. 2-5, S.19) in der Bruchregion an Serinrest 139 und Tyrosinrest 142 (Cleaver, 2011) hauptsächlich von ATM (zum Teil auch durch die verwandten Kinasen DNA-PKcs und ATR) phosphoryliert (Burma et al., 2001). Die phosphorylierte Form von H2AX wird als  $\gamma$ H2AX bezeichnet.  $\gamma$ H2AX bewirkt eine Dekondensierung des Chromatins und somit eine Freilegung der Bruchstelle. Dabei sind in einer Bruchstellenregion  $10^2$  bis  $10^3$  H2AX Proteine beteiligt (Cleaver, 2011):  $\gamma$ H2AX fungiert hier als Grundstein für den Aufbau des DNA-Reparaturproteingerüsts, dem auch MRN-Komplex, MDC1, Rad50, 53BP1 und BRCA1 angehören. Dabei ist  $\gamma$ H2AX weniger

für die Rekrutierung dieser Proteine als vielmehr für deren Bindung an die Bruchstellenregion verantwortlich (Cleaver, 2011).  $\gamma$ H2AX bewirkt darüber hinaus eine Annäherung und Stabilisierung der beiden Bruchstücke während der Reparatur durch eine Neuausrichtung der Nucleosomen der betroffenen Region (Mah et al., 2010). Da Reparaturproteine wie  $\gamma$ H2AX in so genannten "Radiation-Induced Foci" (RIF) akkumulieren, können sie mittels Antikörper detektiert werden. Die  $\gamma$ H2AX Foci können sofort nach Bestrahlung nachgewiesen werden und dienen somit als Indikatoren für DNA-Doppelstrangbrüche. Jedem DNA-Doppelstrangbruch entspricht dabei ein  $\gamma$ H2AX Focus, aber umgekehrt entspricht nicht jedem  $\gamma$ H2AX Focus ein DNA-Doppelstrangbruch, da  $\gamma$ H2AX auch nach der Reparatur der Bruchstelle persistieren kann (Mah et al., 2010).

### 2.3.3. 53BP1

53BP1 wurde nach seiner Fähigkeit p53 zu binden benannt als p53 Binding Protein 1 (Iwabuchi et al., 2003). Es besitzt C-terminal BRCT-Domänen (Wang et al., 2002) sowie zwei Tudor-Domänen (Huyen et al., 2004). Über die Tudor-Domänen ist eine Interaktion mit methylierten Histonen nachgewiesen worden (FitzGerald et al., 2009). So bindet 53BP1 *in vitro* bevorzugt an Histon H3, welches an Lysinrest 79 methyliert ist. Wird die Methylierung des Lysinrests 79 verhindert, so ist auch keine Bindung von 53BP1 an H3 nachweisbar. Dabei basiert die Bindung nach DNA-Schädigung weniger auf der Neumethylierung von Lysinrest 79 an H3 als vielmehr auf einer durch die Chromatindenkondensation bewirkte verbesserte Zugänglichkeit von bereits bestehendem methyliertem Lysinrest 79 (Huyen et al., 2004).

*In vitro* ist nachgewiesen worden, dass 53BP1 über die Tudor-Domänen außerdem in der Lage ist, an  $\gamma$ H2AX zu binden (Ward et al., 2003). Demgegenüber ist die Rekrutierung von 53BP1 an der Bruchstelle in H2AX-defizienten Zellen allerdings nicht eingeschränkt.

Ferner besitzt 53BP1 ein so genanntes GAR Motiv (glycine-arginine-rich region), welches in methylierter Form vermutlich eine Rolle bei der Bindung an DNA Bruchstellen spielt (FitzGerald et al., 2009).

Über die Rekrutierung und Aktivierung wie auch über die Rolle von 53BP1 existieren verschiedene Annahmen. So wird 53BP1 sowohl am C- als auch am N-Terminus phosphoryliert durch ATM und DNA-PKcs (Harding and Bristow, 2012). Diese Phosphorylierung ist allerdings keine Grundvoraussetzung für die Aktivierung und

Rekrutierung von 53BP1. Vielmehr handelt es sich dabei um eine Rückkopplung: Die Aktivierung von 53BP1 erfolgt auch in Abwesenheit von ATM (Zgheib et al., 2005), dessen Autophosphorylierung an Serin 1981 durch 53BP1 unterstützt wird. Diese funktioniert jedoch auch in 53BP1-defizienten Zellen (Dimitrova et al., 2008). Weiteres Substrat von 53BP1 ist die ChK2 (FitzGerald et al., 2009). Da die Aktivierung von 53BP1 auch in p53-defizienten Zellen ohne Einschränkung stattfindet (Schultz et al., 2000), ergibt sich die Möglichkeit, 53BP1 als DNA-Schadenssensor zu betrachten, der mehrere Funktionen innerhalb des Regelwerks der Detektion und Reparatur von DNA-Doppelbrüchen innehat.

Nach Dimitrova et al. bewirkt 53BP1 nach Bindung an das methylierte Histonprotein H3 eine erhöhte Mobilität des Chromatins in der Bruchregion (Dimitrova et al., 2008). FitzGerald et al. schlugen folgendes Modell für die Aktivierung von 53BP1 vor: MDC1 bindet an  $\gamma$ H2AX und wird ATM-abhängig phosphoryliert (FitzGerald et al., 2009). Phosphoryliertes MDC1 rekrutiert daraufhin RNF8 (Ring Finger Protein 8), welches letztendlich 53BP1 zum Schadensort zitiert. Aber auch  $\gamma$ H2AX ist keine *Conditio sine qua non* im Hinblick auf die Rekrutierung von 53BP1 (Celeste et al., 2003). Anders verhält es sich mit der Bindung von 53BP1 an MDC1: Diese ist für die Bildung von 53BP1 Foci essenziell (Eliezer et al., 2009), welche immunhistochemisch eine Kolokalisation mit  $\gamma$ H2AX Foci zeigen (Harding and Bristow, 2012).

Die Bedeutung von 53BP1 für die Integrität des Genoms zeigt sich darüber hinaus bei 53BP1-defizienten Zellen: Ein Knockout von 53BP1 führt zu einer Genominstabilität und erhöhter Anfälligkeit gegenüber DNA schädigenden Noxen (FitzGerald et al., 2009).

## **2.4. Untersuchte Immundefizienz-Syndrome**

### **2.4.1. Ataxia Teleangiektasia (AT) / Louis-Bar-Syndrom**

Das Krankheitsbild der Ataxia Teleangiektasia wurde erstmals vor über 80 Jahren (1926) von Syllaba und Henner beschrieben. Der Krankheit liegt ein Gendefekt auf Chromosom 11q22-23 zugrunde, welcher das ATM Gen betrifft (Lavin, 2008). Dieser Gendefekt wird autosomal-rezessiv vererbt mit einer heterozygoten Träger-Inzidenz von 0,5 bis 1% (Thompson et al., 2005). Es handelt sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die sich bereits im frühen Kindesalter (ab drei Jahren) durch Ataxien manifestiert. Mit 10 Jahren

werden die Patienten in den meisten Fällen rollstuhlpflichtig und es kommt darüber hinaus zu einer Reflexverarmung (Perlman et al., 2003). Ab der dritten Lebensdekade kann es zu einer Verlangsamung der Progredienz der neurodegenerativen Komponente kommen. Wird dieses Alter erreicht, so manifestiert sich die Erkrankung in etwa einem Drittel der Patienten besonders schwer als Multisystemerkrankung durch Immunschwäche und rezidivierende bronchopulmonale Infekte. Patienten des zweiten Drittels sind demgegenüber deutlich weniger eingeschränkt, und Patienten des letzten Drittels zeigen kaum Symptome einer Beeinträchtigung des Immunsystems (Perlman et al., 2003). Neben der neurodegenerativen Manifestation existiert ein weit gefasster Symptomkomplex des Krankheitsbildes Ataxia Teleangiektasia. Namengebend sind dabei unkontrollierte Bewegungen sowie okuläre und faziale Teleangiektasien. Die Ataxie ist cerebellär bedingt und hat ihren Ursprung im Verlust der Purkinje- und Körnerzellen des Cerebellums (Lee and McKinnon, 2000). Die Affektion des Cerebellums bedingt häufig eine begleitende Dysarthrie sowie Koordinationsstörungen. Hinzu kommen eine chromosomale Instabilität insbesondere der Chromosomen 7 und 14 (Muntau, 2011), eine Prädisposition zur Entwicklung maligner Knochenmarksneoplasien (Lebenszeitrisiko 30%), Sterilität und eine gegenüber der Normalbevölkerung deutlich erhöhte Strahlensensibilität (Lee and McKinnon, 2000). Diagnostische Hinweise ergeben sich neben der Klinik durch den Nachweis der chromosomalen Instabilität und von erhöhten Werten des  $\alpha$ -Fetoproteins (McKinnon, 2012). Die Haupttodesursachen sind Malignomentwicklung, Infektionen und Versagen der respiratorischen Organe (Perlman et al., 2003).

Heterozygote Merkmalsträger sind zunächst klinisch weitestgehend unauffällig, haben aber im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Krebsrisiko. Insbesondere betrifft dies den familiären Brustkrebs, welcher in etwa 5% der Fälle mit ATM-Heterozygotie einhergeht (Swift et al., 1991). Zu ähnlicher Symptomatik führen Mutationen, welche den MRN-Komplex betreffen. Hauptmerkmal ist auch hier eine progrediente Neurodegeneration, welche aber im Vergleich zur Ataxia Teleangiektasia schwächer ausgeprägt ist (Stewart et al., 1999). Daher werden diese Erkrankungen als Ataxia Teleangiektasia like Diseases (ATLD) bezeichnet.

Maus-Tiermodelle, bei denen das ATM-Gen durch so genanntes Gantargeting ausgeschaltet wurde (Barlow et al., 1996), sind ATM-defizient, da sie kein funktionsfähiges ATM-Genprodukt bilden können. Homozygote ATM-defiziente ( $ATM^{-/-}$ ) Tiere zeigen neben ähnlichen Symptomen wie beim Menschen beschrieben eine Wachstumsretardierung, die sich

insbesondere in einer verzögerten Gewichtszunahme äußert, und entwickeln mit zwei bis vier Monaten Malignome des Thymus (Barlow et al., 1996). Diese aggressiv wachsenden Lymphome des Thymus führen bei der Mehrzahl der homozygoten  $ATM^{-/-}$  Tiere durch Kompression des Mediastinums oder frühzeitige Metastasierung zum Tode (Barlow et al., 1996). Heterozygote  $ATM^{+/-}$  Tiere hingegen unterscheiden sich im Gewicht nicht signifikant von gesunden  $ATM^{WT}$  Mäusen.

#### **2.4.2. Severe Combined Immunodeficiency (SCID)**

Unter SCID, der Severe Combined Immunodeficiency, wird ein vererbter Immundefekt verstanden, der charakterisiert ist durch eine Fehlfunktion oder das vollständige Fehlen von Lymphozyten. Aktive natürliche Killerzellen können hingegen vorhanden sein. Es handelt sich dabei um einen der schwersten kongenitalen Immundefekte (van der Burg and Gennery, 2011). Die Inzidenzrate beträgt bei Neugeborenen 1:75.000 bis 1:100.000.

Generell wird unterschieden zwischen Patienten, die funktionsfähige B-Lymphozyten besitzen (T negativ B positiv (T-B+), 50 bis 60% der Fälle) und Patienten, bei denen weder B- noch T-Lymphozyten ausgebildet werden (T negativ, B negativ (T-B-)); diesem Teil entsprechen etwa 30% der Patienten (Dvorak and Cowan, 2010). Darüber hinaus existiert eine atypische T-B+ Variante, die sich durch einen progredienten Verlust an B-Lymphozyten auszeichnet (Fischer, 2000).

Klinisch manifestiert sich der Immundefekt nach initial gutem Wachstum durch rezidivierende bronchopulmonale Infekte, Diarrhoe, Malabsorptionssyndrom mit Wachstumsretardierung sowie systemische Infekte (Fischer, 2000). Als ursächlich wurden je nach SCID Phänotyp verschiedene Genmutationen identifiziert, welche auch kombiniert auftreten können.

Bei der RS-SCID, einer besonders radiosensitiven Form dieses Immundefekts, gibt es derzeit zwei benannte ursächliche Gendefekte. Der erste betrifft den 10p-Abschnitt von Chromosom 10. Davon betroffen ist das Gen, welches für das DNA-Reparaturprotein Artemis kodiert (Dvorak and Cowan, 2010). Besonders häufig findet sich RS-SCID bei amerikanischen Ureinwohnern, den so genannten Athabaskan-Indianern, mit einer Inzidenz von mehr als 50 Betroffenen pro 100.000 (Dvorak and Cowan, 2010).

Das im Rahmen der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen aktivierte DNA-Reparaturprotein Artemis ist auch essenziell für die V(D)J-Rekombination, welche

ursächlich ist für die Variabilität von Antikörpern. Bei der V(D)J-Rekombination handelt es sich um eine Aufspaltung der für den Antigenrezeptor kodierenden Gene durch die RAG (Recombination Activating Genes) -Proteine, welche ausschließlich in Vorläuferzellen der B- und T-Lymphozyten exprimiert werden (Schwarz et al., 2003). Nach einem Neuarrangement werden die entsprechenden DNA-Abschnitte durch Doppelstrangbruchreparatur wieder verbunden. In Artemis-defizienten Zellen werden die Endstücke der Bruchregion nicht prozessiert und es akkumulieren nicht geöffnete DNA-Haarnadelstrukturen (Mahaney et al., 2009).

Der Hauptdefekt in RS-SCID Organismen scheint damit die unzureichende Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zu sein (Moshous et al., 2001). Artemis-defiziente Zellen zeigen zwar eine deutlich erhöhte Strahlensensibilität, aber sie fallen allenfalls geringfügig durch eine verminderte Kapazität der DNA-Doppelstrangbruchreparaturmechanismen auf (Wang et al., 2005). Dies lässt den Schluss zu, dass das Öffnen von DNA-Haarnadelstrukturen zu den Hauptfunktionen von Artemis zählt und dass die DNA-Enden solcher Haarnadelstrukturen zu den Hauptsubstraten von Artemis zu zählen sind. Diese können in Artemis-defizienten Zellen nicht repariert werden und führen somit zu einer geringfügig verminderten DNA-Reparaturkapazität (Wang et al., 2005).

Neben der Artemis-Genmutation können auch Mutationen der DNA-PKcs ein klinisch vergleichbares Bild hervorrufen (van der Burg et al., 2009). Ein Beispiel dafür ist die Mutation des Kodons für den Leucinrest an Position 3062 (L3062). Dabei kommt es weder zu einer eingeschränkten Akkumulation der DNA-PKcs in der Bruchstellenregion noch zu einer gestörten Autophosphorylierung. Die Folge dieser L3062 Mutation besteht vielmehr in einer verringerten Aktivierung von Artemis, was die vom Artemis-Defekt kaum unterscheidbare klinische Symptomatik erklärt (van der Burg et al., 2009).

Auch bei der in dieser Arbeit untersuchten SCID Mauslinie ist die DNA-PKcs von einer Mutation betroffen, die spontan aufgetreten ist und einem autosomal-rezessiven Erbgang unterliegt. Mäuse, die homozygot für diese Mutation sind, wurden zufällig 1980 am Fox Chase Cancer Center in Philadelphia entdeckt (Bosma and Carroll, 1991). Es handelt sich dabei um eine auf dem Chromosom 16 lokalisierte Substitution eines Nucleotids, wodurch ein Stoppcodon im Prkdc Gen entsteht, welches normalerweise für die DNA-PKcs kodiert (Charles River Laboratory, 2009). Diese trunkierende Mutation führt dazu, dass die Translation 83 Aminosäurenreste vor dem C-terminalen Ende abgebrochen wird, wobei es im Gegensatz zur fehlenden lymphoiden Differenzierung nicht zu einer Differenzierungsstörung



der myeloiden Zelllinien kommt. Damit verfügen die homozygoten SCID Mäuse auf der zellulären Ebene über ein intaktes unspezifisches Immunsystem, bestehend aus natürlichen Killerzellen und Granulozyten, nicht aber über ein funktionierendes lymphozytäres Immunsystem. Dies ist begründet im Defekt der DNA-PKcs, welche wie Artemis für die physiologisch notwendige somatische Rekombination von Immunglobulin-Genelementen, der so genannten V(D)J-Rekombination, und auch für den DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismus des NHEJ benötigt wird.

Die mutationsbedingte Funktionseinschränkung der DNA-PKcs verursacht damit neben der Immundefizienz der SCID Mäuse auch eine erhöhte Strahlensensibilität, welche im Rahmen dieses Projekts am Gewebe der Lunge untersucht wurde.

## **2.5. Folgen der pulmonalen Bestrahlung**

Bei einer thorakal applizierten radiotherapeutischen Bestrahlung ist eine Mitbelastung der Lunge meist unumgänglich. Da die Reaktion der Lunge auf Bestrahlung als eine der schwersten Komplikationen der Strahlentherapie gilt, kommt der Strahlenbelastung der Lunge bei Radiotherapie des Thoraxbereichs neben der des Spinalkanals eine dosislimitierende Bedeutung zu (Herrmann and Baumann, 1997).

Die Bestrahlung der Lunge kann sowohl eine Pneumonitis als auch eine Lungenfibrose zur Folge haben. Dabei tritt die Pneumonitis typischerweise im Zeitraum von einem bis sechs Monaten nach Bestrahlung auf, wohingegen die Lungenfibrose frühestens nach mehr als sechs Monaten nachzuweisen ist und damit eine Spätfolge darstellt (Morgan and Breit, 1995). Nach der Bestrahlung durchläuft der Patient zunächst eine subklinische Latenzphase, die jedoch durch Zytokinausschüttung, Zell-Zell-Aktivierung (Morgan and Breit, 1995) sowie durch elektronenmikroskopisch nachweisbare Schäden an den Pneumozyten und den Endothelzellen in Form von Schwellungen des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien einerseits und dem Platzen von Zellmembranen andererseits (Rübe et al., 2000) gekennzeichnet ist. Schon 1939 war für diese Phase der radiogenen Reaktion der Lunge von verdickten Alveolarepten und einer Schwellung des Lungengewebes berichtet worden (McIntosh and Spitz, 1939).

Nach etwa einem bis drei Monaten zeigt der Patient je nach Bestrahlungsdosis in unterschiedlichem Schweregrad die Symptome einer Pneumonitis mit Husten, Auswurf,

Dyspnoe, Fieber und Thoraxschmerz (Stone et al., 2003). Histologisch kommt es vor allem zu einer Schädigung der Typ I und Typ II Pneumozyten, wobei letztere bei Mäusen eine Erneuerungsrate von 20 bis 35 Tagen (Gross, 1977) und beim Menschen Zellzykluszeiten von etwa 80 Tagen (Herrmann and Baumann, 1997) aufweisen und damit neben den Alveolarmakrophagen zu den strahlensensitiveren Zellarten der Lunge zu rechnen sind (Coggle et al., 1986). So kommt es innerhalb von 60 Minuten nach Strahlungsexposition in den Typ II Pneumozyten, die den Surfactant produzieren und in Vesikeln speichern, zu einer Abnahme der Zahl dieser Vesikel (Movsas et al., 1997). Die Typ II Pneumozyten fungieren zudem als Stammzellen für die Typ I Pneumozyten. In den Typ I Pneumozyten kommt es infolge der Bestrahlung zu einer Degeneration der Organellen und damit zu deren Dezimierung (Coggle et al., 1986). Nach 24 weiteren Stunden bildet sich ein subendotheliales und perivaskuläres Ödem aus (Movsas et al., 1997), und es kommt zur Exsudation in die Alveolen (Stone et al., 2003), welche aufgrund des relativen Surfactantmangels unter Atelektasenbildung teilweise kollabieren. Daraus resultieren Dyspnoe sowie eine Verschlechterung des Gasaustauschs.

Im Rahmen der Entzündung kommt es im Alveolarraum zu einer Proliferation sowohl der Alveolarmakrophagen als auch der Typ II Pneumozyten, welche durch Schwellung und Vergrößerung der verbliebenen Vesikel bestrebt sind, den Surfactantmangel zu kompensieren (Movsas et al., 1997). Der Entzündung kann nach Monaten oder auch Jahren die Entwicklung einer Lungenfibrose folgen, welche vor allem gekennzeichnet ist durch Gefäßschäden und Kollagenablagerungen (Stone et al., 2003) und deren Folge eine pulmonale Insuffizienz sein kann.

Im Bronchialepithel verursacht die Strahlung in geringerem Maße zelluläre Schäden. So finden sich nach einer Bestrahlung mit 30 Gy in Bronchialepithelzellen des Menschen, in Zellkulturen und auch im Tiermodell zwei Wochen nach Bestrahlung lediglich geringfügige Zellschäden, welche bis zur dritten Woche noch zunehmen, aber spätestens nach acht Wochen nahezu ausgeheilt sind (Bergner et al., 2003). Insgesamt stößt die Bestrahlung im Bronchialepithel mehrere Signalkaskaden an: Es kommt unter dem Einfluss von p53 als Transkriptionsfaktor in den ersten Stunden nach Bestrahlung zur Produktion und Freisetzung der Matrixmetalloproteinase 2 (4 und 8 Gy, Araya et al., 2001) sowie zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\alpha$ , Interleukin-6, 12 Gy, Rube et al., 2005) aus den Bronchialepithelzellen. Ferner ist eine vermehrte Expression und Freisetzung von TGF- $\beta$  (Transforming-Growth-Factor- $\beta$ ) aus

Fibroblasten und Typ II Pneumozyten nach Einzelbestrahlungen im Bereich von 6 Gy nachgewiesen worden (Rübe et al., 2000). TGF- $\beta$  stimuliert die Kollagensynthese (Morgan and Breit, 1995) und wird als Schlüsselfaktor für die Fibrosierungsreaktion nach Bestrahlung betrachtet (Pelton and Moses, 1990).

In der Literatur ist TGF- $\beta$  als wichtigstes Zytokin im Rahmen der fibrotischen Umwandlung der Lunge als Folge von Bestrahlung beschrieben (Rodemann and Bamberg, 1995). Die Gruppe der TGF- $\beta$  1 bis 4 wurde 1981 erstmals nachgewiesen (Moses et al., 1981; Roberts et al., 1981). Um an spezifische Rezeptoren binden zu können, muss die extrazellulär vorliegende Vorläuferform von TGF- $\beta$ , welche beispielsweise durch das Latente TGF- $\beta$  Binding Protein (LTBP) stabilisiert wird, zunächst aktiviert werden, was *in vitro* unter Einfluss einer pH-Wert-Verschiebung in sowohl saures als auch alkalisches Milieu, thermische Variation oder Proteolyse geschieht (Massagué, 1998). TGF- $\beta$ , in aktiver Form als Dimer vorliegend, wirkt über Bindung an einen TGF Typ I oder Typ II Rezeptor. Nach der Bindung kommt es zur Phosphorylierung und Komplexbildung der beiden Rezeptoren. Der so entstandene Komplex aktiviert intrazellulär SMAD Proteine, welche als Effektoren des TGF- $\beta$  fungieren (Massagué, 1990) und auf Transkriptionsebene wirken. Dies manifestiert sich bereits darin, dass TGF- $\beta$ 1 über eine positive Rückkopplung die eigene Transkription verstärkt (Massagué, 1990). In der unbestrahlten Lunge wird TGF- $\beta$  zunächst nur von Alveolarmakrophagen exprimiert (Hagimoto et al., 2002). Kommt es zur Schädigung der Zellen durch Einwirkung von Noxen wie beispielsweise Strahlung oder Bleomycin, wird TGF- $\beta$  aus den Makrophagen freigesetzt, stimuliert die eigene Expression nun auch in anderen Zellen des Lungengewebes wie Fibroblasten oder Typ II Pneumozyten und wirkt stimulatorisch auf die Proliferation der Fibroblasten. In den Bronchialepithelzellen der Lunge verstärkt TGF- $\beta$  die Fibronectin-Expression und Kollagensynthese (Massagué, 1990). Werden TGF- $\beta$  exprimierende Adenoviren in die Lunge von Mäusen oder Ratten eingebracht, so kommt es zu einer signifikanten Fibrose des Lungengewebes (Degryse et al., 2011). Verabreicht man dagegen Antikörper gegen TGF- $\beta$ , ist nach einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose bei Mäusen eine Abnahme der Kollagenablagerungen zu beobachten (Coker and Laurent, 1998). Bei einer Defizienz für den TGF- $\beta$  Rezeptor kommt es entsprechend nicht zu einer fibrotischen Umwandlung des Lungengewebes nach Bleomycin-Applikation (Degryse et al., 2011). Ferner vermag TGF- $\beta$  in Bronchialepithelzellen Apoptose auszulösen. So greift TGF- $\beta$  hemmend in das p21-System ein, welches durch die Bildung eines ProCaspase3-p21-Komplexes antiapoptotisch wirkt, und aktiviert auf diese Weise das

Apoptoseprotein Caspase3 (Hagimoto et al., 2002). Von Bronchialepithelzellen, die für 24 Stunden in Gegenwart von TGF- $\beta$ 1 kultiviert wurden, erlitten 58% nach zunächst deutlichen histomorphologischen Veränderungen den Zelltod (Hagimoto et al., 2002). Nach Bestrahlung mit 4 Gy oder 6 Gy Einzeldosis kommt es zu einem messbaren Anstieg von TGF- $\beta$  in der Lunge nach einem bis vier Monaten (Wu et al., 2013). Auch nach fraktionierter Bestrahlung (5x 1 Gy oder 10x 0,5 Gy) sind noch sechs Monate nach letztmaliger Bestrahlung höhere TGF- $\beta$  Spiegel im Lungengewebe der Maus nachweisbar als in unbestrahlten Kontrollen (Park et al., 2013).

Alle oben beschriebenen Veränderungen wurden überwiegend histologisch und immunhistochemisch erfasst. Untersuchungen zu den Folgen von Bestrahlungsdosen im Bereich von weniger als 4 Gy liegen kaum vor. Um die Auswirkungen niedrigerer Bestrahlungsdosen im mGy-Bereich auf das Lungengewebe objektiv quantifizieren zu können, werden die durch die Strahlung induzierten Schäden auf der DNA-Ebene in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen untersucht. Über den Versuch des Nachweises einzelner Zytokine kann darüber hinaus untersucht werden, ob auch durch niedrige Bestrahlungsdosen im mGy-Bereich eine visualisierbare inflammatorische Reaktion des Gewebes induzierbar ist.

## 2.6. Fragestellungen im Rahmen dieses Projekts

Im Rahmen der klinischen Strahlentherapie kommt es auch unter Nutzung von Weiterentwicklungen der konformalen Radiotherapie zu einer nicht zu unterschätzenden Belastung gesunden Normalgewebes. Die IMRT ermöglicht durch Modulation der einzelnen Bestrahlungsfelder beispielsweise mittels Multilamellenkollimatoren eine Applikation nochmals höherer Bestrahlungsdosen. Die Konsequenz ist eine zunehmende Belastung gesunden Normalgewebes wie auch der Lunge mit niedrigen Dosen im mGy-Bereich (100 mGy entsprechen der 5% Isodose bei einer applizierten Fraktion von 2 Gy). Anhand von insgesamt fünf Maus-Tiermodellen werden die Auswirkungen von Bestrahlungen im Bereich von 10 bis 100 mGy Einzeldosis auf der DNA-Ebene in der Lunge untersucht. Es werden dabei sowohl Einzeitbestrahlungen als auch fraktionierte Bestrahlungsserien - wie in der klinischen Strahlentherapie appliziert - betrachtet. Die ionisierende Strahlung verursacht DNA-Doppelstrangbrüche, welche nach immunhistochemischer Darstellung der 53BP1 markierten Foci quantitativ ausgewertet werden. Zusätzlich werden je eine reparaturprofiziente und eine reparaturdefiziente Mauslinie anhand von Ki-67, PARP-1 und TGF- $\beta$ 1 auf Proliferation, Apoptose und eine Zytokinreaktion des Lungengewebes nach Bestrahlung untersucht. Die Auswertung differenziert zwischen den Zellen des Bronchialepithels und den Zellen des Alveolarraums. Untersucht werden reparaturprofiziente sowie reparaturdefiziente Mauslinien (vgl. Tabelle 2-1), um Aussagen über den Einfluss genetischer Determinanten auf die Vulnerabilität auf DNA-Ebene sowie die Auswirkungen einer genetischen Prädisposition für die Reparaturkapazität von DNA-Schäden treffen zu können.

### Tabelle 2-1: Übersicht Mauslinien

*Übersicht: Mauslinien, genetisch determinierte Immunkompetenz und potenzielle Strahlensensibilität.*

Mauslinie	Immunkompetenz	potenzielle Strahlensensibilität
C57BL/6N	vorhanden	normal
ATM <sup>WT</sup>	vorhanden	normal
ATM <sup>+/-</sup>	möglicherweise eingeschränkt	möglicherweise erhöht
ATM <sup>-/-</sup>	fehlend	stark erhöht
SCID	fehlend	erhöht

### **3. Material und Methodik**

#### **3.1. Mauslinien**

##### **3.1.1. C57BL/6N**

Acht Wochen alte, etwa 20 g schwere männliche Tiere der Mauslinie C57BL/6N wurden bezogen von den Charles River Laboratories, Sulzfeld (Deutschland, im Folgenden „C57“).

##### **3.1.2. ATM-Zucht**

Untersucht wurden Tiere aus eigener Zucht, die aus einem vom Allergologischen Labor der Johann Wolfgang von Goethe Universität, Frankfurt am Main (Deutschland, Leiter: PD Dr. rer. nat. R. Schubert) zur Verfügung gestellten heterozygoten Zuchtpaar generiert wurden. Es handelt sich dabei um eine Mauslinie, bei der das ATM-Gen nicht mutiert ist und der somit dem „Wildtyp“ entspricht ( $ATM^{+/+}$ , im Folgenden „ $ATM^{WT}$ “), eine Mauslinie, die heterozygot für die ATM-Mutation ist ( $ATM^{+/-}$ ) sowie eine Mauslinie, bei der beide ATM-Gene ausgeschaltet sind ( $ATM^{-/-}$ ). Die Tiere (129S6/SvEvTac- $Atm^{tm1Awb}$ ) sind auf dem Hintergrund von 129S6 gezüchtet. Das ATM-Gen wurde gezielt durch Insertion eines Stoppkodons inaktiviert (Barlow et al., 1996). Dadurch entsteht ein trunkiertes inaktives Genprodukt, ähnlich dem ATM-Genprodukt, welches bei Patienten ursächlich für die Ataxia Teleangiektasia verantwortlich ist.

##### **3.1.3. SCID-Zucht**

Die untersuchten SCID Mäuse (CB17/Icr-Prkdc, männlich, acht Wochen) wurden von den Charles River Laboratories in Sulzfeld (Deutschland) bezogen. Die Tiere sind homozygot für eine autosomal-rezessive Mutation in der DNA abhängigen Proteinkinase. Dadurch kommt es zu fehlerhafter DNA-Reparatur (Charles River Laboratory, 2009; Bosma and Carroll, 1991).

##### **3.1.4. Tierhaltung**

Je vier bis sechs Tiere wurden in einem Laminar Air Flow System bei Standard-Laborbedingungen (Temperatur  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 10\%$  Luftfeuchtigkeit sowie ausgeglichenem

Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden:12 Stunden) in der Versuchstierhaltung der Experimentellen Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg gehalten. Dabei war ein Zugang zu frischem Wasser und adäquater Tiernahrung ad libitum stets gegeben. Die Tierhaltung verlief nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und den Auflagen der Veterinärbehörde des Saarlandes. Die für die Untersuchung behandelten Tiere waren zum Zeitpunkt der Präparation zwischen neun und 20 Wochen alt.

## **3.2. Bestrahlung**

### **3.2.1. Planung und Anordnung**

Die Bestrahlung erfolgte als Ganzkörperbestrahlung an einem Linearbeschleuniger (Artiste™, Fa. Siemens, Deutschland) mit 6 MV Photonen und einer Dosisleistung von 2 Gy pro Minute. Das 95% Isodosenfeld soll die Körper der Tiere vollständig erfassen; entsprechend wurde die Dosisverteilung CT-geplant gewählt. Das gesamte Bestrahlungsfeld umfasste 30x 30 cm<sup>2</sup>, die Distanz zwischen Strahlungsquelle und den Tieren betrug 208 cm. In diesem Feld wurden die Tiere in einen Plastikzylinder aus gewebeäquivalentem Material gesetzt (5 cm Höhe, 20 cm Durchmesser); es erfolgte keine Anaesthesierung.

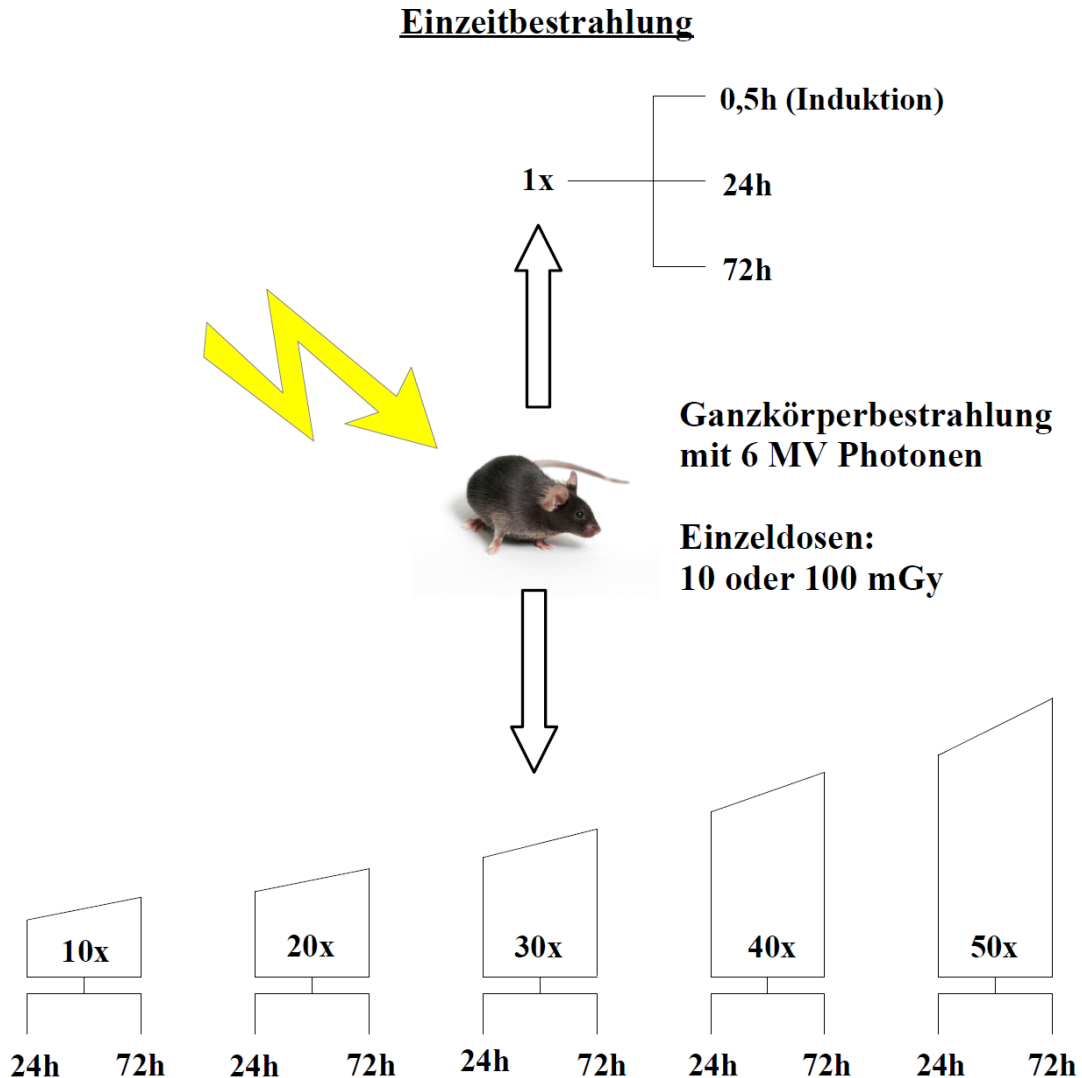
### **3.2.2. Einzeit-Niedrigdosisbestrahlung**

In diesem Bestrahlungsschema wurden die Tiere einmalig mit 10 mGy oder 100 mGy bestrahlt. Jeweils 0,5 Stunden, 24 Stunden und 72 Stunden nach Bestrahlung wurden die Tiere zur Organentnahme getötet (vgl. Abb. 3-1, S. 33). Für jeden Untersuchungspunkt wurden drei Tiere bzw. drei Gewebeproben analysiert.

### **3.2.3. Fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung**

Im Rahmen der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung wurden die Tiere von Montag bis Freitag täglich zur gleichen Uhrzeit (11.30 Uhr) mit 10 mGy oder 100 mGy bestrahlt. Dementsprechend ergibt sich mit fünf Fraktionen pro Woche das in der klinischen Strahlentherapie übliche Fraktionierungsschema. Dieses Vorgehen wurde über 2 (10x), 4 (20x), 6 (30x), 8 (40x) und 10 (50x) Wochen durchgeführt, wobei den Werten in Klammern die Anzahl der Einzelbestrahlungen entspricht.

Nach dem Ende der erfolgten Bestrahlungsserie wurden die Organe entnommen (vgl. Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung). Zum Vergleich wurde das Gewebe nicht bestrahlter Tiere der jeweiligen Mauslinie als Kontrolle untersucht.



**Fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung**

**Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung**

Die Abbildung gibt eine Übersicht zu den beiden Versuchsprotokollen. Einzeitbestrahlung: Es erfolgt eine einmalige Bestrahlung mit 10 oder 100 mGy mit Organentnahme nach 0,5 Stunden (Induktion) oder nach 24 bzw. 72 Stunden. Fraktionierte Bestrahlung: In einem weiteren Ansatz werden Versuchstiere einer fraktionierten Bestrahlung (10 bis 50 Fraktionen) unterworfen mit anschließender Organentnahme nach 24 oder 72 Stunden.



### 3.2.4. Übersicht und Anzahl der untersuchten Präparate und Tiere

**Tabelle 3-1: Anzahl der unbestrahlten Kontrollen**

Mauslinie	Anzahl Präparate (Tiere)
C57BL/6N	3 (3)
ATM <sup>WT</sup>	4 (2)
ATM <sup>+/-</sup>	3 (3)
ATM <sup>-/-</sup>	4 (2)
SCID	3 (3)

**Tabelle 3-2: Anzahl der Einzeitbestrahlungen**

*Mauslinien, Bestrahlungsdosis und Zeitpunkt der Organentnahme in Stunden (h). Gewebeproben der mit \* versehenen Tiere wurden jeweils mindestens zweimal unabhängig voneinander geschnitten, gefärbt und ausgewertet. Anzahl Präparate (Tiere).*

Mauslinie	1x10 mGy	1x10 mGy	1x10 mGy	1x100 mGy	1x100 mGy	1x100 mGy
	0,5h	24h	72h	0,5h	24h	72h
C57BL/6N	3 (3)	5 (5)	5 (5)	3 (3)	5 (5)	5 (5)
ATM <sup>WT</sup>	4 (2)	3 (2)	2 (2)	2 (2)	3 (2)	2 (2)
ATM <sup>+/-</sup>	2 (2)	2 (2)	2 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)
ATM <sup>-/-</sup>	4 (1*)	0 (0)	2 (1*)	4 (1*)	4 (1*)	4 (1*)
SCID	2 (2)	2 (2)	2 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)

**Tabelle 3-3: Anzahl der fraktionierten Bestrahlungen mit 10 mGy**

*Mauslinien, Bestrahlungsdosis und Zeitpunkt der Organentnahme in Stunden (h). Gewebeproben der mit \* versehenen Tiere wurden jeweils mindestens zweimal unabhängig voneinander geschnitten, gefärbt und ausgewertet. Anzahl Präparate (Tiere).*

Mauslinie	10x10 mGy		20x10 mGy		30x10 mGy		40x10 mGy		50x10 mGy	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h
C57BL/6N	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
ATM <sup>WT</sup>	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
ATM <sup>+/-</sup>	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
ATM <sup>-/-</sup>	4 (1*)	4 (1*)	4 (2)	4 (1*)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SCID	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tabelle 3-4: Anzahl der fraktionierten Bestrahlungen mit 100 mGy**

*Mauslinien, Bestrahlungsdosis und Zeitpunkt der Organentnahme in Stunden (h). Gewebeprobe der mit \* versehenen Tiere wurden jeweils mindestens zweimal unabhängig voneinander geschnitten, gefärbt und ausgewertet. Anzahl Präparate (Tiere).*

Mauslinie	10x100 mGy		20x100 mGy		30x100 mGy		40x100 mGy		50x100 mGy	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h
C57BL/6N	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
ATM <sup>WT</sup>	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
ATM <sup>+/-</sup>	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
ATM <sup>-/-</sup>	4 (1*)	4 (2)	4 (1*)	4 (1*)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SCID	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

### 3.2.5. Gewebeentnahme

Die bestrahlten Mäuse wurden nach intraperitonealer Injektion mit 100 µg Ketamin pro Gramm Körpergewicht und 10 µg Xylazin (Rompun<sup>®</sup>) pro Gramm Körpergewicht anaesthetisiert und getötet. Ketamin und Xylazin waren jeweils in 0,9% Natriumchlorid-Lösung verdünnt. Danach erfolgte die Organentnahme. Zunächst wurde die Bauchhöhle, dann der Thorax eröffnet. Nach dem Absetzen der Hohlvenen, Pulmonalarterien, Pulmonalvenen sowie Aorta und Trachea wurden beide Lungen zusammen mit dem Herz entnommen. Anschließend wurden Herz und beide Lungen sorgfältig präpariert und getrennt. Die oberen Abschnitte des Respirationstrakts wurden wegen der größeren Knorpelanteile entfernt, da diese die spätere Schnittabtragung am Mikrotom hätten erschweren und die Schnitte beschädigen können. Für weitere Studien wurden außerdem Leber, Nieren, ein Ileumresektat, ein Hautpräparat sowie das Gehirn und bei männlichen Tieren der Hoden entnommen. Die entnommenen Präparate wurden für 16 Stunden in 4% phosphatgepufferte Formaldehydlösung eingelegt und später mittels Einbettautomat (Histosette<sup>®</sup> II, Simport, Bernard-Pilon, Kanada) entwässert und in Paraffin eingebettet.

### 3.2.6. Immunhistochemische Färbemethodik

Vor dem Schneiden wurden die in Paraffin eingebetteten Präparate bei -20°C gekühlt. Sobald das Paraffin durch die Kälte schnittfest geworden war, wurden am Mikrotom (Leica RM 2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland) 4 µm dicke Schnitte

abgetragen. Diese Gewebeschnitte wurden im Wasserbad für etwa 3 Sekunden auf etwa 56°C erhitzt und auf Objektträger (HistoBond<sup>®</sup>, Marienfeld, Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen. Durch das Erhitzen verflüssigt sich das Paraffin und möglicherweise durch das Schneiden bedingte Unregelmäßigkeiten der Präparatoberfläche werden geglättet.

Im Anschluss wurden die nun fixierten Schnitte für 16 Stunden im Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) bei 37°C getrocknet.

Nach einer 3x 7 minütigen Entparaffinierung in Xylol (Xylol Pharm. Helv. 4, Isomerengemisch, Hedinger, Stuttgart, Deutschland) durchliefen die Präparate eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%) für jeweils 3 Minuten. Das Inkubieren in 100% Alkohol erfolgte mithilfe des Magnetrührers (Bibby Scientific, Stuart<sup>®</sup>, Leuven, Belgien) bei mittlerer Drehzahl. Durch kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) wurden die Gewebeschnitte rehydriert. Zur gründlichen Epitopdemaskierung wurden die Gewebeproben anschließend für 1 Stunde in Citratpuffer (Citratpuffer, Dako Real<sup>™</sup>, Target Retrieval Solution, S2031, Glostrup, Dänemark, pH 6,0) bei 95°C gekocht. Der Citratpuffer wurde 1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser (300 ml Gesamtvolumen). Nach Waschen in destilliertem Wasser wurden die Präparate für 1 Stunde in einer Feuchtkammer mit Immunoblock (Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock (T144.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)) inkubiert (1:10 Verdünnung in destilliertem Wasser, 200 µl pro Objektträger), um für den Antikörper unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nun wurde der Primärantikörper (polyclonal rabbit anti 53BP1, IHC-00001, Bethyl Laboratories, Texas, USA) in einer Verdünnung von 1:200 in Immunoblock (Gesamtvolumen 200 µl pro Objektträger) aufgetragen und die Schnitte für mindestens 12 Stunden über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Untersuchung und Darstellung von Proliferation, Apoptose und Zytokinreaktion im Lungengewebe nach Bestrahlung wurden zusätzlich ausgewählte Präparate mit anderen Primärantikörpern gefärbt. Dabei handelte es sich um einen Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67 (monoclonal rat anti-mouse Ki-67 antigen, Clone TEC-3, Dako, Glostrup, Dänemark, verdünnt 1:50 in Immunoblock), einen Antikörper gegen gespaltenes PARP-1 als Apoptosemarker (monoclonal rabbit anti PARP-1 antibody, Epitomics, Burlingame, California, USA; verdünnt 1:100 in Immunoblock) sowie einen Antikörper gegen TGF-β1 (polyclonal rabbit anti TGF-β1 (V): sc-146, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA; verdünnt 1:100 in Immunoblock) zur Untersuchung einer inflammatorischen Zytokinreaktion.

Nach 3x 10 minütigem Waschen in PBS Puffer (Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline), 137 mmol NaCl; 2,7 mmol KCl; 10 mmol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2 bis 7,4; Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes) zum Entfernen nicht bindender Antikörper wurde der fluoreszierende Sekundärantikörper (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA; Verdünnung 1:400 in Immunoblock, 200 µl pro Objektträger) nach Zentrifugation für eine Minute (Drehzahl 13.000 rpm entsprechend rund 16.000 facher Erdbeschleunigung bei  $r_{\min} = 5,9\text{cm}$  und  $r_{\max} = 8,5\text{cm}$ , Heraeus<sup>®</sup> Biofuge<sup>®</sup>, Fresco) zur Auflösung von Antikörperpräzipitaten aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen Ki-67 (monoclonal rat anti-mouse Ki-67 antigen) wurde analog ein anti-rat Sekundärantikörper verwendet (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 goat anti-rat IgG, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA; Verdünnung 1:400 in Immunoblock, 200 µl pro Objektträger). Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Objektträger anschließend erneut unter Schutz vor Lichtexposition für 3x 10 Minuten in PBS Puffer gewaschen. Das Waschen erfolgte stets auf einem Magnetrührer (Bibby Scientific, Stuart<sup>®</sup>, Leuven, Belgien) bei mittlerer Drehzahl. Schließlich wurden die Präparate mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-haltigem Eindeckmedium (Mounting Medium with DAPI, Hard Set, H-1500 Vectashield<sup>®</sup>, Vector Laboratories Burlingame, California, USA) fixiert und über Nacht abgedunkelt und gekühlt gelagert (4°C) ausgehärtet. Das Eindeckmedium dient der Fixierung von Deckglas und Objektträger sowie der Verstärkung des Fluoreszenzsignals, während DAPI bei Bindung an DNA unter Anregung mit einer Wellenlänge von 435 bis 485 nm blaues Licht emittiert und Zellkerne anfärbt. Die Detektion erfolgte unter Filtern für DAPI (Ext. 340 bis 380 nm), FITC (465 bis 495 nm) und Tx Red (540 bis 580 nm).

### **3.2.7. Ausgewertete Zellpopulationen**

In der Lunge wurden zwei Zellpopulationen betrachtet: das einschichtige Bronchialepithel sowie Zellen des Alveolarraums.

### **3.2.8. Quantifizierung der 53BP1 Foci**

Nach immunhistochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen 53BP1 und einem fluoreszierenden Sekundärantikörper ließen sich diese Markerproteine als fluoreszierende Foci im Zellkern im Immunfluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E600, Düsseldorf,

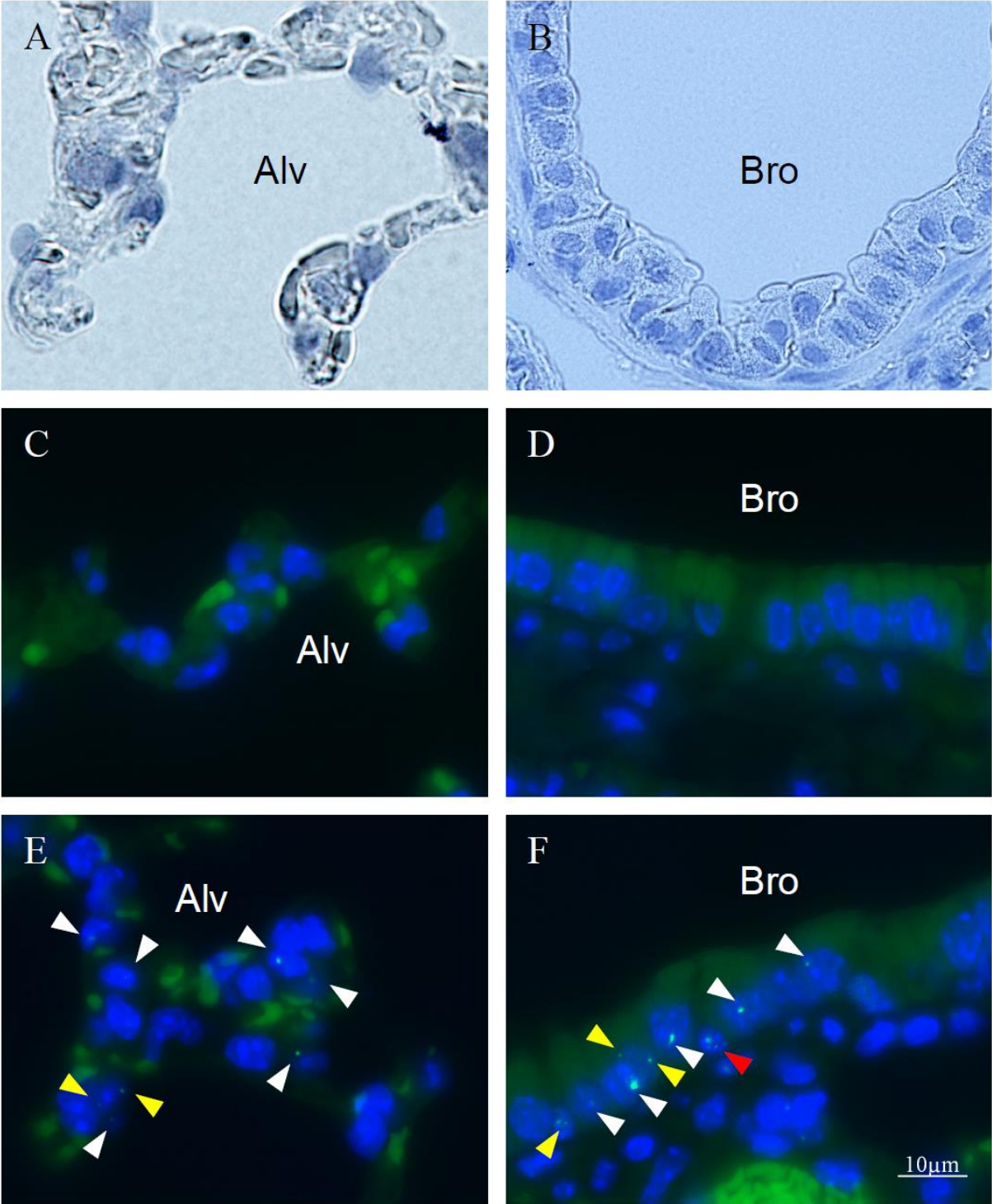
Deutschland) identifizieren. Die Auszählung der Foci erfolgte bei 600-facher Vergrößerung. Für jedes Organpräparat und für jede Zellpopulation wurden mindestens 40 Foci ausgezählt. Aus den Ergebnissen wurden der Mittelwert (Foci pro Zelle) und der Standardfehler (S.E.M.) berechnet. Zur Auswertung wurde am Mikroskop (Nikon Eclipse E600) zunächst eine Region des Präparats zufällig ausgewählt. Über Zuschalten eines DAPI-Filters konnten dann sowohl im Bronchialepithel als auch im Alveolarraum die Zellkerne identifiziert werden. Durch anschließendes Umschalten auf einen FITC-Filter konnten daraufhin die fluoreszierenden Foci über die Zellkerne gelegt und ausgezählt werden. Die dreidimensionale Struktur des Zellkerns erforderte dabei ein genaues Durchfokussieren, um Foci in allen Ebenen des Zellkerns zu erfassen. Die Auszählung erfolgte durch Randomisierung der Reihenfolge verblindet: Dafür wurde vor Beginn der Versuchsdurchführung zunächst jeder Maus und damit jeder Gewebeprobe eine Nummer zugewiesen. Dann wurden per Zufall Präparate ausgewählt, gefärbt, ausgewertet und die Ergebnisse katalogisiert. Erst nachdem dieser Vorgang für alle Proben durchgeführt worden war, wurden den Präparatnummern und zugehörigen Ergebnissen anhand einer anfangs erstellten Liste wieder Mauslinie und Bestrahlungszeitpunkt zugeordnet. Bilder konnten mit einer am Mikroskop installierten Kamera (Nikon Digital Sight DS-2MBWc) aufgenommen werden.

Die Daten wurden im Programm Microsoft<sup>®</sup> Excel 2002 katalogisiert. Mit der Plattform Origin<sup>®</sup> Pro 8.5 von OriginLab erfolgte die Erstellung von Graphiken sowie die einseitige Überprüfung auf statistische Signifikanz anhand des U-Tests von Mann und Whitney mit einem p-Wert von  $p < 0,05$ . Dieser Test wurde aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Zielvariablen ausgewählt.

Im Folgenden wird als Messparameter stets der Wert Foci pro Zelle angegeben. Dieser errechnet sich als Quotient aus den im Versuchsprotokoll geforderten 40 ausgewerteten Foci pro Präparat und der ausgezählten Gesamtzellzahl. Außerdem kann ein Prozentsatz an Zellen angegeben werden, welche einen Focus oder mehrere Foci zeigen. Diese Prozentzahl ergibt sich aus dem Quotienten der Zellen mit Focus (Zellen mit einem Focus addiert mit den Zellen mit zwei Foci und so fort) und der ausgewerteten Gesamtzellzahl. Dieser Prozentsatz eignet sich dabei allerdings lediglich für Ergebnisse, bei denen hauptsächlich ein Focus pro Zelle vorliegt. Fänden sich mehrere Foci pro Zelle, so ließe sich deren Anzahl am Prozentsatz nicht erkennen. In diesem Fall würden die geforderten 40 Foci schneller erreicht und der Rechnung läge eine geringere Zellzahl mit Foci zugrunde, was zu einer Verzerrung des Ergebnisses führen würde.

**4. Ergebnisse**

**4.1. Mikroskopischer Überblick**



**Abbildung 4-1: Mikroskopischer Überblick**  
*Weitere Erläuterungen auf der folgenden Seite.*

Gezeigt sind jeweils Aufnahmen des Alveolarraumes (Alv) und des Bronchialepithels (Bro) im Vergleich. Der in E angegebene Maßstab 10 µm gilt für alle Abbildungen (A bis E).

Die Aufnahmen A und B zeigen eine histologische Übersicht des Lungengewebes nach Hämatoxylin-Färbung, A eine Alveole, B das Epithel eines Bronchiolus.

Die folgenden Aufnahmen C und D zeigen analog dazu die Alveole und das Bronchialepithel in der in diesem Projekt verwendeten immunhistochemischen Färbung. Das blaue DAPI-Signal kennzeichnet die Zellkerne. Daneben ist eine Eigenfluoreszenz der Erythrozyten und des Zytoplasmas zu erkennen. Für diese beiden Aufnahmen (C, D) wurde eine isolierte Färbung ohne Primärantikörper durchgeführt, um sicherzustellen, dass der fluoreszierende Sekundärantikörper nicht auch unspezifisch bindet. Dies ist nicht der Fall, es wird weder auf C noch auf D ein Antikörpersignal detektiert. Die Gewebeprobe entstammt einer SCID-Maus, welche mit 1x 100 mGy bestrahlt wurde. Die Probe wurde 0,5 Stunden nach Bestrahlung entnommen (Induktion).

Demgegenüber zeigen die Aufnahmen E und F den Alveolarraum und das Bronchialepithel dieser SCID-Maus (1x 100 mGy, 0,5h) bei Färbung mit Primär- und Sekundärantikörper. Anhand dieser Aufnahme soll exemplarisch die Auswertung der Foci in beiden untersuchten Zellpopulationen dargestellt werden.

Im Alveolarraum (Alv) ergibt sich eine Zellzahl von etwa 45. Dieser Wert ist geschätzt, da eine genaue Auswertung dieses Bildausschnitts anhand dieser Einzelaufnahme ohne die Möglichkeit des Durchfokussierens erschwert ist. Sechs dieser Zellen weisen einen 53BP1 Focus auf (markiert durch weiße Pfeile), eine Zelle zwei 53BP1 Foci (gelb).

Im Bronchialepithel (Bro) gestaltet sich das Zählen der Zellen insofern leichter, als mit dem einschichtigen Epithel eine Leitstruktur vorgegeben ist, anhand derer sich die Auszählung orientieren kann. Für den gewählten Ausschnitt ergibt sich eine Zellzahl von knapp 20 Bronchialepithelzellen. Davon zeigen fünf Bronchialepithelzellen jeweils einen Focus pro Zelle (weiße Pfeile), zwei Zellen weisen zwei Foci pro Zelle auf (gelb) und eine Zelle drei Foci pro Zelle (rot).

## 4.2. 53BP1 Foci in den unbestrahlten Kontrollen

Von jeder Mauslinie wurden mindestens drei Präparate von mindestens zwei unbestrahlten Tieren untersucht. Sowohl Bronchialepithelzellen als auch die Zellen des Alveolarraumes wurden hinsichtlich vorhandener Foci analysiert. Die in den entsprechenden Präparaten erhobenen Fociwerte sind dabei auf natürliche Belastungen durch endogene oder exogene Noxen zurückzuführen.

Am Beispiel des Bronchialepithels der C57 Tiere in den unbestrahlten Kontrollen werden die beiden im Folgenden verwendeten Ergebniswerte errechnet. Betrachtet man das Bronchialepithel von C57 Mäusen, so mussten im Mittel bei einem von drei Tieren 340 Bronchialepithelzellen ausgezählt werden, um 40 Foci zu erfassen. Entsprechend errechnet sich die Focirate für die C57 Mäuse im Bronchialepithel als 40 Foci pro Gesamtzahl der gezählten Bronchialepithelzellen, hier 340. Damit ergibt sich für diesen Messpunkt mit 0,118 Foci pro Zelle die im Vergleich zu den anderen Mauslinien im Bronchialepithel

niedrigste Focirate. Im Mittel finden sich 33 Bronchialepithelzellen mit einem Focus sowie drei Bronchialepithelzellen mit jeweils zwei Foci und damit 36 Zellen, welche Foci aufweisen. Bei 340 gezählten Bronchialepithelzellen beträgt der Prozentsatz an Zellen mit Foci für dieses Beispiel rund 10%. Die Abweichung zu den 0,118 Foci pro Zelle lässt sich dabei durch die drei Zellen mit mehreren Foci erklären.

Sowohl Tiere der ebenfalls reparaturprofizienten ATM<sup>WT</sup> Mauslinie (0,197 Foci pro Zelle entsprechend 17% der Zellen) als auch die reparaturdefizienten Mauslinien zeigen höhere Werte: ATM<sup>+/-</sup> Mäuse haben 0,153 Foci pro Zelle (13% der Zellen mit Foci), ATM<sup>-/-</sup> 0,194 Foci pro Zelle (16% der Zellen mit Foci). Die höchsten Werte zeigt die SCID Mauslinie mit 0,441 Foci pro Zelle (entsprechend 31% der Zellen mit Foci, Abb. 4-2, S. 42, hellgraue Balken).

Statistisch signifikante Unterschiede bezogen auf die Zellen des Bronchialepithels ergeben sich in der Fociverteilung zwischen den Mauslinien C57, ATM<sup>WT</sup>, ATM<sup>-/-</sup> und SCID (Abb. 4-2, S. 42).

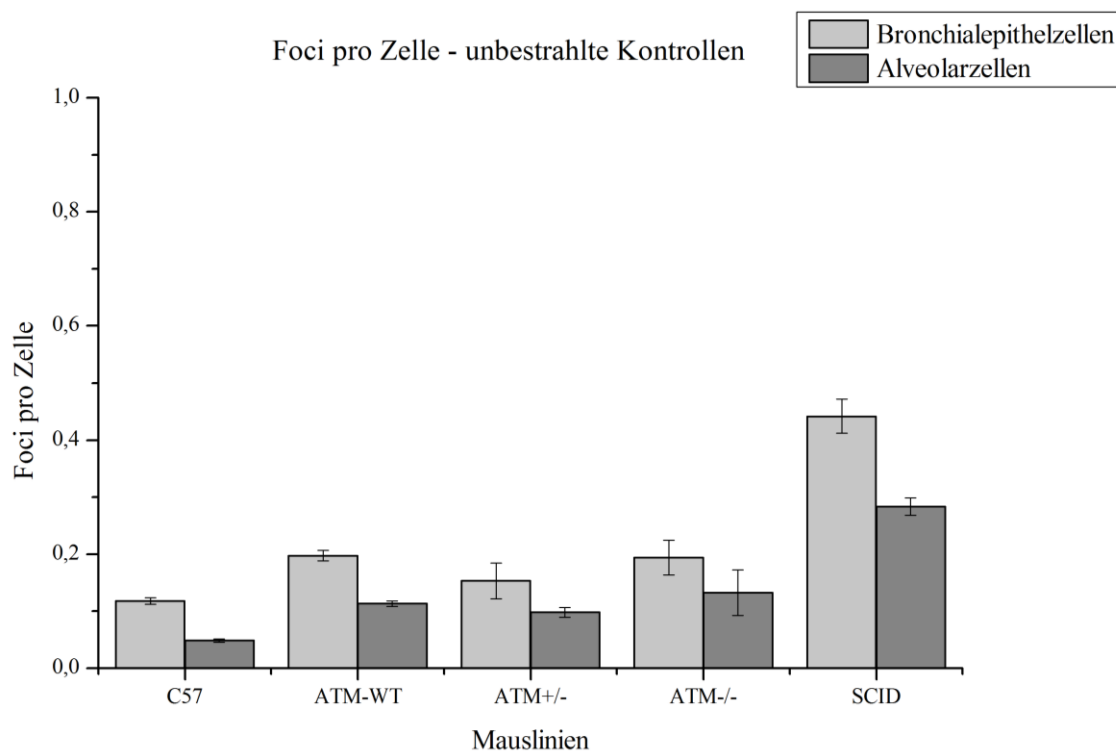
Die Zellen des Alveolarraumes scheinen im Vergleich zu den Zellen des Bronchialepithels weniger 53BP1 Foci aufzuweisen (Abb. 4-2, S. 42): Die unbestrahlten Kontrollen der Mauslinien zeigen hier eine geringere Anzahl an Foci als im Bronchialepithel. Ein statistisch signifikanter Unterschied ergibt sich jedoch lediglich für (I) die C57 Mauslinie mit durchschnittlich 0,118 Foci pro Zelle - entspricht 10% der Zellen - im Bronchialepithel und 0,048 Foci pro Zelle - 4,6% der Zellen - im Alveolarraum, (II) die ATM<sup>WT</sup> Mäuse mit 0,197 (17%) zu 0,113 Foci pro Zelle (10%) und (III) die untersuchten SCID Tiere mit 0,441 (31%) zu 0,283 (24%) Foci pro Zelle.

Damit ergeben sich für die SCID Mäuse die höchsten und für die C57 Mäuse die niedrigsten Fociwerte in den unbestrahlten Kontrollen, während die Abkömmlinge der verschiedenen ATM Linien etwa auf gleichem Niveau liegen, und damit untereinander als ähnlich empfindlich gegenüber natürlichen Noxen einzustufen sind.

Den Betrachtungen im Bereich des Bronchialepithels entsprechend ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede bezogen auf die Fociverteilung der Zellen des Alveolarraumes zwischen der C57 Mauslinie, den ATM Tieren und SCID (vgl. Abb. 4-2, S. 42). So besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Fociwerten der C57 Mauslinie und denjenigen der ATM Mauslinien einerseits und zwischen SCID und den übrigen Mauslinien andererseits.



Die folgende Abbildung 4-2 gibt eine Übersicht über die in den unbestrahlten Bronchialepithel- und Alveolarzellen gezählten Foci.



Gesamtzahl Zellen	1020	2501	816	1435	878	1241	734	1066	274	426
Anz. Präparate (n)	3	3	4	4	3	3	3	3	3	3

#### Abbildung 4-2: Foci pro Zelle in den unbestrahlten Kontrollen

*Ergebnisse der unbestrahlten Kontrollen der untersuchten Mauslinien*

*C57, ATM<sup>WT</sup>, ATM<sup>+/-</sup>, ATM<sup>-/-</sup> und SCID.*

*Die Tabelle unter dem Diagramm gibt für jeden Messpunkt die Gesamtzahl an ausgewerteten Zellen und die Zahl der für den Messpunkt ausgewerteten Präparate an. Gegenübergestellt sind jeweils Foci pro Bronchialepithelzelle (hellgrau) und Alveolarzelle (dunkelgrau) als  $x \pm S.E.M.$  ( $n = \text{Anzahl der Präparate}$ ).*

*Die statistischen Signifikanzen stellen sich wie folgt dar.*

##### Bronchialepithelzellen:

*C57 vs. ATM<sup>WT</sup> ( $p < 0,03$ ), ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,04$ ), SCID ( $p < 0,04$ );*

*SCID vs. ATM<sup>WT</sup> ( $p < 0,03$ ), ATM<sup>+/-</sup> ( $p < 0,04$ ), ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,04$ );*

##### Alveolarzellen:

*C57 vs. ATM<sup>WT</sup> ( $p < 0,03$ ), ATM<sup>+/-</sup> ( $p < 0,04$ ), ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,04$ ), SCID ( $p < 0,04$ );*

*SCID vs. ATM<sup>WT</sup> ( $p < 0,03$ ), ATM<sup>+/-</sup> ( $p < 0,04$ ), ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,04$ );*

##### Bronchialepithelzellen vs. Alveolarzellen:

*C57 ( $p < 0,04$ ), ATM<sup>WT</sup> ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,04$ )*

### 4.3. 53BP1 Foci nach Einzeitbestrahlung

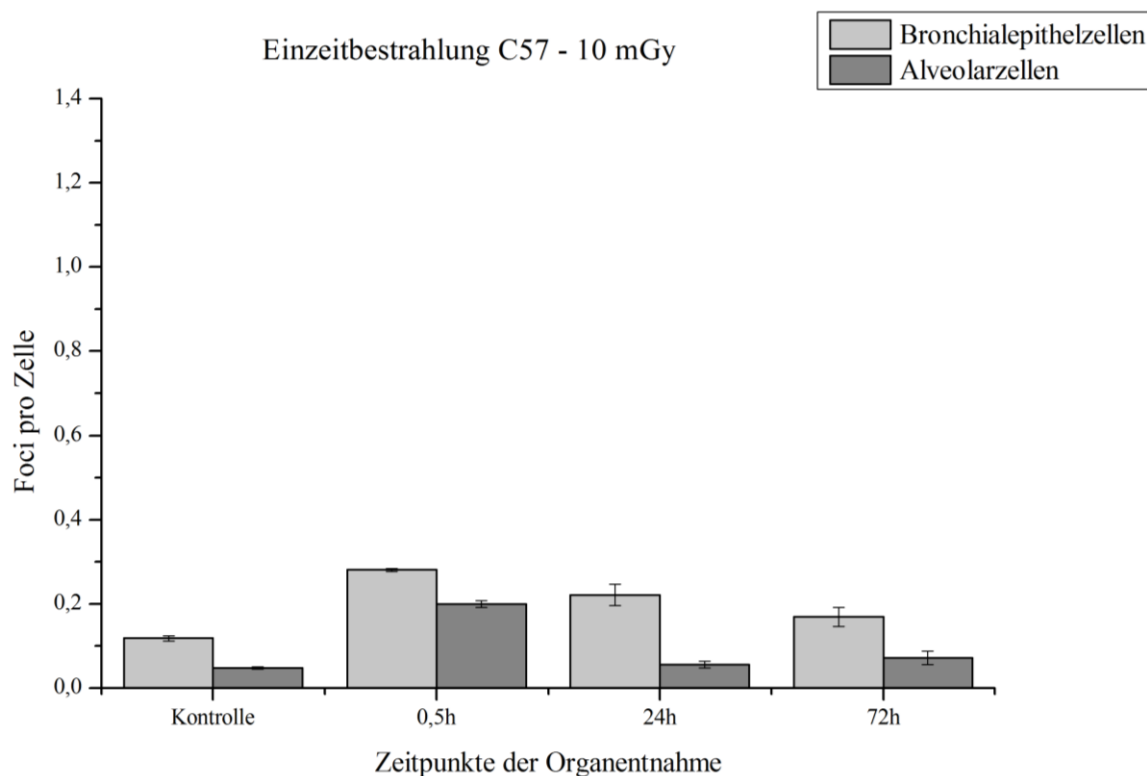
Zur Untersuchung der unmittelbaren Auswirkungen nach einer einmaligen Bestrahlung wurden die Organe eine halbe Stunde nach Bestrahlung zur Fociauswertung entnommen. Dieser Messpunkt eine halbe Stunde (0,5h) nach Bestrahlung wird im Folgenden als „Induktion“ bezeichnet.

Im Vergleich dazu erfolgt die Organentnahme - wie bei einmalig bestrahlten Tieren - nach 24 Stunden und zur Beurteilung des weiteren Reparaturverhaltens nach 72 Stunden. Betrachtet werden neben den C57 Mäusen (für 10 und 100 mGy) die heterozygote ATM<sup>+/-</sup> und die homozygote ATM<sup>-/-</sup> Mauslinie sowie die SCID Tiere (für 100 mGy).

Bei der einmaligen Bestrahlung von C57 Tieren mit 10 mGy (vgl. Abb. 4-3, S. 44) zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle (0,118 Foci pro Zelle im Bronchialepithel, 0,048 Foci pro Alveolarzelle) bei Entnahme eine halbe Stunde nach Bestrahlung jeweils eine signifikant höhere Focizahl in beiden betrachteten Zellpopulationen (0,280 Foci pro Zelle im Bronchialepithel, 0,199 Foci pro Alveolarzelle). Diese signifikant höhere Anzahl an Foci sinkt bis 24 Stunden nach Organentnahme bereits ab (0,220 und 0,056 Foci pro Zelle) und erreicht nach 72 Stunden annähernd das Niveau der unbestrahlten Kontrolle (0,169 Foci pro Zelle im Bronchialepithel, 0,072 Foci pro Alveolarzelle).

Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4-3 (S. 44) dargestellt. Unterhalb der Graphik sind Anzahl der untersuchten Präparate pro Mauslinie und die errechneten statistischen Signifikanzen angegeben.

Die auf der darauf folgenden Abbildung 4-4 (S. 45) gezeigten Ergebnisse der Einzeitbestrahlung von C57 Tieren mit einer Einzeldosis von 100 mGy nach analogem Schema werden ab Seite 46 erläutert.



Anz. Zellen	1020	2501	428	604	973	3964	1288	3279
Anz. Präparate	3	3	3	3	5	5	5	5

### Abbildung 4-3: Foci pro Zelle nach Einzeitbestrahlung mit 10 mGy C57

*Ergebnisse der Einzeitbestrahlung mit 10 mGy der C57 Mauslinie.*

*Die Tabelle unter dem Diagramm gibt für jeden Messpunkt die Gesamtzahl an ausgewerteten Zellen und die Zahl der für den Messpunkt ausgewerteten Präparate an.*

*Der Kontrolle gegenübergestellt sind die Induktion (Organentnahme 0,5 Stunden nach Bestrahlung) sowie die verbliebenen Foci bei Entnahme 24 bzw. 72 Stunden nach Bestrahlung. Für jeden Messpunkt sind jeweils Foci pro Bronchialepithelzelle (hellgrau) und Alveolarzelle (dunkelgrau) als  $x \pm S.E.M.$  angegeben ( $n =$  Anzahl der Präparate).*

*Die statistischen Signifikanzen stellen sich wie folgt dar.*

Bronchialepithelzellen:

*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,04$ ), 24h ( $p < 0,02$ );*

*0,5h vs. 24h ( $p < 0,01$ ), 72h ( $p < 0,01$ );*

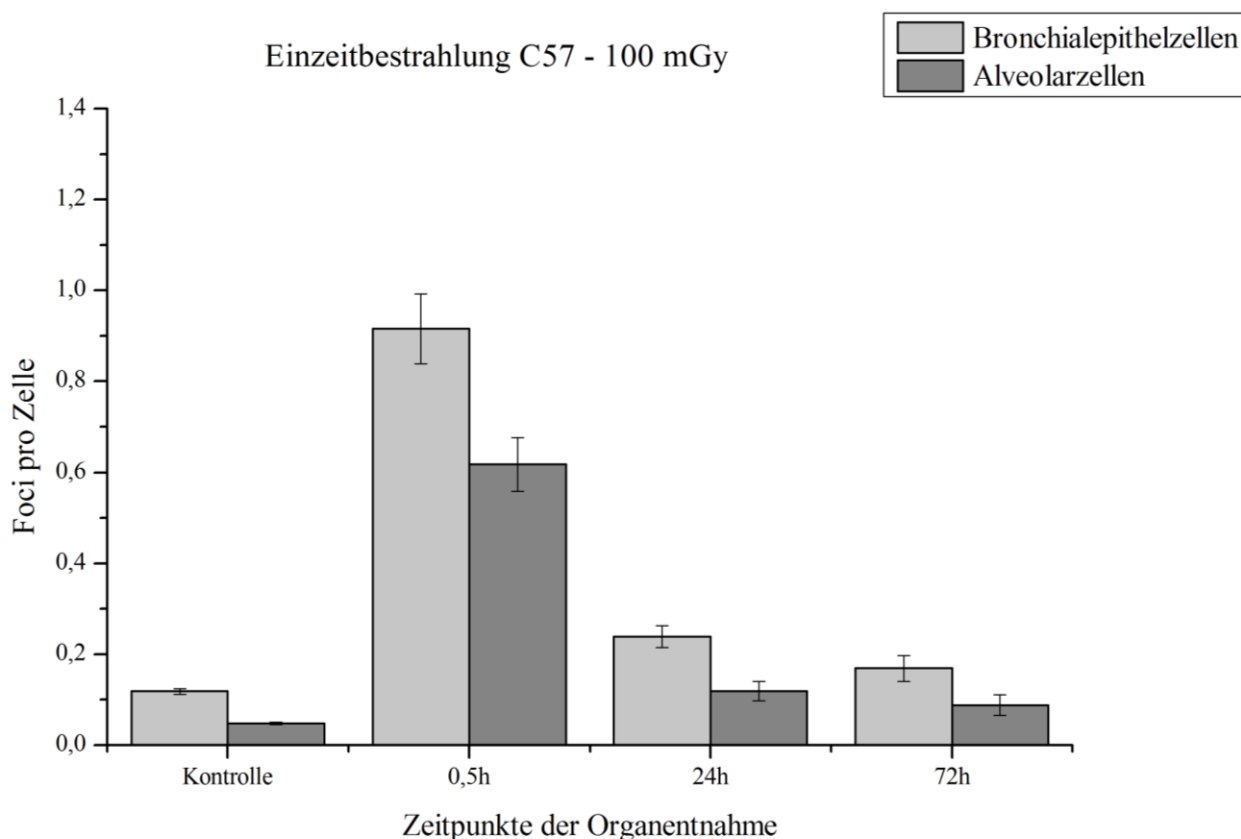
Alveolarzellen:

*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,04$ );*

*0,5h vs. 24h ( $p < 0,04$ ), 72h ( $p < 0,04$ );*

Bronchialepithelzellen vs. Alveolarzellen:

*Kon. ( $p < 0,04$ ), 0,5h ( $p < 0,04$ ), 24h ( $p < 0,01$ ), 72h ( $p < 0,01$ )*



Anz. Zellen	1020	2501		134	195		870	2040		1359	2857
Anz. Präp.	3	3		3	3		5	5		5	5

#### Abbildung 4-4: Foci pro Zelle nach Einzeitbestrahlung mit 100 mGy C57

*Ergebnisse der Einzeitbestrahlung mit 100 mGy der C57 Mauslinie.*

*Die Tabelle unter dem Diagramm gibt für jeden Messpunkt die Gesamtzahl an ausgewerteten Zellen und die Zahl der für den Messpunkt ausgewerteten Präparate an.*

*Der Kontrolle gegenübergestellt sind die Induktion (Organentnahme 0,5 Stunden nach Bestrahlung) sowie die verbliebenen Foci bei Entnahme 24 bzw. 72 Stunden nach Bestrahlung. Für jeden Messpunkt sind jeweils Foci pro Bronchialepithelzelle (hellgrau) und Alveolarzelle (dunkelgrau) als  $x \pm S.E.M.$  angegeben ( $n$ = Anzahl der Präparate).*

*Die statistischen Signifikanzen stellen sich wie folgt dar.*

Bronchialepithelzellen:

*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,04$ ), 24h ( $p < 0,02$ );*

*0,5h vs. 24h ( $p < 0,01$ ), 72h ( $p < 0,01$ );*

Alveolarzellen:

*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,04$ ), 24h ( $p < 0,04$ );*

*0,5h vs. 24h ( $p < 0,01$ ), 72h ( $p < 0,01$ );*

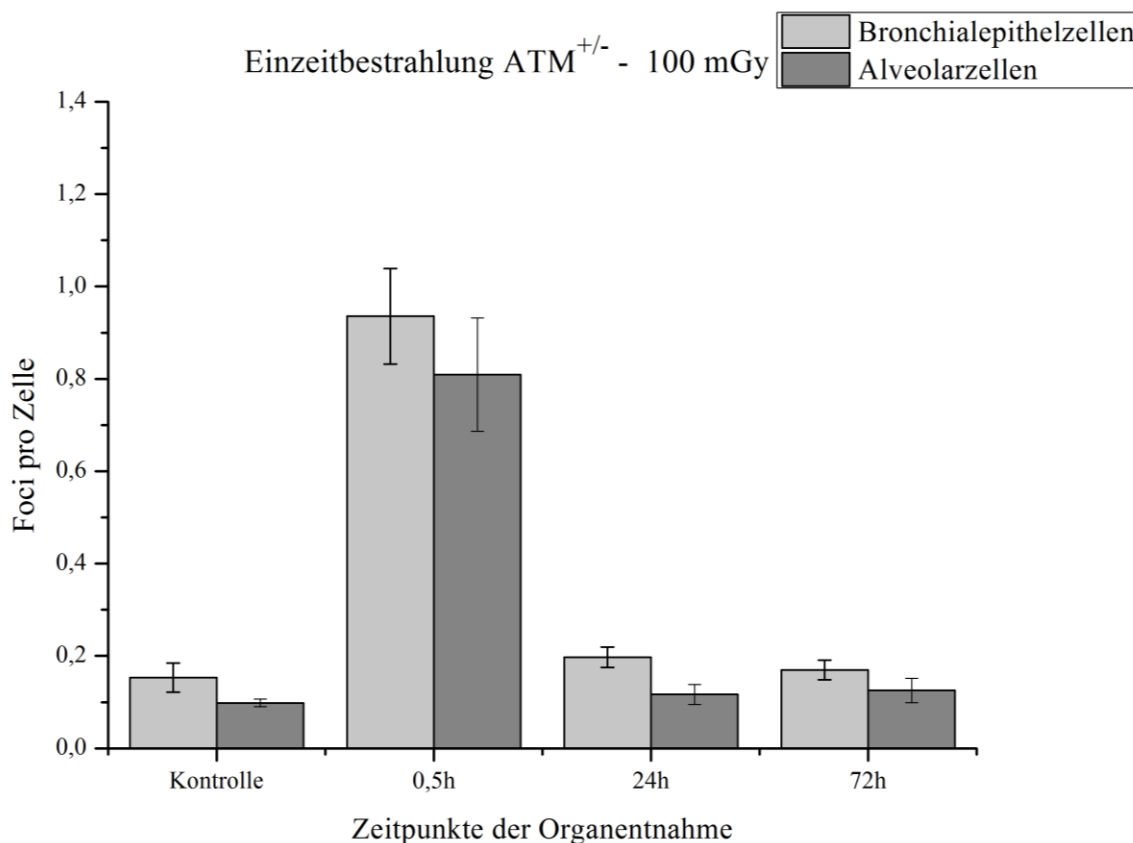
Bronchialepithelzellen vs. Alveolarzellen:

*Kon. ( $p < 0,04$ ), 0,5h ( $p < 0,04$ ), 24h ( $p < 0,01$ ), 72h ( $p < 0,03$ )*

Deutlicher zeigen sich diese Verläufe bei einmaliger Bestrahlung mit 100 mGy (vgl. Abb. 4-4, S. 45). Der unbestrahlten C57 Kontrolle (0,118 Foci pro Zelle im Bronchialepithel, 0,048 Foci pro Alveolarzelle) stehen hier induzierte Focizahlen von 0,916 Foci pro Zelle im Bronchialepithel und 0,617 Foci pro Alveolarzelle eine halbe Stunde nach Bestrahlung gegenüber. Bis zu 24 Stunden nach Bestrahlung kommt es in den Bronchialepithelzellen zu einer deutlichen Reduktion der Fociwerte, sodass mit 0,238 Foci pro Zelle annähernd das Niveau nach Bestrahlung mit 10 mGy zum 24 Stunden Zeitpunkt erreicht wird (0,220 Foci pro Zelle). Im Alveolarbereich ergibt sich eine vergleichbare Annäherung. So sinken die Fociwerte in den Alveolarzellen von 24 bis zu 72 Stunden von 0,118 Foci pro Zelle auf 0,087 Foci pro Zelle.

Bei der heterozygoten  $ATM^{+/-}$  Mauslinie (Abb. 4-5, S. 47) zeigt sich für die Bestrahlung mit 100 mGy insgesamt eine ähnliche Fociverteilung wie bei der C57 Mauslinie (vgl. Abb. 4-4, S. 45). Gegenüber den Werten der C57 Mäuse in den unbestrahlten Kontrollen sind diejenigen der  $ATM^{+/-}$  Tiere vergleichsweise leicht erhöht (0,153 Foci pro Zelle im Bronchialepithel, 0,098 Foci pro Alveolarzelle). Demgegenüber ergibt sich im Vergleich zu C57 weder im Bronchialepithel (C57: 0,916 Foci pro Zelle,  $ATM^{+/-}$ : 0,935 Foci pro Zelle) noch in den Alveolarzellen (C57: 0,617 Foci pro Zelle,  $ATM^{+/-}$ : 0,809 Foci pro Zelle) ein signifikanter Unterschied zwischen den induzierten Foci eine halbe Stunde nach Bestrahlung. Gleiches gilt für die Endpunkte 24 und 72 Stunden nach Organentnahme.

In der darauf folgenden Abbildung 4-6 (S. 48) sind die Ergebnisse der  $ATM^{-/-}$  Mauslinie nach Applikation des analogen Bestrahlungsschemas gezeigt.



Anz. Zellen	878	1241	178	210	847	1526	979	1516
Anz. Präp.	3	3	4	4	4	4	4	4

**Abbildung 4-5: Foci pro Zelle nach Einzeitbestrahlung mit 100 mGy ATM<sup>+/-</sup>**

*Ergebnisse der Einzeitbestrahlung mit 100 mGy bei der ATM<sup>+/-</sup> Mauslinie.*

*Die Tabelle unter dem Diagramm gibt für jeden Messpunkt die Gesamtzahl an ausgewerteten Zellen und die Zahl der für den Messpunkt ausgewerteten Präparate an.*

*Der Kontrolle gegenübergestellt sind die Induktion (Organentnahme 0,5 Stunden nach Bestrahlung) sowie die verbliebenen Foci bei Entnahme 24 bzw. 72 Stunden nach Bestrahlung. Für jeden Messpunkt sind jeweils Foci pro Bronchialepithelzelle (hellgrau) und Alveolarzelle (dunkelgrau) als  $x \pm S.E.M.$  angegeben ( $n = \text{Anzahl der Präparate}$ ).*

*Die statistischen Signifikanzen stellen sich wie folgt dar.*

Bronchialepithelzellen:

*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,03$ );*

*0,5h vs. 24h ( $p < 0,02$ ), 72h ( $p < 0,02$ );*

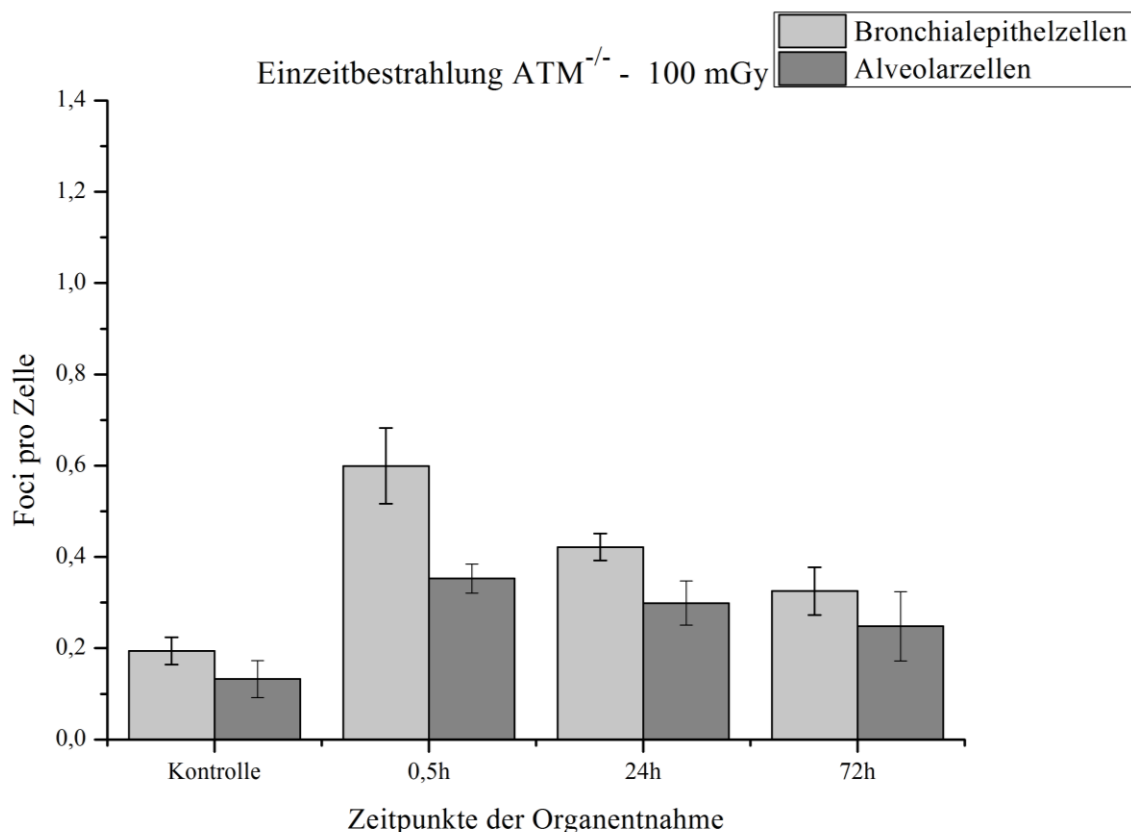
Alveolarzellen:

*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,03$ );*

*0,5h vs. 24h ( $p < 0,02$ ), 72h ( $p < 0,02$ );*

Bronchialepithelzellen vs. Alveolarzellen:

*Keine Signifikanzen*



Anz. Zellen	734	1066	282	464	386	579	536	897
Anz. Präp.	3	3	4	4	4	4	4	4

**Abbildung 4-6: Foci pro Zelle nach Einzeitbestrahlung mit 100 mGy  $ATM^{-/-}$**

*Ergebnisse der Einzeitbestrahlung mit 100 mGy bei der  $ATM^{-/-}$  Mauslinie.*

*Die Tabelle unter dem Diagramm gibt für jeden Messpunkt die Gesamtzahl an ausgewerteten Zellen und die Zahl der für den Messpunkt ausgewerteten Präparate an.*

*Der Kontrolle gegenübergestellt sind die Induktion (Organentnahme 0,5 Stunden nach Bestrahlung) sowie die verbliebenen Foci bei Entnahme 24 bzw. 72 Stunden nach Bestrahlung. Für jeden Messpunkt sind jeweils Foci pro Bronchialepithelzelle (hellgrau) und Alveolarzelle (dunkelgrau) als  $x \pm S.E.M.$  angegeben ( $n = \text{Anzahl der Präparate}$ ).*

*Die statistischen Signifikanzen stellen sich wie folgt dar.*

Bronchialepithelzellen:

*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,03$ ), 24h ( $p < 0,03$ );*

*0,5h vs. 24h ( $p < 0,03$ ), 72h ( $p < 0,01$ );*

*24h vs. 72h: Keine Signifikanz*

Alveolarzellen:

*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,03$ );*

*0,5h: Keine Signifikanzen;*

Bronchialepithelzellen vs. Alveolarzellen:

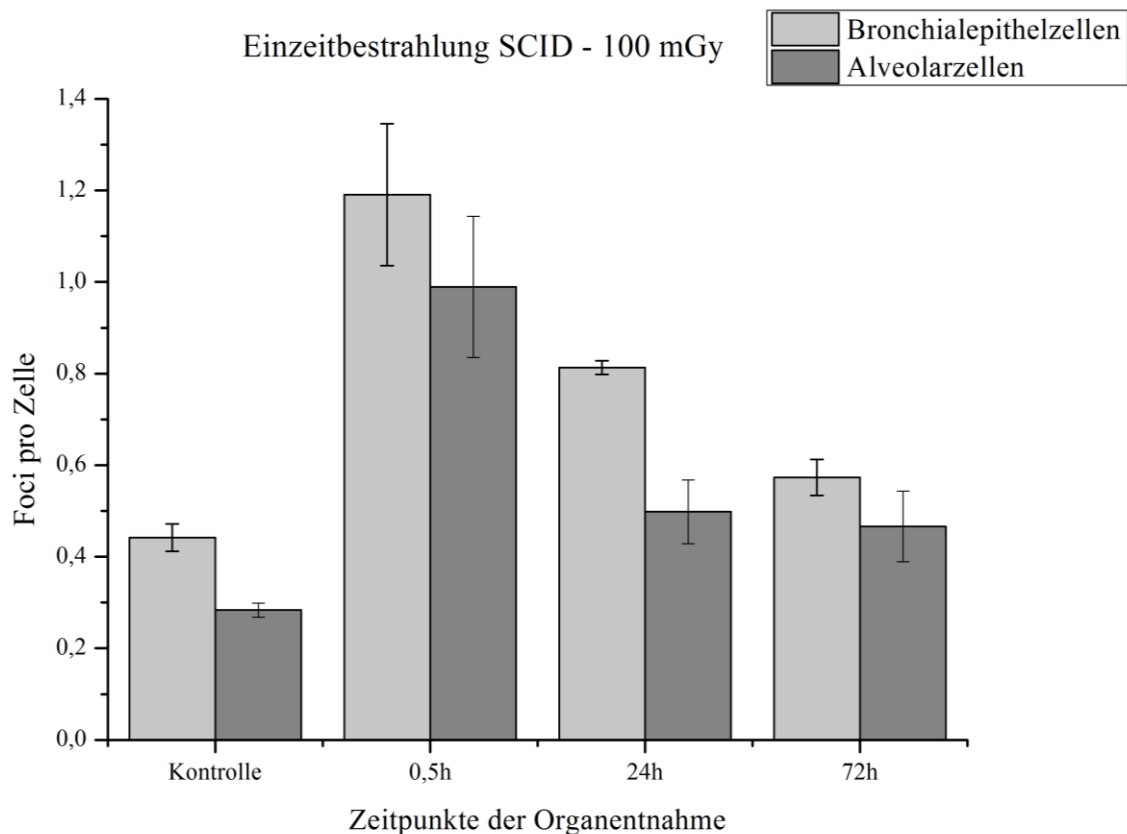
*0,5h ( $p < 0,02$ )*

Die homozygote  $ATM^{-/-}$  Mauslinie zeigt eine nochmals geringfügig höhere Sensitivität gegenüber der natürlichen Hintergrundbelastung in der unbestrahlten Kontrolle (0,194 Foci pro Epithelzelle, 0,132 Foci pro Alveolarzelle). Mit 0,599 Foci pro Zelle im Bronchialepithel zum Zeitpunkt einer halben Stunde nach Bestrahlung liegen die induzierten Foci nicht im Bereich von etwa 0,9 Foci pro Zelle, in dem sich die Werte der anderen beiden untersuchten Mauslinien (0,915 und 0,936) nach einmaliger Bestrahlung mit 100 mGy befinden (Abb. 4-6, S. 48). Die statistische Analyse ergibt, dass die  $ATM^{-/-}$  Mäuse zum 24 Stunden Zeitpunkt in Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen sowie zum 72 Stunden Zeitpunkt in den Bronchialepithelzellen signifikant höhere Fociwerte aufweisen als die zuvor betrachteten  $ATM^{+/-}$  Mäuse. Außerdem bestehen zu den 24 und 72 Stunden Messpunkten Signifikanzen zwischen  $ATM^{-/-}$  und C57 im Bronchialepithel sowie zum 72 Stunden Messpunkt in den Alveolarzellen.

Initial zeigt sich damit bei  $ATM^{-/-}$  Mäusen eine geringere Bildung von 53BP1 Foci. Allerdings ist offenbar auch die Rückbildung dieser Foci stark eingeschränkt, weshalb ab dem Messpunkt nach 24 Stunden vergleichsweise höhere Fociwerte als in den anderen Mauslinien beobachtet werden können.

Die SCID Tiere (Abb. 4-7, S. 50) zeigen im Vergleich zur  $ATM^{-/-}$  Linie zu allen Zeitpunkten signifikant höhere Focizahlen sowohl in Bronchialepithel- als auch Alveolarzellen. Außerdem fällt auf, dass die ermittelten SCID Werte bei der Entnahme nach 0,5 Stunden nur geringfügig höher sind als die der C57 und  $ATM^{+/-}$  Tiere (SCID: 1,191 Foci pro Epithelzelle und 0,989 Foci pro Alveolarzelle). Die Werte aller drei Linien (homozygot reparaturprofizient (C57), heterozygot ( $ATM^{+/-}$ ) und homozygot reparaturdefizient (SCID)) liegen zum 0,5 Stunden-Zeitpunkt im Bereich von 0,6 bis 1,2 Foci pro Zelle. Zu den folgenden Zeitpunkten nach 24 (0,813 Foci pro Epithelzelle und 0,498 Foci pro Alveolarzelle) und 72 Stunden (0,573 Foci pro Epithelzelle und 0,466 Foci pro Alveolarzelle) bleiben die Anzahlen der Foci in den SCID Proben erhöht, während sich bei C57 und  $ATM^{+/-}$  bis zu vierfach niedrigere Anzahlen finden, was auf eine eingeschränkte Reparaturkapazität der SCID Zellen hindeutet.





Anz. Zellen	274	426	141	176	197	344	285	372
Anz. Präp.	3	3	4	4	4	4	4	4

#### Abbildung 4-7: Foci pro Zelle nach Einzeitbestrahlung mit 100 mGy SCID

*Ergebnisse der Einzeitbestrahlung mit 100 mGy bei SCID Mäusen.*

*Die Tabelle unter dem Diagramm gibt für jeden Messpunkt die Gesamtzahl an ausgewerteten Zellen und die Zahl der für den Messpunkt ausgewerteten Präparate an.*

*Der Kontrolle gegenübergestellt sind die Induktion (Organentnahme 0,5 Stunden nach Bestrahlung) sowie die verbliebenen Foci bei Entnahme 24 bzw. 72 Stunden nach Bestrahlung. Für jeden Messpunkt sind jeweils Foci pro Bronchialepithelzelle (hellgrau) und Alveolarzelle (dunkelgrau) als  $x \pm S.E.M.$  angegeben ( $n$ = Anzahl der Präparate).*

*Die statistischen Signifikanzen stellen sich wie folgt dar.*

Bronchialepithelzellen:

*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,03$ ), 24h ( $p < 0,03$ );*

*0,5h vs. 24h ( $p < 0,02$ ), 72h ( $p < 0,02$ );*

*24h vs. 72h ( $p < 0,02$ )*

Alveolarzellen:

*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,03$ ), 24h ( $p < 0,03$ ), 72h ( $p < 0,03$ );*

*0,5h vs. 24h ( $p < 0,02$ ), 72h ( $p < 0,02$ );*

Bronchialepithelzellen vs. Alveolarzellen:

*Kon. ( $p < 0,04$ ), 24h ( $p < 0,02$ )*

#### **4.4. 53BP1 Foci nach fraktionierter Bestrahlung**

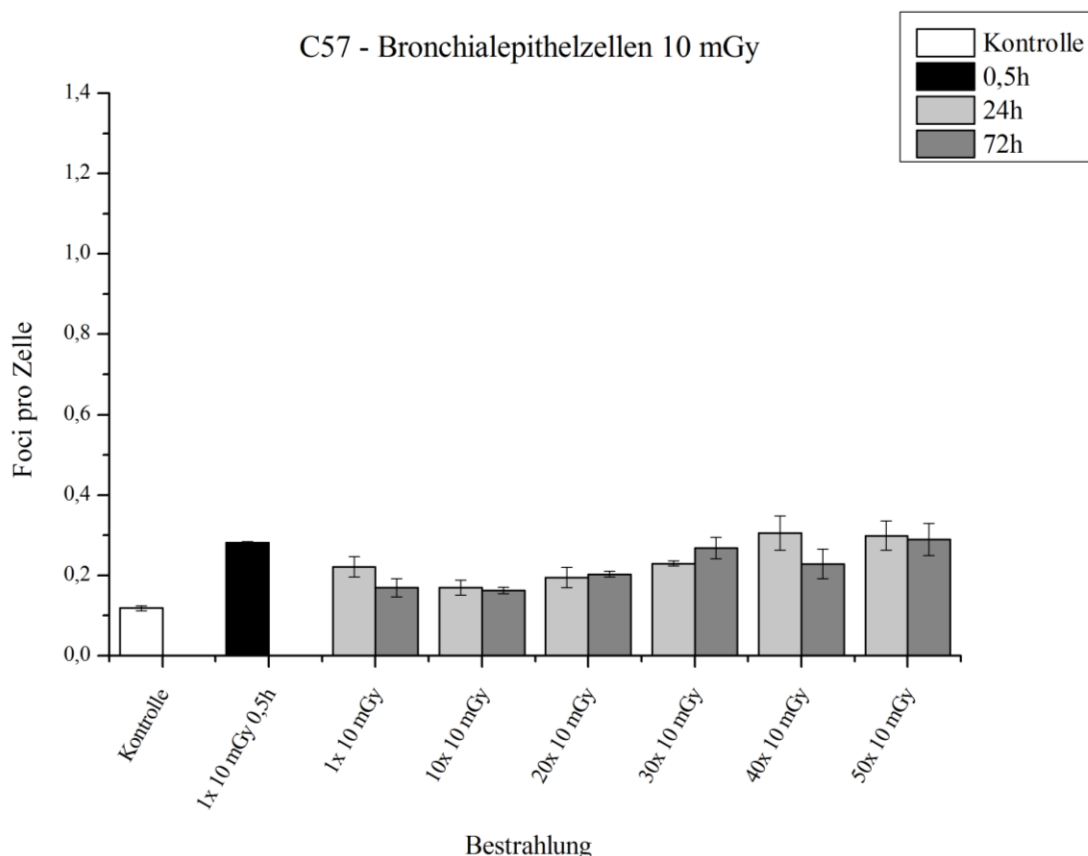
In einem weiteren Ansatz wurden die verschiedenen Mauslinien einer fraktionierten Bestrahlung unterzogen: Dafür erfolgt eine tägliche Bestrahlung zur gleichen Uhrzeit mit gleicher Einzeldosis für eine Dauer von 2 (10x), 4 (20x), 6 (30x), 8 (40x) und 10 (50x) Wochen. Die Werte in Klammer entsprechen der Anzahl an Einzelbestrahlungen. Dieses Vorgehen unterscheidet sich von der strahlentherapeutischen Behandlung des Menschen in der Klinik lediglich darin, dass die Bestrahlung erstens ausschließlich mit Einzeldosen im mGy-Bereich (10 und 100 mGy) und zweitens als Ganzkörperbestrahlung erfolgt. Auch hier lassen sich durch die Organentnahme nach 24 Stunden oder 72 Stunden Rückschlüsse ziehen auf zwischenzeitlich abgelaufene DNA-Reparaturmechanismen und Reparaturprozesse. Zusätzlich entspricht die Untersuchung 72 Stunden nach letztmaliger Bestrahlung der Wochenendpause im Rahmen der klinischen Bestrahlung von Patienten.

##### **4.4.1. C57 Bronchialepithelzellen**

Die mit 10 mGy-Fractionen bestrahlten Mäuse der Linie C57 zeigen im Bereich des Bronchialepithels (Abb. 4-8, S. 52) zu allen Zeitpunkten tendenziell höhere Fociwerte als die unbestrahlten Kontrollen (0,118 Foci pro Zelle). Dies gilt für die Analyse sowohl 24 als auch 72 Stunden nach Bestrahlung. Diese Unterschiede sind für fast alle Zeitpunkte statistisch signifikant: Lediglich bei der Applikation von einer Fraktion von 10 mGy und Organentnahme nach 72 Stunden ergibt sich kein signifikanter Unterschied zur unbestrahlten Kontrolle (0,169 Foci pro Zelle), hier ist lediglich eine Tendenz ersichtlich. Betrachtet man die 24 und 72 Stundenwerte der weiteren Bestrahlungszeitpunkte (10 bis 50 Fraktionen), so gelingt keine statistisch signifikante Veränderung der induzierten Schäden durch DNA-Reparatur im Vergleich zwischen 24 und 72 Stunden nach Bestrahlung. Am ehesten erfolgt eine Abnahme der Anzahl an Foci in diesem Zeitraum nach 40 Fraktionen zu je 10 mGy.

Beim Abgleich der verschiedenen Messpunkte mit dem Wert 0,5 Stunden nach einmaliger Bestrahlung, der Induktion (0,280 Foci pro Zelle, Abb. 4-8, S. 52), ergibt sich für 1x 10 mGy (24 Stunden) lediglich eine tendenziell geringere Anzahl an Foci (0,220 Foci pro Zelle). Die Fociwerte der darauf folgenden Zeitpunkte, zuerst also der 10 mGy Fraktion (72 Stunden, 0,169 Foci pro Zelle) unterscheiden sich jedoch bereits signifikant von denjenigen der

Induktion. Dies gilt ebenso für die Fociverteilung nach 10x 10 mGy (24 Stunden: 0,169 Foci pro Zelle und 72 Stunden: 0,162 Foci pro Zelle) und 20x 10 mGy (24 Stunden: 0,194 Foci pro Zelle und 72 Stunden: 0,2 Foci pro Zelle). Ab 30 Fraktionen zu je 10 mGy (72 Stunden: 0,267 Foci pro Zelle) ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied mehr zu den von der Induktion erzeugten Fociwerten (0,280 Foci pro Zelle).



#### Abbildung 4-8: Fraktionierte Bestrahlung mit 10 mGy, Bronchialepithelzellen C57

Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung von C57 Mäusen mit 10 mGy Einzeldosis pro Fraktion in den Bronchialepithelzellen. Der unbestrahlten Kontrolle gegenübergestellt sind als Vergleichswert Induktion (Organentnahme 0,5 Stunden nach einmaliger Bestrahlung) sowie die verbliebenen Foci pro Zelle zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten (nach 1, 10, 20, 30, 40 und 50 Fraktionen). Für jeden Messpunkt (stets errechnet aus drei Präparaten von drei Tieren) sind jeweils Foci pro Bronchialepithelzelle 24 Stunden (hellgrau) und 72 Stunden (dunkelgrau) nach Bestrahlung als  $x \pm S.E.M.$  angegeben.

Die statistischen Signifikanzen stellen sich wie folgt dar.

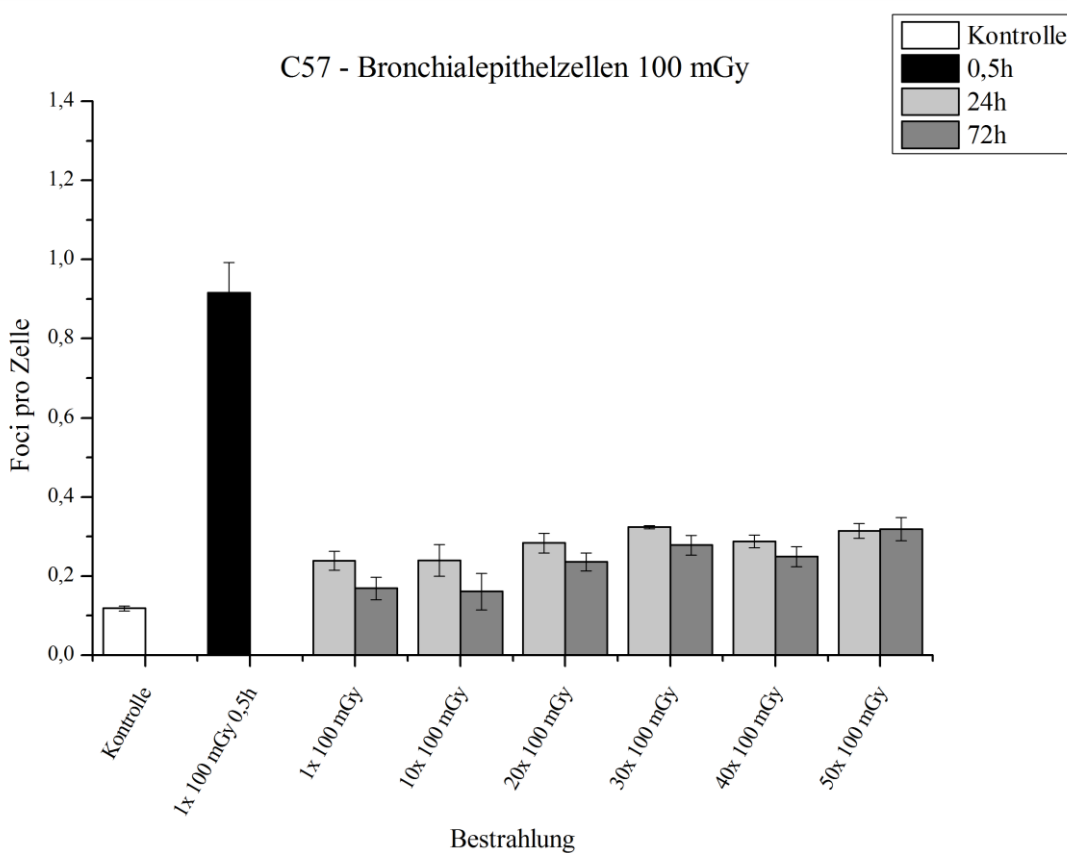
##### 24 Stunden-Werte:

Kon. vs. 0,5h, 1x - 50x ( $p < 0,04$ );  
 0,5h vs. 10x - 30x ( $p < 0,04$ );  
 1x vs. 40x ( $p < 0,02$ ), 50x ( $p < 0,02$ );  
 30x vs. 40x ( $p < 0,04$ ), 50x ( $p < 0,04$ );  
 24h vs. 72h: keine Signifikanzen

##### 72 Stunden-Werte:

Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,04$ ), 10x - 50x ( $p < 0,04$ );  
 0,5h vs. 1x ( $p < 0,01$ ), 10x und 20x ( $p < 0,04$ );  
 1x vs. 30x ( $p < 0,02$ ), 50x ( $p < 0,02$ );  
 10x vs. 20x und 30x ( $p < 0,04$ ), 50x ( $p < 0,04$ );  
 20x vs. 30x ( $p < 0,04$ ), 50x ( $p < 0,04$ )

Die Betrachtung des Bronchialepithels nach Bestrahlung mit 100 mGy (Abb. 4-9, S. 53) liefert zunächst ähnliche Ergebnisse. So bestehen entsprechend der höheren Einzeldosis signifikante Unterschiede zwischen den unbestrahlten Kontrollen (0,118 Foci pro Zelle) und den übrigen Messpunkten mit Ausnahme von 1x 100 mGy (72 Stunden: 0,168 Foci pro Zelle) und 10x 100 mGy (72 Stunden: 0,160 Foci pro Zelle). Diese Beobachtung ist nicht nur für die einmalige Applikation von 100 mGy und Organentnahme nach 72 Stunden nachvollziehbar, sondern trotz des größer ausfallenden Standardfehlers ( $\pm 0,04$ ) auch für die Applikation von 10 Fraktionen zu je 100 mGy, da sie für eine effektive Reparatur in der reparaturprofizienten Mauslinie spricht.



**Abbildung 4-9: Fraktionierte Bestrahlung mit 100 mGy, Bronchialepithelzellen C57**

*Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung von C57 Mäusen mit 100 mGy Einzeldosis pro Fraktion in den Bronchialepithelzellen. Der unbestrahlten Kontrolle gegenübergestellt sind als Vergleichswert Induktion (Organentnahme 0,5 Stunden nach einmaliger Bestrahlung) sowie die verbliebenen Foci pro Zelle zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten (nach 1, 10, 20, 30, 40 und 50 Fraktionen). Für jeden Messpunkt (stets errechnet aus drei Präparaten von drei Tieren) sind jeweils Foci pro Bronchialepithelzelle 24 Stunden (hellgrau) und 72 Stunden (dunkelgrau) nach Bestrahlung als  $x \pm S.E.M.$  angegeben.*

*Statistische Auswertung:*24 Stunden-Werte:*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,04$ ), 1x ( $p < 0,02$ ), 10x bis 50x ( $p < 0,04$ );**0,5h vs. 1x ( $p < 0,01$ ), 10x bis 50x ( $p < 0,04$ );**1x vs. 30x ( $p < 0,03$ ), 40x ( $p < 0,04$ ), 50x ( $p < 0,04$ );*72 Stunden-Werte:*Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,04$ ), 20x bis 50x ( $p < 0,04$ );**0,5h vs. 1x ( $p < 0,01$ ), 10x bis 50x ( $p < 0,04$ );**1x vs. 30x ( $p < 0,04$ ), 50x ( $p < 0,02$ );**10x vs. 30x ( $p < 0,01$ ), 50x ( $p < 0,04$ );**20x vs. 50x ( $p < 0,01$ );**40x vs. 50x ( $p < 0,01$ );**24h vs. 72h: 30x ( $p < 0,04$ )*

Anders als bei der wiederholten Bestrahlung mit 10 mGy unterscheiden sich die verbleibenden Focizahlen bei der Applikation von mehreren Fraktionen zu je 100 mGy bei jeder angewandten Fraktionierungszahl signifikant von den durch die Induktion (0,916 Foci pro Zelle) erzeugten Fociwerten.

Die verbliebenen Focizahlen 24 Stunden nach Bestrahlung sind lediglich tendenziell höher als diejenigen 72 Stunden nach Bestrahlung. Dieser Unterschied ist noch am deutlichsten bei der Applikation von einer und 10 Fraktionen. Dennoch bestätigt sich die bei den 10 mGy Fraktionen nur angedeutete Tendenz der durch fortgesetzte Reparatur sinkenden Fociwerte zwischen 24 und 72 Stunden nach letztmaliger Bestrahlung: Diese ist bei der Bestrahlung mit 100 mGy Fraktionen noch stärker ausgeprägt. Mit steigender Anzahl der applizierten Fraktionen kommt es wie auch bei den 10 mGy Fraktionen zu einem Anstieg von 53BP1 Foci, welcher sich am deutlichsten zeigt im Vergleich der Werte nach einer Fraktion zu 100 mGy (72 Stunden: 0,168 Foci pro Zelle) und nach 50 Fraktionen zu 100 mGy (72 Stunden: 0,318 Foci pro Zelle).

Vergleicht man 10 mGy Fraktionen und 100 mGy Fraktionen hinsichtlich der Zahl der verbleibenden Foci im Bronchialepithel, so zeigt sich, dass sich eine signifikant höhere Anzahl an Foci (nach 100 mGy Einzeldosis) lediglich für 20 (24 Stunden: 0,194 Foci pro Zelle und 0,283 Foci pro Zelle) und 30 Fraktionen (24 Stunden: 0,229 Foci pro Zelle und 0,323 Foci pro Zelle) nachweisen lässt.

Zusammenfassend ergeben sich damit für alle frühen Entnahmezeitpunkte (24 Stunden) signifikant höhere Fociwerte als in den unbestrahlten Kontrollen sowie eine messbare dosiskorrelierte Akkumulation von 53BP1 Foci nach fortgesetzter fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung.

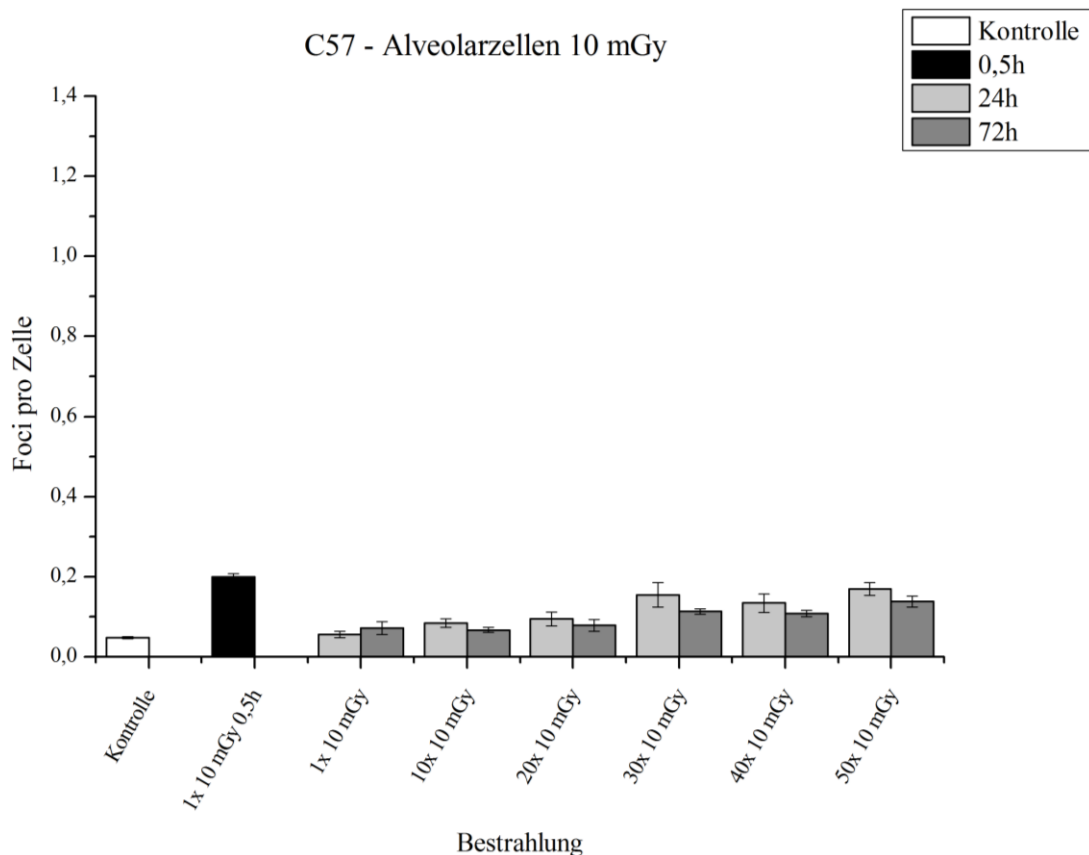
#### 4.4.2. C57 Alveolarzellen

Nach Untersuchung der Zellen des Bronchialepithels werden anhand derselben Präparate die Zellen des Alveolarraums analysiert. Bei der Bestrahlung mit 10 mGy Fraktionen (Abb. 4-10, S. 56) ergeben sich auch hier signifikante Unterschiede hinsichtlich der persistierenden Foci zwischen der unbestrahlten Kontrolle (0,048 Foci pro Zelle) und mehr als 10 applizierten Fraktionen. Bei nur einer Fraktion besteht kaum ein Unterschied; dies weder nach 24 (0,056 Foci pro Zelle) noch nach 72 Stunden (0,072 Foci pro Zelle). Im Gegensatz zum Bronchialepithel ist die Anzahl an 53BP1 Foci nach 1x 10 mGy, 24 Stunden in den Alveolarzellen nicht signifikant höher als in der unbestrahlten Kontrolle. Sämtliche untersuchten Endpunkte in den Alveolarzellen von Kontrolle (0,048 Foci pro Zelle) über Induktion (0,199 Foci pro Zelle) sowie von einer bis zu 50 applizierten Fraktionen zeigen signifikant niedrigere Anzahlen an Foci als die Zellen des Bronchialepithels bei gleicher Bestrahlung. So steht bereits einer Kontrolle mit 0,118 Foci pro Zelle im Bronchialepithel eine Kontrolle mit 0,048 Foci pro Zelle im Alveolarraum gegenüber. In den Alveolarzellen kommt es von der unbestrahlten Kontrolle ausgehend in der Induktion zu einer im Verhältnis betrachtet stärkeren Zunahme (um Faktor 4) der Anzahl an 53BP1 Foci als im Bronchialepithel (Zunahme um Faktor 2,4; vgl. Tab. 4-1). Zum 24 Stunden Zeitpunkt nach 10 Fraktionen geht damit in den Alveolarzellen die Anzahl an 53BP1 Foci stärker zurück als im Bronchialepithel. Nach Applikation von 20 oder 50 Fraktionen kommt es – wie bei der Induktion - in den Alveolarzellen hingegen zu einer verhältnismäßig stärkeren Akkumulation von 53BP1 Foci als in den Bronchialepithelzellen (Zunahmefaktoren vgl. Tab. 4-1).

#### **Tabelle 4-1: Fraktionierte Bestrahlung mit 10 mGy C57**

*Foci pro Zelle nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 mGy Einzeldosis in Bronchialepithel und Alveolarzellen der Mauslinie C57, im obigen Text beschriebene Zunahmefaktoren in Klammern.*

10 mGy	Kontrolle	Induktion	10x – 24h	20x – 24h	50x – 24h
Bronchialepithel	0,118 (1)	0,280 (2,4)	0,169 (1,4)	0,194 (1,6)	0,298 (2,5)
Alveolarzellen	0,048 (1)	0,199 (4,1)	0,083 (1,7)	0,094 (1,9)	0,169 (3,5)
Differenz	0,070	0,081	0,086	0,100	0,129
Signifikanz	p<0,04	p<0,04	p<0,04	p<0,04	p<0,04



**Abbildung 4-10: Fraktionierte Bestrahlung mit 10 mGy, Alveolarzellen C57**

Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung von C57 Mäusen mit 10 mGy Einzeldosis pro Fraktion in den Alveolarzellen. Der unbestrahlten Kontrolle gegenübergestellt sind als Vergleichswert Induktion (Organentnahme 0,5 Stunden nach einmaliger Bestrahlung) sowie die verbliebenen Foci pro Zelle zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten (nach 1, 10, 20, 30, 40 und 50 Fraktionen). Für jeden Messpunkt (stets errechnet aus drei Präparaten von drei Tieren) sind jeweils Foci pro Alveolarzelle 24 Stunden (hellgrau) und 72 Stunden (dunkelgrau) nach Bestrahlung als  $x \pm S.E.M.$  angegeben.

Die statistischen Signifikanzen stellen sich wie folgt dar.

24 Stunden-Werte:

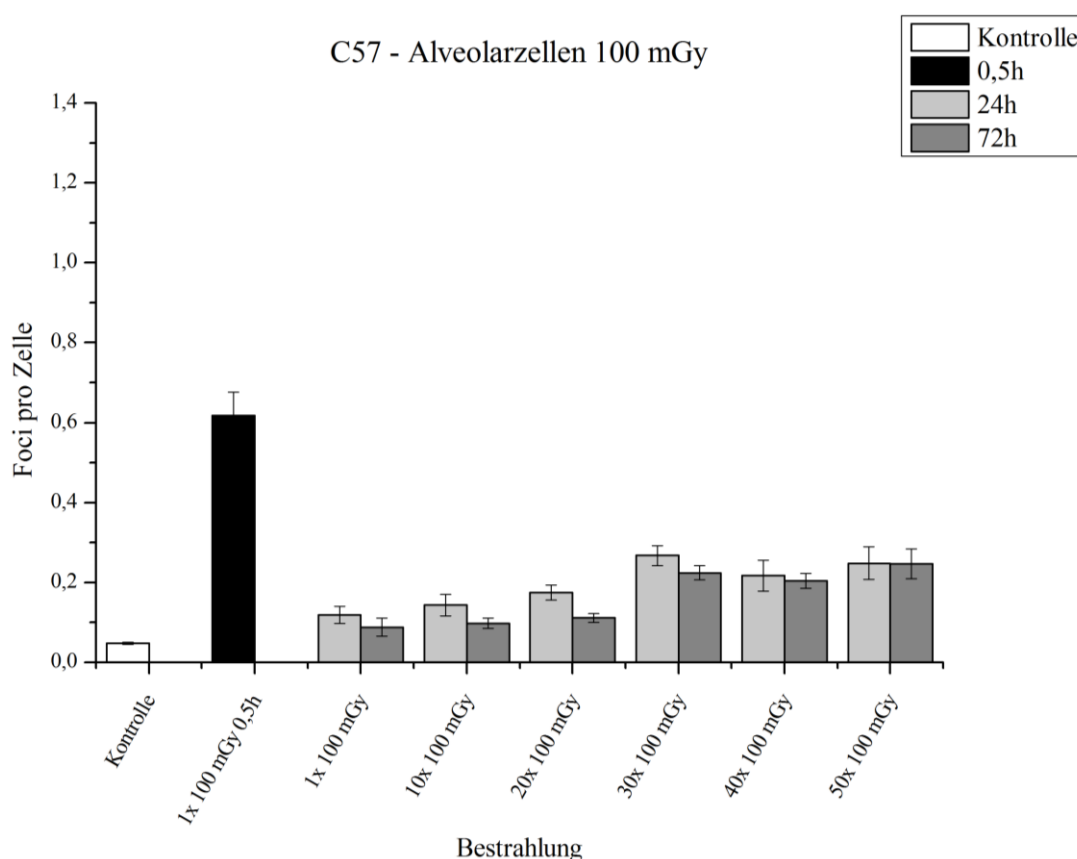
Kon. vs. 0,5h ( $p < 0,04$ ), 10x bis 50x ( $p < 0,04$ );  
 0,5h vs. 1x ( $p < 0,02$ ), 10x ( $p < 0,04$ ), 20x ( $p < 0,04$ ), 40x ( $p < 0,03$ );  
 1x vs. 10x ( $p < 0,03$ ), 20x ( $p < 0,02$ ), 30x bis 50x ( $p < 0,02$ );  
 10x vs. 30x ( $p < 0,04$ ), 40x ( $p < 0,03$ ), 50x ( $p < 0,02$ );  
 20x vs. 50x ( $p < 0,04$ );

72 Stunden-Werte:

Kon. vs. 10x bis 50x ( $p < 0,04$ );  
 0,5h vs. 1x ( $p < 0,02$ ), 10x bis 50x ( $p < 0,04$ );  
 10x vs. 30x ( $p < 0,01$ ), 50x ( $p < 0,04$ );  
 20x vs. 30x ( $p < 0,02$ ), 50x ( $p < 0,04$ );  
 40x vs. 50x ( $p < 0,02$ );  
 24h vs. 72h: keine Signifikanzen

Trotz deutlich niedrigerer Fociwerte im Alveolarraum zeigen auch die dortigen Zellen eine messbar zunehmende Akkumulation von Strahlenschäden mit steigender Zahl der applizierten Fraktionen mit einer Einzeldosis von 10 mGy (Abb. 4-10, S. 56). So bestehen signifikante Unterschiede der Fociwerte zwischen der Induktion (0,199 Foci pro Zelle) und nach 1, 10, 20 sowie 40 applizierten Fraktionen zu 10 mGy für 24 und 72 Stunden (24 Stunden: 0,133 Foci pro Zelle und 72 Stunden: 0,108 Foci pro Zelle). Bei 50 applizierten Fraktionen ist dieser Unterschied jedoch für die Entnahme nach 24 Stunden nicht signifikant (0,169 Foci pro Zelle).

Abbildung 4-11 zeigt die Ergebnisse nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 100 mGy Einzeldosis:



**Abbildung 4-11: Fraktionierte Bestrahlung mit 100 mGy, Alveolarzellen C57**

*Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung von C57 Mäusen mit 100 mGy Einzeldosis pro Fraktion in den Alveolarzellen. Der unbestrahlten Kontrolle gegenübergestellt sind als Vergleichswert Induktion (Organentnahme 0,5 Stunden nach einmaliger Bestrahlung) sowie die verbliebenen Foci pro Zelle zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten (nach 1, 10, 20, 30, 40 und 50 Fraktionen). Für jeden Messpunkt (stets errechnet aus drei Präparaten von drei Tieren) sind jeweils Foci pro Alveolarzelle 24 Stunden (hellgrau) und 72 Stunden (dunkelgrau) nach Bestrahlung als  $x \pm S.E.M.$  angegeben.*



*Statistische Auswertung:*24 Stunden-Werte:*Kon. vs. 0,5h (p<0,04), 1x bis 50x (p<0,04);**0,5h vs. 1x bis 50x (p<0,04);**1x vs. 20x (p<0,03), 20x bis 50x (p<0,02);**10x vs. 30x (p<0,04), 40x (p<0,03), 50x (p<0,02);**20x vs. 30x (p<0,02), 50x (p<0,02);*72 Stunden-Werte:*Kon. vs. 10x bis 50x (p<0,04);**0,5h vs. 1x (p<0,02), 10x bis 50x (p<0,04);**1x vs. 30x bis 50x (p<0,01);**10x vs. 30x bis 50x (p<0,01);**20x vs. 30x bis 50x (p<0,01);**24h vs. 72h: 20x (p<0,04)*

Die mit 100 mGy Fraktionen bestrahlten Alveolarzellen (vgl. Abb. 4-11, S. 57) ergänzen die bisherigen Beobachtungen nach der Bestrahlung mit 10 mGy Einzeldosis: Die Anzahl der Foci ist bei der Induktion (0,617 Foci pro Zelle) und sämtlichen weiteren untersuchten Endpunkten signifikant höher als in der unbestrahlten Kontrolle (0,048 Foci pro Zelle). Einzige Ausnahme bilden die Werte nach einmaliger Bestrahlung mit 100 mGy nach 72 Stunden (0,087 Foci pro Zelle), welche nur geringfügig höher als der Wert der natürlichen Belastung liegen.

Ferner bestehen hinsichtlich des mit 100 mGy (24 Stunden) bestrahlten Lungengewebes statistisch signifikante Unterschiede zwischen Bronchialepithel und Alveolarzellen (bei Kontrolle, Induktion, einer Fraktion, 10, 20 und 30 Fraktionen (vgl. Tab. 4-2)). Ab dem 24 Stundenwert nach 30 Fraktionen stabilisiert sich die Differenz der Fociwerte zwischen Bronchialepithel und Alveolarzellen (30x: 0,055, 40x: 0,070, 50x: 0,066) auf dem Niveau der Differenz zwischen den jeweiligen Kontrollen (0,070).

**Tabelle 4-2: Fraktionierte Bestrahlung mit 100 mGy C57**

*Foci pro Zelle nach fraktionierter Bestrahlung mit 100 mGy Einzeldosis in Bronchialepithel und Alveolarzellen der Mauslinie C57. Angegeben ist zusätzlich die Differenz zwischen den beiden untersuchten Zellpopulationen hinsichtlich induzierter Foci pro Zelle.*

100 mGy	Kontrolle	Induktion	10x / 24h	20x / 24h	30x / 24h	40x / 24h	50x / 24h
Bro.	0,118	0,916	0,239	0,283	0,323	0,287	0,314
Alv.	0,048	0,617	0,143	0,174	0,267	0,217	0,248
Differenz	0,070	0,299	0,096	0,109	0,056	0,070	0,066
Signifikanz	p<0,04	p<0,04	p<0,04	p<0,04	p<0,03	Ø	Ø

Mit zunehmender Anzahl an Fraktionen erzielen unterschiedliche Bestrahlungsdosen – hier im Verhältnis 1:10 (10 zu 100 mGy) – bei C57 Mäusen also einen zunehmend ähnlichen Effekt bezogen auf die Anzahl verbleibender 53BP1 Foci.

#### 4.4.3. Fraktionierte Bestrahlung 10 mGy, 24 Stunden

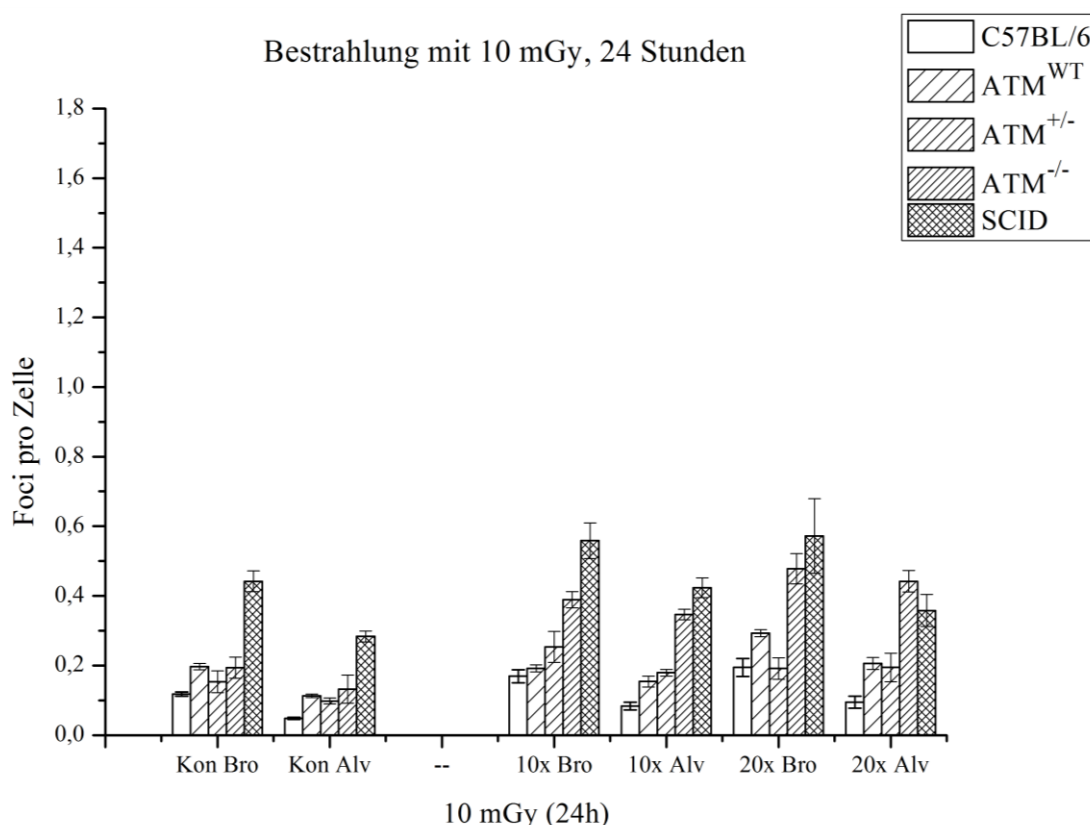
Neben den C57 Mäusen werden die eingangs im Rahmen der unbestrahlten Kontrollen bereits mitbetrachteten ATM-Mauslinien  $ATM^{WT}$ ,  $ATM^{+/-}$  und  $ATM^{-/-}$  sowie die Tiere der SCID Mauslinie ebenfalls mit 10 mGy fraktioniert bestrahlt.

Zwischen unbestrahlter Kontrolle und fraktionierter Bestrahlung ergeben sich bei den C57 Tieren signifikante Unterschiede (vgl. 4.4.1, S. 51 und 4.4.2, S. 55). Betrachtet man die Fociwerte nach 10 und 20 Fraktionen in Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen, so ergibt sich bei der C57 Mauslinie bei mehrfacher Applikation von 10 mGy Dosen nur eine geringe Differenz (Bronchialepithelzellen: 0,169 (10x) und 0,194 (20x) Foci pro Zelle, Alveolarzellen: 0,083 (10x) und 0,094 (20x) Foci pro Zelle). Anders stellt sich dies bei der Betrachtung der  $ATM^{WT}$  Linie dar: Der  $ATM^{WT}$  zeigt eine Signifikanz zwischen der Applikation von 10 und 20 Fraktionen in den Bronchialepithelzellen (10x: 0,199 Foci pro Zelle und 20x: 0,309 Foci pro Zelle, 24 Stunden, Abb. 4-12, S. 60).

Bei den  $ATM^{+/-}$  Proben ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den unbestrahlten Kontrollen und fraktionierter Bestrahlung lediglich im Bereich der Alveolarzellen. Von den jeweiligen Kontrollen ausgehend (Bronchialepithelzellen: 0,153 Foci pro Zelle, Alveolarzellen: 0,098 Foci pro Zelle) ergeben sich 0,253 nach 10 und 0,191 Foci pro Zelle nach 20 Fraktionen zu je 10 mGy im Bronchialepithel. In den Alveolarzellen steigen die Focizahlen auf 0,179 nach 10 und 0,194 Foci pro Zelle nach 20 Fraktionen. Nach 20 Fraktionen zu je 10 mGy kommt es bei  $ATM^{+/-}$  Tieren damit zu einer annähernd gleichen Anzahl an 53BP1 Foci in Epithel- und Alveolarzellen. Ausgehend von den jeweiligen unbestrahlten Kontrollen in den beiden untersuchten Zellpopulationen akkumulieren die Foci in den Alveolarzellen allerdings stärker als in den Bronchialepithelzellen, da ihre Anzahl um einen größeren Faktor zunimmt (Kontrolle-20 Fraktionen: Bronchialepithelzellen: Faktor 1,25 und Alveolarzellen: Faktor 1,98).

Auffallend wenig Unterschiede ergeben sich zwischen den Mauslinien  $ATM^{WT}$  und  $ATM^{+/-}$ : Nach Applikation von 10 Fraktionen zeigt die heterozygote  $ATM^{+/-}$  Linie durchschnittlich eine höhere Anzahl an Foci als die  $ATM^{WT}$  Mauslinie. Demgegenüber finden sich bei der  $ATM^{WT}$  Linie nach Bestrahlung mit 20 Fraktionen in beiden betrachteten Zellpopulationen mehr 53BP1 Foci. Damit bestehen zwischen den beiden Linien bei dieser Untersuchung allenfalls tendenzielle, jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung mit 10 mGy Einzeldosis und Organentnahme nach 24 Stunden sind in der folgenden Abbildung 4-12 dargestellt:



**Abbildung 4-12: Fraktionierte Bestrahlung aller Mauslinien, 10 mGy, 24 Stunden**

Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung aller untersuchter Mauslinien (vgl. Legende) mit 10 mGy Einzeldosis pro Fraktion und Organentnahme 24 Stunden nach letztmaliger Bestrahlung. Als Referenzwerte sind die unbestrahlten Kontrollen („Kon“) von Bronchialepithel- und Alveolarzellen angeführt. Anschließend sind auf der Abszisse vier Gruppen angegeben: „10x Bro“ für die verbliebenen Foci in den Bronchialepithelzellen der unterschiedlichen Mauslinien nach Applikation von 10 Fraktionen. Analog zeigt „10x Alv“ die Fociwerte zum entsprechenden Zeitpunkt in den Alveolarzellen. „20x Bro“ und „20x Alv“ zeigen die Focizahlen nach Applikation von 20 Fraktionen in Bronchialepithel- und Alveolarzellen. Für jeden Messpunkt (stets errechnet aus mindestens drei Präparaten) sind jeweils Foci pro Zelle als  $x \pm S.E.M.$  angegeben.

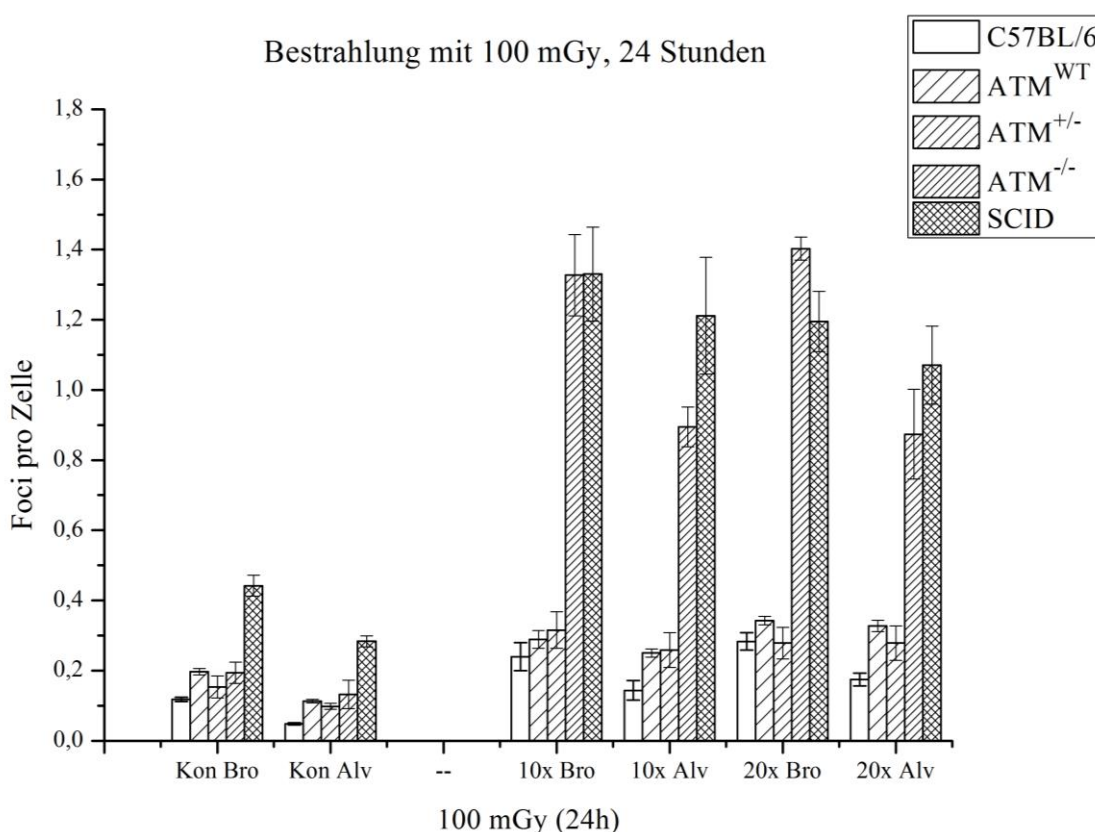
Die statistische Auswertung befindet sich auf der nächsten Seite.

*Statistische Auswertung:*Bronchialepithelzellen (Bro):- Kon: vgl. Abb. 4-2;- Kon-10x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ );- Kon-20x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ );- 10x: C57 vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{-/-}$  vs. SCID ( $p < 0,02$ );- 20x: C57 vs.  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );- 10x-20x:  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ );Alveolarzellen (Alv):- Kon: vgl. Abb. 4-2;- Kon-10x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ );- Kon-20x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ );- 10x: C57 vs.  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );- 20x: C57 vs.  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ) SCID ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,04$ );- 10x-20x:  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,05$ );Bronchialepithelzellen (Bro) vs. Alveolarzellen (Alv):- 10x: C57 ( $p < 0,04$ );- 20x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ )

Von den Linien  $ATM^{WT}$  und  $ATM^{+/-}$  heben sich deutlich die reparaturdefizienten Linien  $ATM^{-/-}$  und SCID ab (Abb. 4-12, S. 60): So finden sich nach Bestrahlung mit 20 Fraktionen in der  $ATM^{-/-}$  Linie Fociwerte mit 0,477 Foci pro Epithelzelle und 0,441 Foci pro Alveolarzelle. Auf etwa gleichem Niveau liegen die bestrahlten SCID Proben mit 0,571 Foci pro Epithelzelle und 0,357 Foci pro Alveolarzelle nach 20 Fraktionen. Zu diesem Messpunkt besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden reparaturdefizienten Linien. Dabei fällt auf, dass bei den SCID Mäusen eine vergleichbare Focianzahl bereits nach Applikation von 10 Fraktionen erreicht wird: 0,558 Foci pro Zelle im Bronchialepithel und 0,423 Foci pro Alveolarzelle. Daraus ergibt sich hinsichtlich der Fociinduktion in genetisch verschiedenen Mauslinien nach Applikation von 10 mGy und Organentnahme nach 24 Stunden folgendes Ergebnis: Nach 20 Fraktionen gibt es deutliche Unterschiede zwischen den reparaturprofizienten Mauslinien C57 und  $ATM^{WT}$ , wobei sich Tiere der heterozygoten  $ATM^{+/-}$  Linie sehr ähnlich den C57 und  $ATM^{WT}$  Linien verhalten.

#### 4.4.4. Fraktionierte Bestrahlung 100 mGy, 24 Stunden

Analog zur beschriebenen fraktionierten Bestrahlung mit 10 mGy wurden Tiere der Linien C57, ATM<sup>WT</sup>, ATM<sup>+/-</sup>, ATM<sup>-/-</sup> und SCID mit 100 mGy fraktioniert bestrahlt und die Organe 24 Stunden nach der letzten Bestrahlungsfraction zur Analyse entnommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigt Abbildung 4-13:



**Abbildung 4-13: Fraktionierte Bestrahlung aller Mauslinien, 100 mGy, 24 Stunden**

*Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung aller untersuchter Mauslinien (vgl. Legende) mit 100 mGy Einzeldosis pro Fraktion und Organentnahme 24 Stunden nach letztmaliger Bestrahlung. Als Referenzwerte sind die unbestrahlten Kontrollen („Kon“) von Bronchialepithel- und Alveolarzellen angeführt. Anschließend sind auf der Abszisse vier Gruppen angegeben: „10x Bro“ für die verbliebenen Foci in den Bronchialepithelzellen der unterschiedlichen Mauslinien nach Applikation von 10 Fraktionen. Analog zeigt „10x Alv“ die Fociwerte zum entsprechenden Zeitpunkt in den Alveolarzellen. „20x Bro“ und „20x Alv“ zeigen die Focizahlen nach Applikation von 20 Fraktionen in Bronchialepithel- und Alveolarzellen. Für jeden Messpunkt (stets errechnet aus mindestens drei Präparaten) sind jeweils Foci pro Zelle als  $x \pm S.E.M.$  angegeben.*

*Die statistische Auswertung befindet sich auf der nächsten Seite.*

*Statistische Auswertung:*Bronchialepithelzellen (Bro):- Kon: vgl. Abb. 4-2;- Kon-10x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,03$ );- Kon-20x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,03$ );- 10x: C57 vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );- 20x: C57 vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );- 10x-20x: keine Signifikanzen;Alveolarzellen (Alv):- Kon: vgl. Abb. 4-2;- Kon-10x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );- Kon-20x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );- 10x: C57 vs.  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );- 20x: C57 vs.  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );- 10x-20x:  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ );Bronchialepithelzellen (Bro) vs. Alveolarzellen (Alv):- 10x:  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ );- 20x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ )

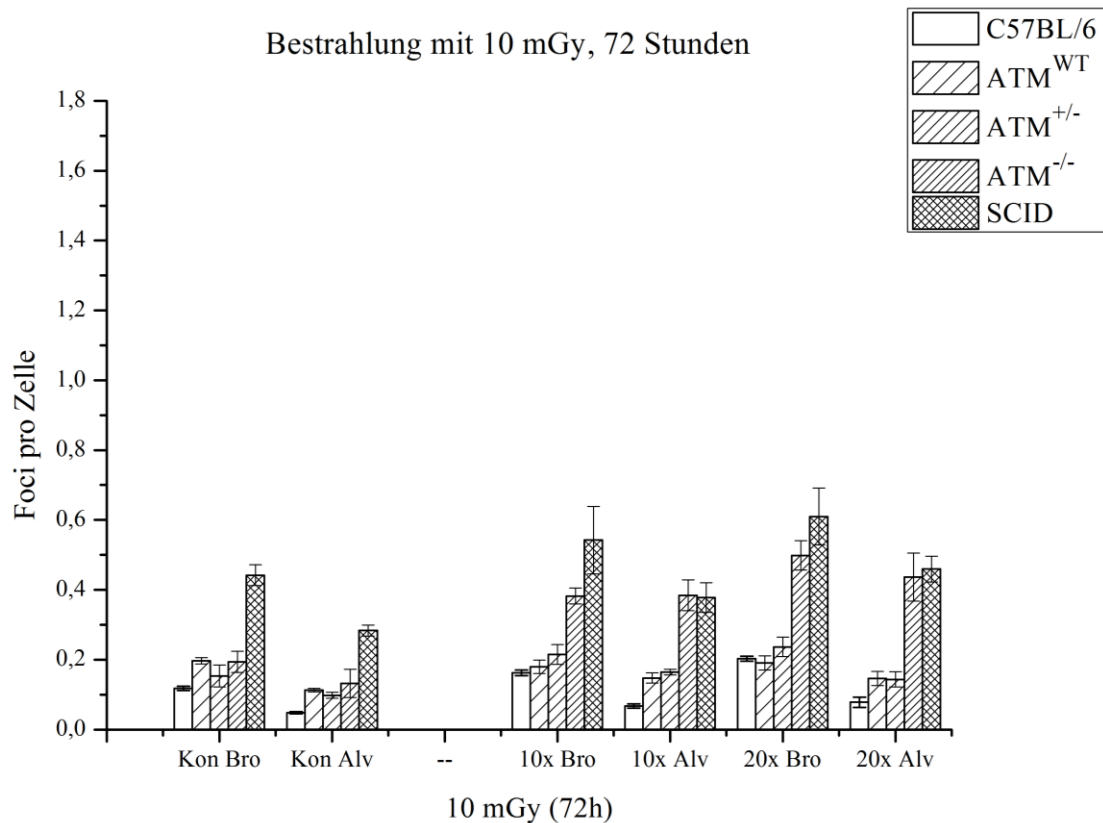
Die mit 100 mGy Fraktionen bestrahlten Mauslinien weisen mit der Ausnahme der heterozygoten  $ATM^{+/-}$  Linie im Bronchialepithel sowohl in Bronchialepithelzellen als auch in den Alveolarzellen signifikant unterschiedliche Focizahlen im Vergleich zur jeweiligen unbestrahlten Kontrolle auf (Abb. 4-13, S. 62). Auffallend ist zudem, dass nach Applikation von 10 und 20 Fraktionen zu 100 mGy in den Alveolarzellen Signifikanzen zwischen C57 und  $ATM^{WT}$  bestehen. Gegenüber der Applikation von 10 Fraktionen kommt es nach 20 Fraktionen zu je 100 mGy bei C57 und  $ATM^{WT}$  Tieren sowohl in Epithel- als auch Alveolarzellen zu einem deutlichen Anstieg der Fociwerte. Eine vergleichbare Zunahme der 53BP1 Foci beim Vergleich von 10 und 20 applizierten Fraktionen ist bei den heterozygoten  $ATM^{+/-}$  Mäusen nicht zu beobachten: Die Anzahl der Foci ist nach 10 und 20 Fraktionen zu 100 mGy in beiden Zellpopulationen annähernd konstant und liegt somit etwa auf dem

Niveau des ATM<sup>WT</sup> nach 10 Fraktionen. Die Ergebnisse der reparaturdefizienten Linien ATM<sup>-/-</sup> und SCID heben sich deutlich und statistisch signifikant von denjenigen der übrigen Linien ab. Die Proben der beiden reparaturdefizienten Linien weisen im Bronchialepithel bereits nach 10 Fraktionen durchschnittlich einen Focus pro Zelle auf. Dieser Wert wird bei Tieren der ATM<sup>-/-</sup> Linie nach 20 Fraktionen nochmals übertroffen (ATM<sup>-/-</sup>: 1,327 (10x) und 1,402 (20x) Foci pro Epithelzelle; SCID: 1,330 (10x) und 1,195 (20x) Foci pro Epithelzelle). In den Alveolarzellen wird dieser Wert von einem Focus pro Zelle bei der ATM<sup>-/-</sup> Linie nicht erreicht. Auch bei Tieren der SCID Linie finden sich niedrigere Anzahlen an 53BP1 Foci in den Alveolarzellen als in den Bronchialepithelzellen (ATM<sup>-/-</sup>: 0,874 (20x); SCID: 1,070 (20x) Foci pro Alveolarzelle). Analog zu den Ergebnissen nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 mGy bestehen zwischen diesen beiden Mauslinien keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Focianzahl zu den betrachteten Messpunkten.

Beim Vergleich von 10 und 100 mGy Einzeldosen (24 Stunden) finden sich bei den C57 Mäusen lediglich signifikante Unterschiede bei der Applikation von 20 Fraktionen, dies sowohl in Bronchialepithel als auch Alveolarzellen. Bei der ATM<sup>WT</sup> Linie ergibt sich jedoch für alle untersuchten Punkte sowohl in den Epithel- als auch den Alveolarzellen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich induzierter Foci zwischen der Bestrahlung mit 10 und 100 mGy. Für die ATM<sup>+/-</sup> Linie ergeben sich in dieser Hinsicht jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Epithel- und Alveolarzellen, wodurch sich diese erstmals deutlich von der ATM<sup>WT</sup> Linie abhebt.

#### **4.4.5. Fraktionierte Bestrahlung 10 mGy, 72 Stunden**

Um später als 24 Stunden nach letztmaliger Bestrahlung ablaufende Reparaturprozesse mitzuerfassen und um die in der klinischen Strahlentherapie übliche Wochenendpause zu berücksichtigen, wurden auch 72 Stunden nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 und 100 mGy Einzelfraktionen Organentnahmen zur Focianalyse durchgeführt. Die Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung mit 10 mGy Einzeldosis zeigt Abbildung 4-14 auf der folgenden Seite.



**Abbildung 4-14: Fraktionierte Bestrahlung aller Mauslinien, 10 mGy, 72 Stunden**

Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung aller untersuchter Mauslinien (vgl. Legende) mit 10 mGy Einzeldosis pro Fraktion und Organentnahme 72 Stunden nach letztmaliger Bestrahlung. Als Referenzwerte sind die unbestrahlten Kontrollen („Kon“) von Bronchialepithel- und Alveolarzellen angeführt. Anschließend sind auf der Abszisse vier Gruppen angegeben: „10x Bro“ für die verbliebenen Foci in den Bronchialepithelzellen der unterschiedlichen Mauslinien nach Applikation von 10 Fraktionen. Analog zeigt „10x Alv“ die Fociwerte zum entsprechenden Zeitpunkt in den Alveolarzellen. „20x Bro“ und „20x Alv“ zeigen die Focizahlen nach Applikation von 20 Fraktionen in Bronchialepithel- und Alveolarzellen. Für jeden Messpunkt (stets errechnet aus mindestens drei Präparaten) sind jeweils Foci pro Zelle als  $x \pm S.E.M.$  angegeben.

Statistische Auswertung:

Bronchialepithelzellen (Bro):

- Kon: vgl. Abb. 4-2;

- Kon-10x: C57 ( $p < 0,04$ ), ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,02$ );

- Kon-20x: C57 ( $p < 0,04$ ), ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,03$ );

- 10x: C57 vs. ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );

ATM<sup>WT</sup> vs. ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );

ATM<sup>+/-</sup> vs. ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );

- 20x: C57 vs. ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );

ATM<sup>WT</sup> vs. ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );

ATM<sup>+/-</sup> vs. ATM<sup>-/-</sup> ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );

- 10x-20x: C57 ( $p < 0,04$ );



Alveolarzellen (Alv):

- Kon: vgl. Abb. 4-2;

- Kon-10x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ );

- Kon-20x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );

- 10x: C57 vs.  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );

$ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );

$ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );

- 20x: C57 vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );

$ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );

$ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );

- 10x-20x: keine Signifikanzen;

Bronchialepithelzellen (Bro) vs. Alveolarzellen (Alv):

- 10x: C57 ( $p < 0,04$ );

- 20x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ )

Bei der Bestrahlung mit je 10 mGy Fraktionen fällt bei der C57 Linie, wie bereits in Abb. 4-8 (S. 52) und Abb. 4-10 (S. 56) gezeigt, auf, dass die Anzahl der verbleibenden Foci sowohl im Bronchialepithel als auch in den Alveolarzellen sowohl bei der Entnahme nach 24 Stunden als auch nach 72 Stunden bei 10 und 20 Fraktionen signifikant höher ist als in der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle. Noch eindrucksvoller zeigt sich diese Beobachtung bei Betrachtung der ATM-defizienten Mäuse ( $ATM^{-/-}$ , Abb. 4-14, S. 65): Auch hier bestehen deutlich signifikante Unterschiede bezüglich der Fociwerte im Vergleich zu den jeweiligen unbestrahlten Kontrollen in Epithel- und Alveolarzellen. Ein Zeitraum von 72 Stunden nach Bestrahlungsende zur Reparatur von durch mehrere 10 mGy Einzelfraktionen induzierten DNA-Schäden scheint also für eine Reduktion der Foci auf das Niveau des natürlichen Hintergrunds nicht auszureichen.

Im Vergleich von Bronchialepithel- und Alveolarzellen ergeben sich vor allem Unterschiede bei den mit 20x 10 mGy (72 Stunden) bestrahlten Geweben: Neben den C57 Tieren zeigen hier die  $ATM^{+/-}$  Tiere signifikante Differenzen (0,236 Foci pro Epithelzelle und 0,144 Foci pro Alveolarzelle).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den verbleibenden Foci in  $ATM^{WT}$  und  $ATM^{+/-}$  Mäusen ergibt sich jedoch auch bei diesem Bestrahlungsmodus nicht.

Vergleicht man hingegen  $ATM^{+/-}$  Tiere und  $ATM^{-/-}$  Tiere (Abb. 4-14, S. 65), so zeigen sich zu allen Zeit- und Messpunkten Signifikanzen: Der unterschiedliche Genotyp führt beispielsweise zu mehr als doppelt so hohen Fociwerten in den Alveolarräumen der  $ATM^{-/-}$  Tiere (nach 20 Fraktionen:  $ATM^{+/-}$ : 0,143 Foci pro Zelle und  $ATM^{-/-}$ : 0,436 Foci pro Zelle).

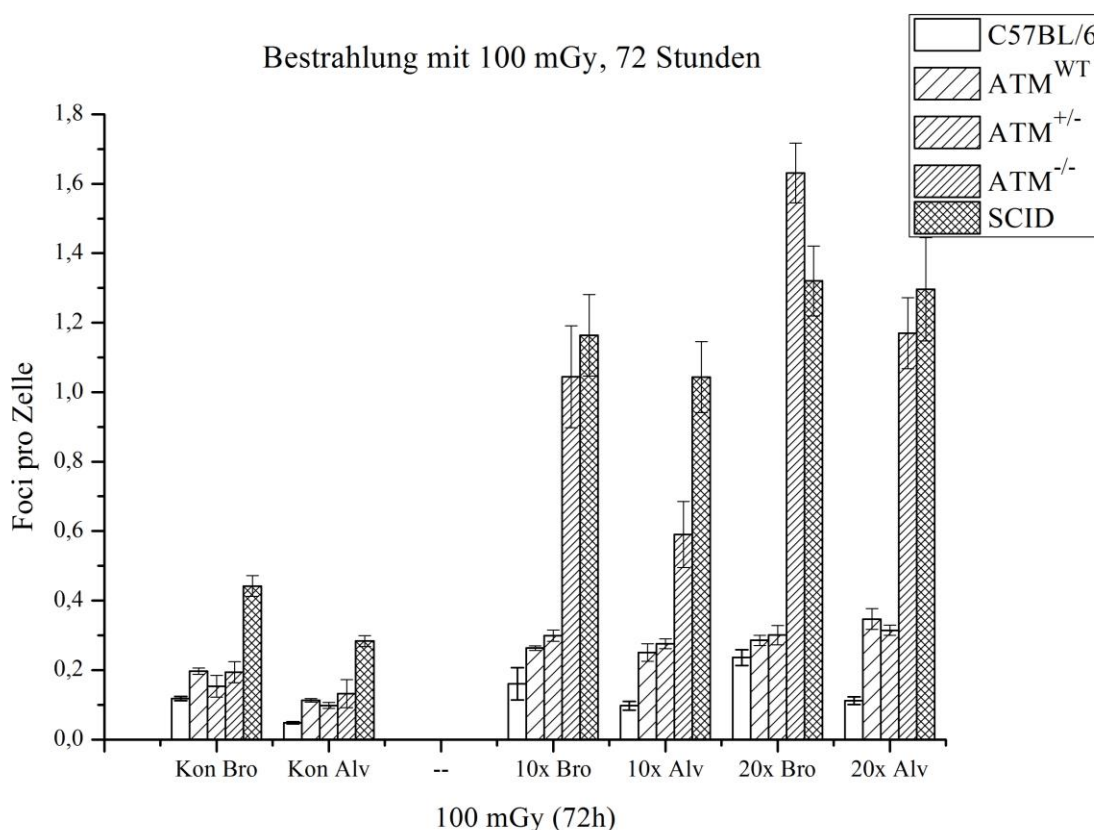
Die Anzahl der verbleibenden Foci in den ATM<sup>-/-</sup> Zellen wird nach 10 Fraktionen im Bronchialepithel lediglich durch die SCID Tiere übertroffen, welche allerdings auch einen höheren natürlichen Hintergrund aufweisen (Bronchialepithelzellen: 0,441 Foci pro Zelle, Alveolarzellen: 0,283 Foci pro Zelle). Auch nach 20 Fraktionen besteht allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen ATM<sup>-/-</sup> und SCID bezüglich der Anzahl an 53BP1 Foci.

#### 4.4.6. Fraktionierte Bestrahlung 100 mGy, 72 Stunden

Im weiteren Vorgehen werden Lungengewebsproben der verschiedenen Mauslinien nach Bestrahlung mit 100 mGy Einzelfraktionen und Entnahme nach 72 Stunden analysiert (Abb. 4-15, S. 68). Bei Untersuchung von C57 Tieren fällt, wie bereits in Abb. 4-9 (S. 53) und 4-11 (S. 57) gezeigt, auf, dass im Bronchialepithel nach 10 Fraktionen (0,160 Foci pro Zelle) kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Fociwerten zur unbestrahlten Kontrolle besteht (0,118 Foci pro Zelle), wohl aber nach Applikation von 20 Fraktionen (0,236 Foci pro Zelle). Ferner besteht eine Signifikanz zwischen der Applikation von 10 (0,160 Foci pro Zelle) und 20 Fraktionen (0,236 Foci pro Zelle) im Bronchialepithel. Im Alveolarbereich ist dieser Unterschied allenfalls als Tendenz zu erkennen (10x: 0,097 Foci pro Zelle, 20x: 0,111 Foci pro Zelle). Dieser geringe Unterschied zwischen der Applikation von 10 und 20 Fraktionen in den Alveolarzellen deutet dort auf eine verminderte Strahlensensibilität der C57 Tiere hin (vgl. 4.4.1, S. 51 und 4.4.2, S. 55).

Ähnliche Ergebnisse zeigen die untersuchten ATM<sup>WT</sup> Tiere: Auch hier bestehen deutliche Signifikanzen zwischen unbestrahlter Kontrolle und den Werten in den Epithel- wie auch Alveolarzellen nach Applikation von sowohl 10 als auch 20 Fraktionen. Die Bronchialepithelzellen unterscheiden sich unter dem Aspekt 10 versus 20 Fraktionen allerdings kaum (10x: 0,263 Foci pro Zelle und 20x: 0,285 Foci pro Zelle), während bei den Alveolarzellen eine klarere Tendenz hin zu einer steigenden Anzahl an Foci bei zunehmender Anzahl applizierter Bestrahlungsfractionen zu erkennen ist (10x: 0,250 Foci pro Zelle und 20x: 0,346 Foci pro Zelle).

Diese Ergebnisse sind zusammen mit denjenigen der anderen untersuchten Mauslinien in der folgenden Abbildung 4-15 dargestellt.



**Abbildung 4-15: Fraktionierte Bestrahlung aller Mauslinien, 100 mGy, 72 Stunden**

Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung aller untersuchter Mauslinien (vgl. Legende) mit 100 mGy Einzeldosis pro Fraktion und Organentnahme 72 Stunden nach letztmaliger Bestrahlung. Als Referenzwerte sind die unbestrahlten Kontrollen („Kon“) von Bronchialepithel- und Alveolarzellen angeführt. Anschließend sind auf der Abszisse vier Gruppen angegeben: „10x Bro“ für die verbliebenen Foci in den Bronchialepithelzellen der unterschiedlichen Mauslinien nach Applikation von 10 Fraktionen. Analog zeigt „10x Alv“ die Fociwerte zum entsprechenden Zeitpunkt in den Alveolarzellen. „20x Bro“ und „20x Alv“ zeigen die Focizahlen nach Applikation von 20 Fraktionen in Bronchialepithel- und Alveolarzellen. Für jeden Messpunkt (stets errechnet aus mindestens drei Präparaten) sind jeweils Foci pro Zelle als  $x \pm S.E.M.$  angegeben.

Statistische Auswertung:

Bronchialepithelzellen (Bro):

- Kon: vgl. Abb. 4-2;

- Kon-10x:  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ),  $SCID$  ( $p < 0,03$ );

- Kon-20x:  $C57$  ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ),  $SCID$  ( $p < 0,03$ );

- 10x:  $C57$  vs.  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $SCID$  ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ),  $SCID$  ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ),  $SCID$  ( $p < 0,02$ );

- 20x:  $C57$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $SCID$  ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ),  $SCID$  ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ),  $SCID$  ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{-/-}$  vs.  $SCID$  ( $p < 0,03$ );

- 10x-20x:  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ );

Alveolarzellen (Alv):- Kon: vgl. Abb. 4-2;- Kon-10x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );- Kon-20x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,02$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );- 10x: C57 vs.  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ), SCID ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{-/-}$  vs. SCID ( $p < 0,02$ );- 20x: C57 vs.  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{+/-}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ ) SCID ( $p < 0,03$ );  
 $ATM^{WT}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );  
 $ATM^{+/-}$  vs.  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ ), SCID ( $p < 0,02$ );- 10x-20x:  $ATM^{WT}$  ( $p < 0,03$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,02$ );Bronchialepithelzellen (Bro) vs. Alveolarzellen (Alv):- 10x:  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,04$ );- 20x: C57 ( $p < 0,04$ ),  $ATM^{-/-}$  ( $p < 0,03$ )

Die ebenfalls untersuchten Tiere der  $ATM^{+/-}$  Linie unterscheiden sich hinsichtlich der Fociwerte allenfalls marginal von den entsprechenden  $ATM^{WT}$  Tieren.

Neben den heterozygoten  $ATM^{+/-}$  Tieren wurden die homozygoten  $ATM^{-/-}$  Tiere untersucht (vgl. Abb. 4-15, S. 68). Neben bereits ohne Bestrahlung erhöhten Anzahlen an 53BP1 Foci treten nach der fraktionierten Bestrahlung noch stärker ausgeprägte Differenzen zu den übrigen untersuchten Tieren der C57,  $ATM^{WT}$   $ATM^{+/-}$  Linien hervor als dies bei der Bestrahlung mit 10 mGy Fraktionen bereits zu beobachten war. Sowohl in Bronchialepithel als auch den Alveolarzellen bestehen zu allen Zeit- und Messpunkten signifikant höhere Anzahlen an Foci als bei den zuvor untersuchten und besprochenen Mauslinien. So sind bereits im Bronchialepithel nach 10 Fraktionen im Vergleich zu den heterozygoten  $ATM^{+/-}$  Tieren dreifach erhöhte Fociwerte zu finden: 1,044 Foci pro Zelle ( $ATM^{-/-}$ ) zu 0,298 Foci pro Zelle ( $ATM^{+/-}$ ). In den Alveolarzellen ist diese Beobachtung weniger stark, aber nicht minder deutlich ausgeprägt: 0,276 Foci pro Alveolarzelle ( $ATM^{+/-}$ ) stehen 0,589 Foci pro Zelle ( $ATM^{-/-}$ ) gegenüber. Auch im Vergleich der beiden untersuchten Zellarten zeigen die Bronchialepithelzellen nach Bestrahlung mit 20 Fraktionen zu 100 mGy statistisch signifikant höhere Anzahlen an Foci als die Alveolarzellen.

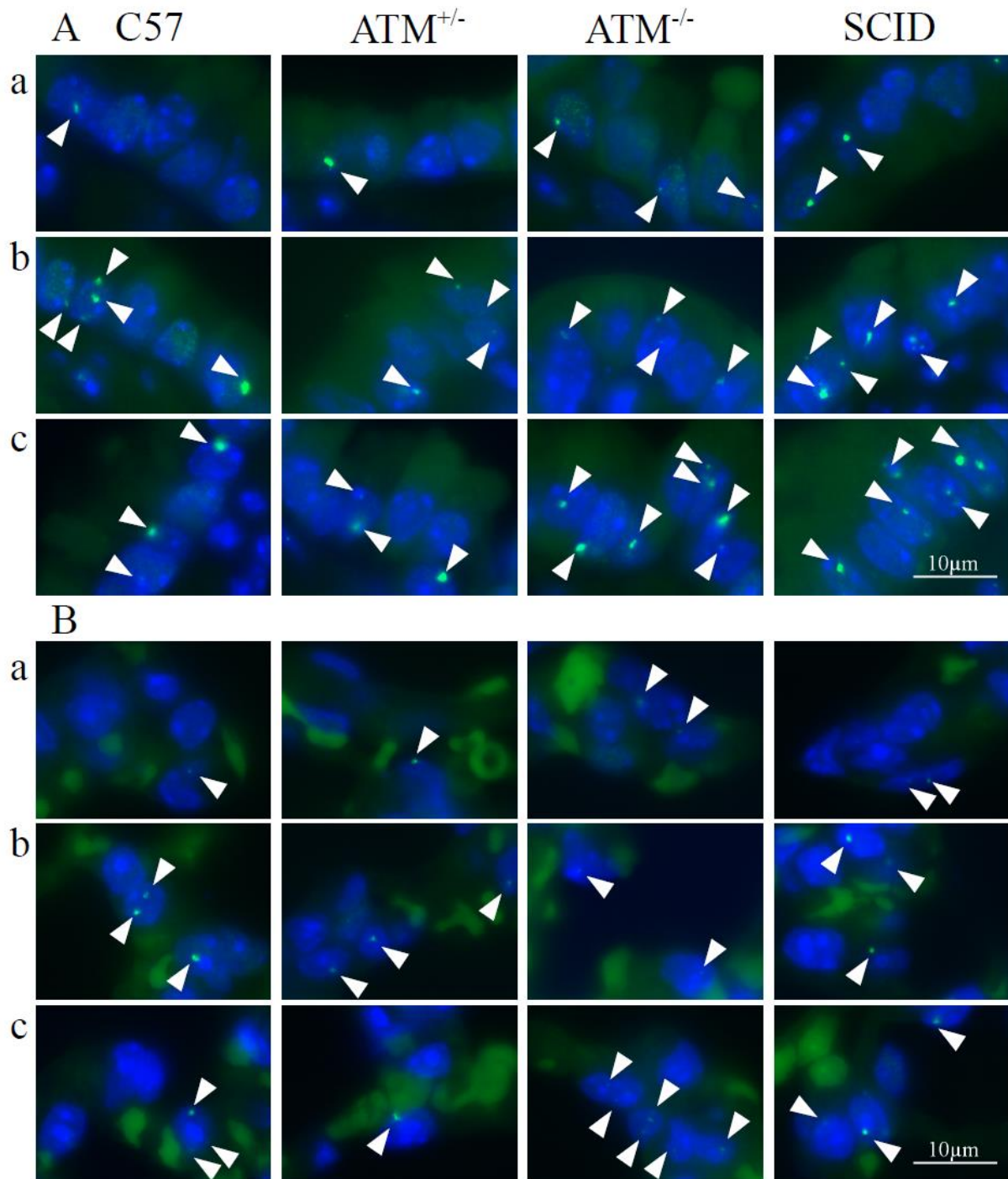
Die  $ATM^{-/-}$  Tiere werden hinsichtlich der strahleninduzierten Foci durch die SCID Tiere noch übertroffen. Dies zeigt sich bereits bei der Betrachtung der unbestrahlten Kontrollen (vgl. 4.2., S. 40). Diese Tendenz höherer Anzahlen an Foci bei den Tieren der SCID Linie gegenüber den  $ATM^{-/-}$  Mäusen ist signifikant im Bereich der Alveolarzellen nach 10 Fraktionen. Nach

Applikation von 20 Fraktionen (72 Stunden) im Bronchialepithel kehrt sich diese Beobachtung um:  $ATM^{-/-}$  Mäuse zeigen wie bei der Bestrahlung mit  $20 \times 100$  mGy, 24 Stunden und zum einzigen Mal für 72 Stunden höhere Werte als SCID. Insgesamt liegen die beiden reparaturdefizienten  $ATM^{-/-}$  und SCID Linien damit etwa auf einem vergleichbaren Niveau. Signifikante Unterschiede zwischen Epithel- und Alveolarzellen sind in der SCID Linie weder nach 10 noch nach 20 Fraktionen erkennbar. Es zeichnen sich lediglich tendenziell höhere Werte nach 20 Fraktionen ab.

Insgesamt treten damit am deutlichsten die reparaturdefizienten Mauslinien hervor: Diese zeigen zu den vorliegenden und besprochenen Messpunkten nach 10 und 20 Fraktionen zu je 100 mGy durchschnittlich mindestens einen Focus pro Zelle. Davon ausgenommen sind lediglich die Alveolarzellen nach 10 Fraktionen Bestrahlung, die diesen Wert nicht erreichen ( $ATM^{-/-}$ : 0,589 Foci pro Zelle). Dieser Teilaspekt unterstreicht abermals die bisherige Beobachtung einer geringeren Strahlensensibilität der Zellen des Alveolarraumes. Es bestehen also auch 72 Stunden nach Bestrahlungsende deutlich signifikante Unterschiede zwischen den reparaturkompetenten und reparaturdefizienten Mauslinien fort, welche damit auf die verschiedenen genetischen Ausstattungen der untersuchten Tiere zurückzuführen sind.

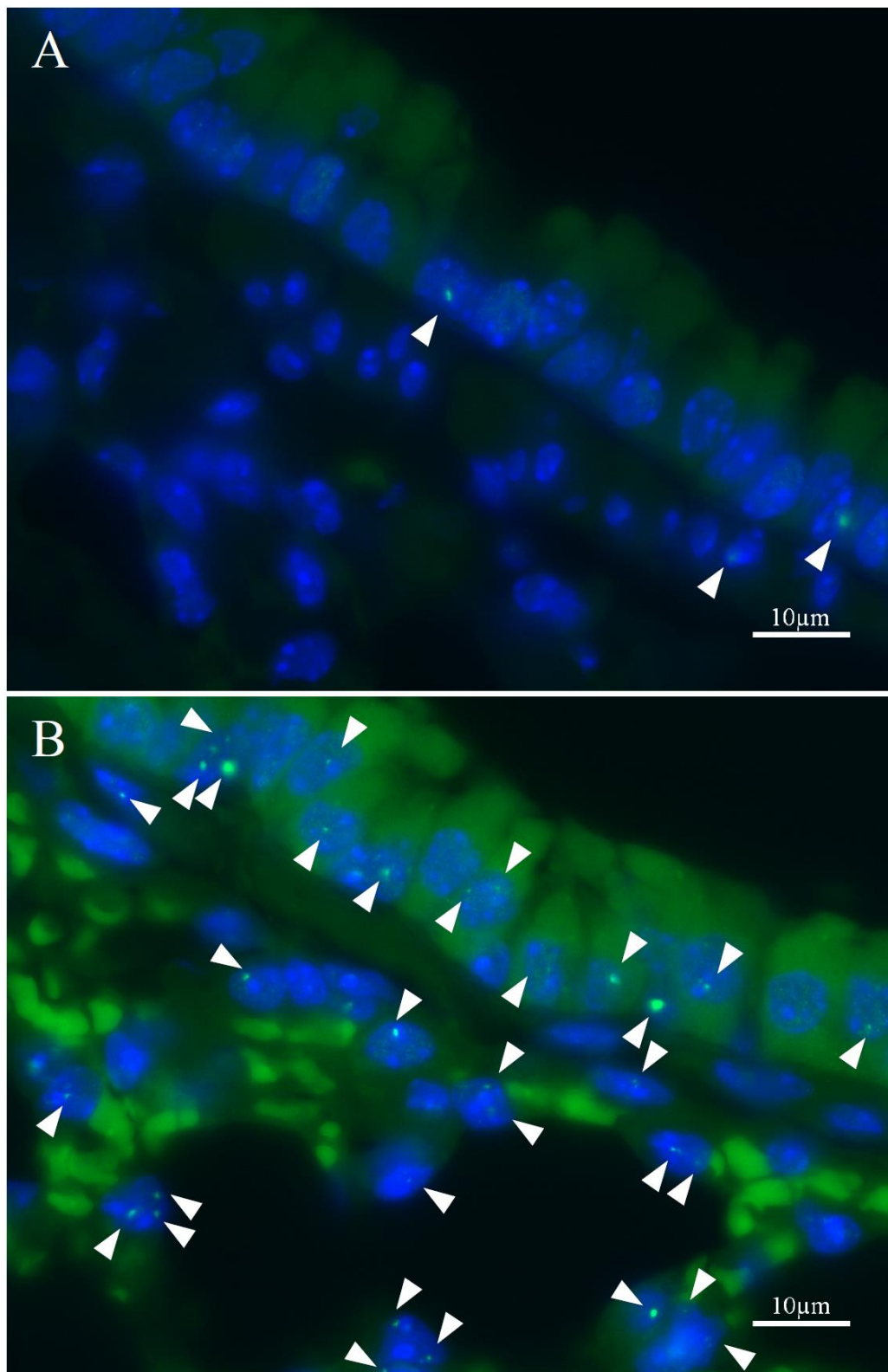
#### **4.4.7. Fluoreszenzmikroskopische 53BP1 Foci der verschiedenen Mauslinien**

Die Abbildungen 4-16 (S. 71) und 4-17 (S. 72) zeigen exemplarische Aufnahmen für die Immunfluoreszenzuntersuchungen. Die obere Hälfte von Abbildung 4-16 (S. 71) zeigt unter (A) Aufnahmen der Bronchialepithelzellen. In der unteren Hälfte dieser Abbildung sind unter (B) Aufnahmen der Alveolarzellen abgebildet. In der jeweils ersten Zeile a (Abb. 4-16, S. 71) sind Gewebeschnitte unbestrahlter Kontrollen dargestellt. Die Aufnahmen der zweiten Zeile b (Abb. 4-16, S. 71) zeigen die Zunahme der Foci insbesondere in den Gewebeschnitten von reparaturdefizienten  $ATM^{-/-}$  und SCID Tieren nach 100 mGy Einzelbestrahlung und Probenentnahme nach 0,5 Stunden. In der dritten Zeile c (Abb. 4-16, S. 71) sind Aufnahmen nach fraktionierter Bestrahlung mit  $20 \times 100$  mGy und Organentnahme 72 Stunden nach letztmaliger Bestrahlung zu sehen. Abbildung 4-17 (S. 72) veranschaulicht anhand zweier Übersichtsaufnahmen die in den verschiedenen untersuchten Präparaten erheblichen Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an 53BP1 Foci. Dazu sind eine Aufnahme der unbestrahlten C57 Kontrolle sowie eine Aufnahme eines mit  $20 \times 100$  mGy (72 Stunden) bestrahlten SCID Lungengewebes abgebildet.



**Abbildung 4-16: Übersicht 53BP1 Foci in Bronchialepithelzellen (A), Alveolarzellen (B)**

Immunfluoreszenzaufnahmen von Bronchialepithelzellen (A) und Alveolarzellen (B) von C57,  $ATM^{+/-}$ ,  $ATM^{-/-}$  und SCID Tieren. Zeile a zeigt jeweils Zellen nicht bestrahlter Kontrolltiere. Zeile b zeigt die Zellen von einmalig mit 100 mGy bestrahlten Tieren, bei denen die Organentnahme 0,5 Stunden nach Bestrahlung erfolgte (Induktion). In Zeile c sind Aufnahmen von Zellen nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 20x 100 mGy und Organentnahme nach 72 Stunden zu sehen. Vor einem blauen DAPI-Hintergrund, welcher die Zellkerne markiert, weisen die Pfeile auf 53BP1 Foci (grüne Fluoreszenz, anti-53BP1-Erstantikörper, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 markierter Zweitantikörper).



#### Abbildung 4-17: Übersichtsaufnahmen

*Exemplarische Gegenüberstellung von unbestrahltem Normalgewebe der C57 Linie (A) und mit 20 Fraktionen zu je 100 mGy fraktioniert bestrahltem Gewebe (entnommen nach 72 Stunden) einer SCID-Maus (B) als Übersichtsaufnahmen. Vor einem blauen DAPI-Hintergrund, welcher die Zellkerne markiert, weisen die Pfeile auf 53BP1 Foci (grüne Fluoreszenz, anti-53BP1-Erstantikörper, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 markierter Zweitantikörper).*

#### 4.5. Proliferation, Apoptose und inflammatorische Reaktion

Neben der Auswertung strahleninduzierter 53BP1 Foci wurde das Lungengewebe anhand ausgewählter Präparate und Proteine auf Proliferation (Ki-67), Apoptose (PARP-1) und Zytokinausschüttung (TGF- $\beta$ 1) untersucht. Jeweils zwei unabhängig geschnittene und gefärbte Präparate der Mauslinien C57 und ATM<sup>-/-</sup> wurden für einzelne Messpunkte betrachtet: Die unbestrahlte Kontrolle sowie 20x 100 mGy mit Organentnahme nach 24 und 72 Stunden (vgl. Ki-67: Abb. 4-18, S. 74, PARP-1: Abb. 4-19, S. 75 und TGF- $\beta$ 1 Abb. 4-20, S. 78). Dieses Vorgehen ermöglicht die Gegenüberstellung einer reparaturprofizienten (C57) und einer reparaturdefizienten Mauslinie (ATM<sup>-/-</sup>). Ferner wurden als Referenzpunkte Präparate von Tieren ausgewertet, welche einmalig mit 10 Gy bestrahlt wurden. Bei diesen Tieren erfolgte die Organentnahme nach 24 Stunden, 72 Stunden und acht Wochen.

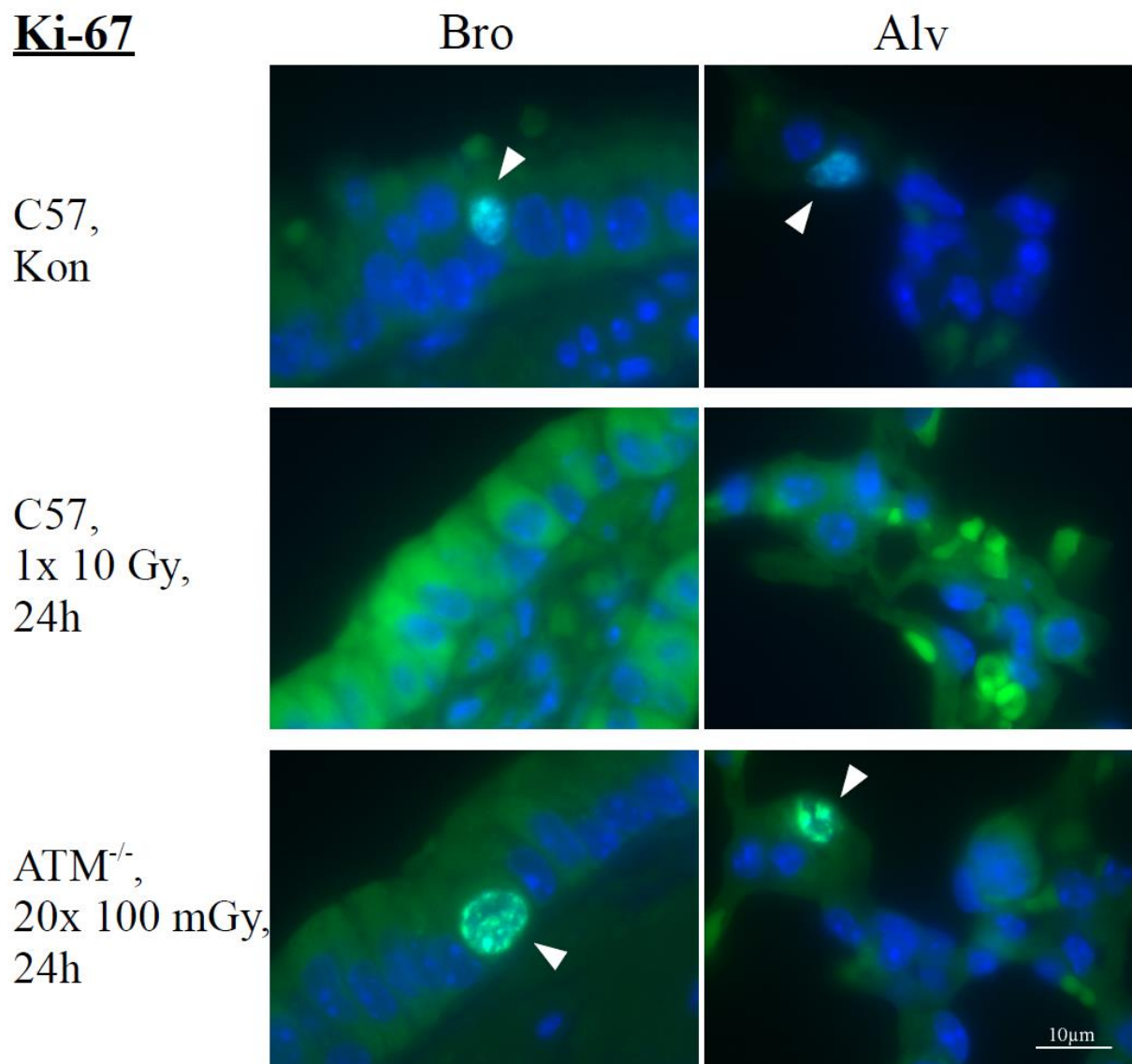
Ki-67 wurde 1983 nachgewiesen als ein in sämtlichen menschlichen Zellen zu allen aktiven Phasen des Zellzyklus nachweisbares Antigen (Gerdes et al., 1983). Obwohl es sich beim Lungengewebe nicht um ein "high turnover-tissue" handelt, werden Pneumozyten alle 20 bis 35 Tage erneuert (Gross, 1977), und etwa 1% der Bronchialepithelzellen treten innerhalb von 24 Stunden in die S-Phase des Zellzyklus ein (Stripp and Reynolds, 2008). Dementsprechend können für die C57 Mauslinie sowohl in den unbestrahlten Kontrollen als auch in den Präparaten der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung Ki-67 positive Zellen gefunden werden. Abbildung 4-18 (S. 74) zeigt Beispiele von Gewebeschnitten, die mit einem Antikörper gegen Ki-67 gefärbt wurden. In den Präparaten, die Ki-67 positive Zellen aufweisen, liegt die Anzahl dieser positiven Zellen mit fluoreszierendem Nucleoplasma in Bronchialepithel und Alveolarraum bei maximal einer positiven Zelle pro Gesichtsfeld (600-fache Vergrößerung, Ausschnitt, Abb. 4-18, S. 74, C57). Die Betrachtung der Präparate der reparaturdefizienten ATM<sup>-/-</sup> Mauslinie ergibt für die unbestrahlte Kontrolle allerdings kein positives Signal (Bildaten nicht gezeigt). Nach fraktionierter Bestrahlung mit 20x 100 mGy entspricht das Signal nach 72 Stunden dem der fraktioniert bestrahlten C57 Tiere (Bildaten nicht gezeigt). 24 Stunden nach Bestrahlung (20x 100 mGy) ergibt sich bei den reparaturdefizienten Tieren eine tendenziell geringfügig höhere Anzahl Ki-67 positiver Zellen in Bronchialepithel und Alveolarraum (Abb. 4-18, S. 74, ATM<sup>-/-</sup>) als bei den reparaturprofizienten Linien.

In den Präparaten der reparaturprofizienten Tiere wird am ehesten die physiologische Proliferation der Zellen des Lungengewebes abgebildet. Da Ki-67 nach Zellschädigung mit



Anstieg von p21 sowie p53 und damit dem schadensinduzierten Zellzyklusarrest vermehrt nachweisbar ist (Scholzen and Gerdes, 2000), ist davon auszugehen, dass das tendenziell stärkere Signal der reparaturdefizienten Tiere zum frühen Entnahmezeitpunkt auf eine Kombination aus Genotyp, physiologischer Proliferation und Schadensantwort zurückzuführen ist. Diese Beobachtung wird unterstrichen durch die Auswertung der mit höheren Dosen bestrahlten C57 Tiere (1x 10 Gy, Abb. 4-18), welche ein tendenziell schwächeres Signal als die niedrigdosisbestrahlte reparaturdefiziente Mauslinie zeigen.

### Ki-67



**Abbildung 4-18: Übersicht Ki-67 in Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen**

Immunfluoreszenzaufnahmen von Bronchialepithelzellen („Bro“) und Alveolarzellen („Alv“) von C57 und ATM<sup>-/-</sup> Tieren mit immunologischer Markierung von Ki-67. Vor blauem DAPI-Hintergrund grüne Fluoreszenz im Zellkern (anti-Ki-67-Erstantikörper, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 markierter Zweitantikörper).

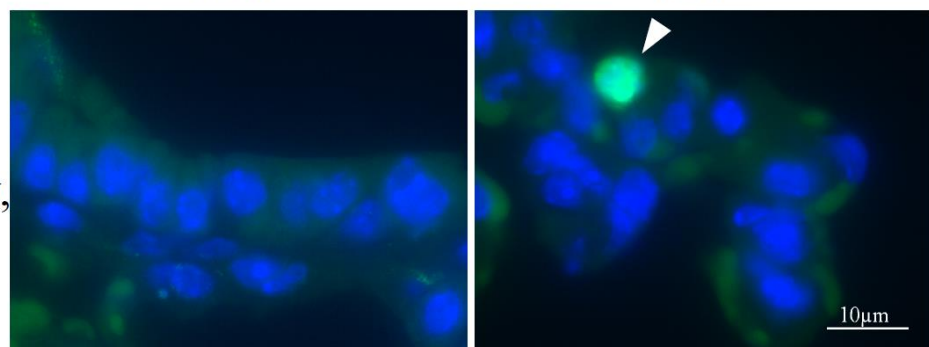
Die Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1 (PARP-1), wird im Rahmen der zellulären Schadensantwort bei DNA-Schäden aktiviert, bindet an Bruchregionen und hängt an die Bruchenden Poly-ADP-Ribose-Polymere an (Pagano et al., 2007). Kommt es nach einer massiven Zellschädigung zu einer besonders starken Aktivierung von PARP-1, so führt dies über den Verbrauch von ATP zu einer vollständigen Erschöpfung der Energiereserven der Zelle und so zur Apoptose (Enkhbaatar and Traber, 2004). Während der Apoptose wird verbleibendes PARP-1 durch Caspase3 gespalten und ist in dieser Form mit dem in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper nachweisbar. Ein mit maximal einer Alveolarzelle pro Gesichtsfeld (600-fache Vergrößerung) allenfalls tendenziell positives PARP-1 Signal ergibt sich lediglich in den Alveolarzellen der mit 20x 100 mGy, 72 Stunden bestrahlten reparaturdefizienten  $ATM^{-/-}$  Mauslinie (Abb. 4-19). Im Bronchialepithel der gleichen mit 20x 100 mGy (72 Stunden) bestrahlten Mauslinie ergibt sich kein positiver Nachweis für PARP-1 (Abb. 4-19). Auch bei der C57 Mauslinie findet sich in keinem der untersuchten Präparate ein positives Signal in den Bronchialepithelzellen (Bildaten nicht gezeigt), was auf eine erhöhte Strahlensensibilität der Alveolarzellen hindeuten könnte, ähnlich den Ergebnissen der 53BP1-Analyse. Wie die hochdosierte Einzelbestrahlung der C57 Mäuse (1x 10 Gy) führt die fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung damit weder bei reparaturprofizienten noch bei reparaturdefizienten Tieren zu einem mit dem Apoptosemarker PARP-1 nachweisbaren Zelluntergang.

## PARP-1

Bro

Alv

$ATM^{-/-}$ ,  
20x 100 mGy,  
72h



**Abbildung 4-19: Übersicht PARP-1 in Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen**

Immunfluoreszenzaufnahmen von Bronchialepithelzellen („Bro“) und Alveolarzellen („Alv“) von  $ATM^{-/-}$  Tieren mit immunologischer Markierung von PARP-1. Vor blauem DAPI-Hintergrund grüne Fluoreszenz im Zellkern (anti-PARP-1-Erstantikörper, Alexa Fluor® 488 markierter Zweitantikörper).

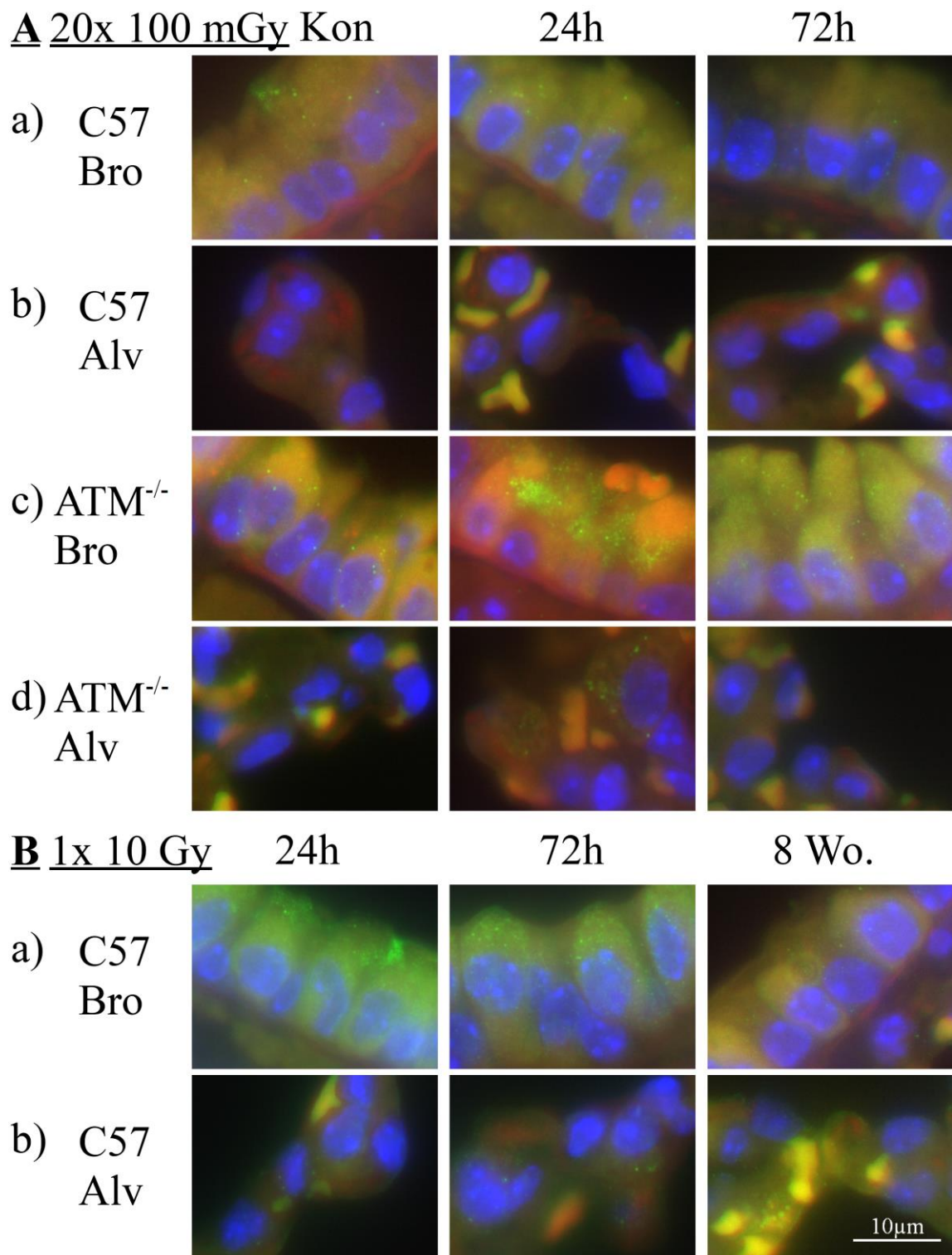
Die Schlüsselrolle von TGF- $\beta$  im Rahmen der inflammatorischen Reaktion des Lungengewebes nach Bestrahlung ist unter Punkt 2.5. (Folgen der pulmonalen Bestrahlung, S. 26 ff.) beschrieben. Weil eine messbare Ausschüttung von TGF- $\beta$  bei reparaturprofizienten Tieren nur im Bereich von mehreren Gy Bestrahlungsdosis beschrieben ist, wurde eine Färbung analog zu Ki-67 und PARP-1 durchgeführt mit der Fragestellung, ob TGF- $\beta$  bei niedrigen Bestrahlungsdosen überhaupt nachweisbar ist und ob möglicherweise Unterschiede zwischen der C57 und der ATM<sup>-/-</sup> Linie erkennbar sind. Hierzu wurden Präparate der mit einmalig 10 Gy bestrahlten C57 Tiere als Referenzen mitbetrachtet. Da die Ausschüttung von TGF- $\beta$  nach Bestrahlung zweigipflig verläuft und Maxima im Bereich von sechs Stunden bis 24 Stunden sowie im Bereich von zwei Wochen bis acht Wochen nach Bestrahlung zu finden sind (Rübe et al., 2000), wird neben den Entnahmezeitpunkten nach 24 und 72 Stunden ein Zeitpunkt nach acht Wochen untersucht.

Abbildung 4-20 (S. 78) zeigt die Aufnahmen der TGF- $\beta$ 1 Färbung in Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen. Im oberen Teil (A, 20x 100 mGy) sind den unbestrahlten Kontrollen der Linien C57 und ATM<sup>-/-</sup> die Ergebnisse nach fraktionierter Bestrahlung mit 20x 100 mGy und frühem (24h) sowie spätem (72h) Entnahmezeitpunkt gegenübergestellt. Bei der Untersuchung der niedrigdosisbestrahlten C57 Tiere fällt zunächst auf, dass die Alveolarzellen weder in der unbestrahlten Kontrolle noch nach Bestrahlung ein positives Signal für TGF- $\beta$ 1 aufweisen (Abb. 4-20, S. 78, A, b)). In den Bronchialepithelzellen hingegen finden sich zu allen Messpunkten diffuse punktförmige Fluoreszenzen, am häufigsten in der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 4-20, S. 78, A, a)). Im mit „B 1x 10 Gy“ überschriebenen unteren Teil sind Aufnahmen der einmalig mit 10 Gy bestrahlten Gewebsschnitte der C57 Tiere abgebildet. Auch hier wird unterschieden zwischen frühem (24h) und spätem (72h) Entnahmezeitpunkt. Hinzu kommt als dritter Messpunkt die Organentnahme nach acht Wochen. Beim Vergleich der Signale in der unbestrahlten C57 Kontrolle (Abb. 4-20, S. 78, A, a), Kon) mit den Referenzproben (1x 10 Gy, Abb. 4-20, S. 78, B, a)) ergibt sich in den Bronchialepithelzellen kaum ein Unterschied. In den Alveolarzellen findet sich in den Kontrollen und nach Niedrigdosisbestrahlung kein Signal (Abb. 4-20, S. 78, A, b)). In den Gewebsschnitten der mit 1x 10 mGy bestrahlten C57 Tiere (Abb. 4-20, S. 78, B, b)) zeigen die Alveolarzellen für den 24 Stunden Zeitpunkt kein Signal, für den 72 Stunden Zeitpunkt ein sehr schwaches und acht Wochen nach Bestrahlung ein nur unwesentlich stärkeres Signal.

Die unbestrahlten Kontrollen, das Bronchialepithel nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung (20x 100 mGy) und die Referenzproben (1x 10 mGy) sind damit hinsichtlich der TGF- $\beta$ 1 Ausschüttung vergleichbar.

Die unbestrahlte Kontrolle der ATM<sup>-/-</sup> Mauslinie zeigt wie auch die Zellen nach fraktionierter Bestrahlung bei Entnahme zum späten Zeitpunkt (20x 100 mGy, 72 Stunden) im Bronchialepithel ein schwaches, mit den C57 Proben vergleichbares Signal (Abb. 4-20, S. 78, A, c)). Demgegenüber ergibt sich bei der ATM<sup>-/-</sup> Mauslinie im Bronchialepithel (20x 100 mGy) 24 Stunden nach letztmaliger Bestrahlung (Abb. 4-20, S. 78, A, c)) das im Rahmen dieser Untersuchung stärkste nachweisbare Signal, welches auch dasjenige der mit 1x 10 Gy bestrahlten C57 Tiere (Abb. 4-20, S. 78, B, a)) deutlich übertrifft. In den Alveolarzellen findet sich nach fraktionierter Bestrahlung zum frühen Entnahmezeitpunkt (24 Stunden) ein stärkeres Signal als zum späten Zeitpunkt (72 Stunden), welches aber nicht das Niveau der Bronchialepithelzellen erreicht.

Damit besteht offenbar auch auf der Ebene der TGF- $\beta$ 1-Ausschüttung tendenziell ein Unterschied zwischen reparaturprofizienten (C57) und reparaturdefizienten (ATM<sup>-/-</sup>) Mäusen, insbesondere zum frühen Entnahmezeitpunkt nach 20x 100 mGy (Abb. 4-20, S. 78, A, a) bis d)). Allein an diesem Zeitpunkt und bei dieser Mauslinie findet sich zudem in den Alveolarzellen ein schwaches Signal nach Niedrigdosisbestrahlung. Unabhängig von der betrachteten Mauslinie besteht damit außerdem ein Unterschied zwischen den Bronchialepithelzellen und den Alveolarzellen hinsichtlich des detektierbaren TGF- $\beta$ 1-Signals.



**Abbildung 4-20: Übersicht TGF-β1 in Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen**

Immunfluoreszenzaufnahmen von Bronchialepithelzellen („Bro“) und Alveolarzellen („Alv“) von C57 und ATM<sup>-/-</sup> Tieren mit Markierung von TGF-β1. Die ersten vier Zeilen (A) zeigen Kontrolle („Kon“) sowie fraktionierte Bestrahlung mit 20x 100 mGy bei Organentnahme nach 24 oder 72 Stunden, die letzten beiden Zeilen (B) die Referenzproben (1x 10 Gy). Punktförmige grüne Fluoreszenz vor blauem DAPI-Hintergrund, welcher die Zellkerne markiert (anti-TGF-β1-Erstantikörper, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 markierter Zweitantikörper).

## **5. Diskussion**

### **5.1. Fragestellung und Ergebnisse**

Anhand von Maus-Tiermodellen wurden die Auswirkungen einer Niedrigdosisbestrahlung (10 bis 100 mGy Einzeldosis) auf molekularer Ebene in den Epithel- und Alveolarzellen des Lungengewebes untersucht.

Im Einzelnen wurden die Mauslinien C57BL/6N und  $ATM^{WT}$ , eine heterozygote  $ATM^{+/-}$  Linie, eine homozygote ATM-defiziente Linie ( $ATM^{-/-}$ ) und eine SCID Mauslinie betrachtet, um die Folgen der Niedrigdosisbestrahlung bei verschiedenem genetischen Hintergrund beurteilen zu können. Die C57 und ATM-Wildtyp Linien sind reparaturprofizient und zeigen primär keine Einschränkung der Reparatur von DNA-Schäden. Die  $ATM^{-/-}$  und SCID Linien sind hingegen reparaturdefizient und weisen einen Reparaturdefekt auf. Zwischen diesen reparaturprofizienten und reparaturdefizienten Mauslinien ist die heterozygote  $ATM^{+/-}$  Linie einzuordnen.

Ausgangs- und Referenzwerte der Untersuchungen waren stets die unbestrahlten Kontrollen der jeweiligen Mauslinie. Mit den aus den unbestrahlten Kontrollen erhobenen Referenzwerten wurden Einzelbestrahlungen (10 oder 100 mGy Einzeldosis) verglichen bei anschließender Organentnahme nach 0,5 sowie 24 und 72 Stunden. In einem weiteren Ansatz wurden fraktionierte Bestrahlungsserien mit 10 oder 100 mGy Einzeldosis durchgeführt und die Folgen nach 24 oder 72 Stunden hinsichtlich verbleibender DNA-Schäden ebenfalls anhand von fluoreszenzmikroskopischer Darstellung von 53BP1 Foci untersucht. Für alle Ansätze wurden die Bronchialepithelzellen des einschichtigen prismatischen Epithels der Bronchioli sowie die Zellen der Ductus alveolares auf strahlungsinduzierte 53BP1 Foci hin analysiert. Ausgewertet wurde dabei jeweils die Anzahl der Foci pro Einzelzelle.

Bereits in den unbestrahlten Kontrollen liegen die Werte dieser Foci sowohl in Epithel- als auch Alveolarzellen der C57 Mauslinie signifikant niedriger als in denjenigen der  $ATM^{WT}$ ,  $ATM^{-/-}$  und SCID Mauslinien. Die Anzahl der Foci in den untersuchten Zellen von unbestrahlten SCID Tieren ist dagegen signifikant höher als in den Zellen der anderen betrachteten Mauslinien.

Darüber hinaus zeigen alle untersuchten Mauslinien in den Alveolarzellen eine deutlich niedrigere Anzahl an 53BP1 Foci als in den Bronchialepithelzellen. In den unbestrahlten Kontrollen ist dieser Unterschied für C57, ATM<sup>WT</sup> und SCID statistisch signifikant.

Bei C57 Tieren ergibt sich bei Organentnahme 0,5 Stunden nach einmaliger Bestrahlung bereits mit 10 mGy eine signifikant höhere Anzahl an 53BP1 Foci sowohl in Epithel- als auch Alveolarzellen. Während aber im Bereich der Alveolarzellen die Anzahl der Foci bereits nach 24 Stunden wieder auf ein den unbestrahlten Kontrollen vergleichbares Niveau abgefallen ist, findet sich ein annähernd vergleichbarer Rückgang in den Bronchialepithelzellen erst nach 72 Stunden. Alveolarzellen scheinen somit über eine vergleichsweise geringere Strahlensensibilität, verbunden mit einer schnelleren Reparatur, zu verfügen.

Ergänzend wurde eine Einzeitbestrahlung mit 100 mGy Einzeldosis bei Tieren der C57 Linie durchgeführt. Obwohl die Anzahl der Foci in den Bronchialepithelzellen 0,5 Stunden nach dieser Bestrahlung mit 100 mGy um das 3,3-Fache höher war als nach Bestrahlung mit 10 mGy, ist die Zahl der Foci 24 Stunden nach Bestrahlung mit 10 und 100 mGy auf ein vergleichbares Niveau abgesunken: 0,220 Foci pro Zelle (10 mGy) und 0,238 Foci pro Zelle (100 mGy). Nach höherer Einzeldosis (100 mGy) bei Einzeitbestrahlung scheint es somit in den Bronchialepithelzellen zu einer kompensatorisch intensiveren Reparatur als bei niedrigerer Einzeldosis (10 mGy) zu kommen. In den Alveolarzellen zeigt sich demgegenüber eine weniger deutliche Reduktion der Foci: Kommt es bei einer Einzelbestrahlung mit 100 mGy zu einer vergleichbaren Zunahme um den Faktor 3,1, so sinkt die Zahl der Foci auch nach 72 Stunden nicht auf das Niveau der Kontrolle zurück: Die offenbar geringere Sensibilität der Alveolarzellen gegenüber Niedrigdosisbestrahlung geht also mit zunehmender Einzeldosis möglicherweise mit einer niedrigeren Effizienz hinsichtlich der Reparatur der induzierten Strahlenschäden einher.

Neben den C57 Tieren wurden mit Ausnahme des ATM<sup>WT</sup> auch Tiere der anderen Mauslinien einmalig mit 100 mGy Einzeldosis bestrahlt und untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die heterozygote ATM<sup>+/-</sup> Linie sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach Einzeitbestrahlung, weder bei 0,5 Stunden noch bei 24 oder 72 Stunden, signifikant von der C57 Linie unterscheidet. Vergleichsweise höhere Fociwerte in beiden betrachteten Zellpopulationen zeigt die ATM<sup>-/-</sup> Linie zu den Entnahmezeitpunkten nach 24 und 72 Stunden, dies auch in der unbestrahlten Kontrolle. Auffallend ist jedoch, dass sich bei den ATM-defizienten Tieren (ATM<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu den C57 und ATM<sup>+/-</sup> Tieren eine geringere Anzahl an Foci in beiden betrachteten Zelltypen zum 0,5 Stundenzeitpunkt findet.

Dieser bei den reparaturdefizienten  $ATM^{-/-}$  Tieren unerwartete Wert lässt sich dadurch begründen, dass wegen des Fehlens eines funktionsfähigen ATM-Genprodukts die Reparaturfunktionen vermindert sind und Foci langsamer oder in geringerer Anzahl gebildet werden. Da ATM 53BP1 phosphoryliert und damit aktiviert, ist zu erwarten, dass bei ATM-defizienten Tieren initial weniger 53BP1 Foci aufzufinden sind. Im weiteren Verlauf sollte die Anzahl der Foci ansteigen, da ATM zwar an der Aktivierung von 53BP1 beteiligt ist, aber keine Grundvoraussetzung darstellt und 53BP1 so auch in ATM-defizienten Zellen aktiviert wird. Initial zeigt sich damit durch das Fehlen von ATM eine verzögerte Bildung von 53BP1 Foci. Aufgrund der genetisch determinierten Reparaturdefizienz der untersuchten Mauslinie sollte allerdings auch die Rückbildung der Foci stark eingeschränkt sein. Diese Erklärung bestätigt sich anhand der Ergebnisse zu den 24 und 72 Stundenmesspunkten. Während in den  $ATM^{+/-}$  Tieren zu diesen Zeitpunkten eine deutliche Abnahme der Zahl der Foci feststellbar ist, zeigen die ATM-defizienten Tiere nun weiter erhöhte Werte. Da die Bildung von 53BP1 Foci unter anderem abhängig von ATM erfolgt (Harding and Bristow, 2012), ist es wahrscheinlich, dass die tatsächlich verursachte DNA-Schädigung noch um ein Vielfaches höher ist, sie aber aufgrund der ATM-abhängigen Bildung von 53BP1 Foci für den Betrachter nicht sichtbar wird (Lukas et al., 2011). Die zu den späteren Zeitpunkten (24 und 72 Stunden) erhöhten Werte könnten daher auf zwei Wegen zustande kommen, die sich gegenseitig nicht ausschließen und vermutlich zusammenwirken: Durch eine verlangsamte Bildung der 53BP1 Foci in geringerer Anzahl – gezwungenermaßen unabhängig von ATM (Zgheib et al., 2005) - und zugleich eine verlangsamte Kompensation der induzierten DNA-Schäden wegen des Reparaturdefekts ergeben sich bei der ATM-defizienten Mauslinie deutlich höhere Werte zu den 24 und 72 Stundenmesspunkten.

In der zweiten untersuchten reparaturdefizienten Linie, den SCID Mäusen, zeigen sich bei Einzelbestrahlung zu allen Zeitpunkten signifikant höhere Werte als bei allen zuvor untersuchten Tieren einschließlich der ATM-defizienten Tiere. Die signifikant höheren Werte in den Zellen der SCID Tiere sprechen somit für die Hypothese, dass auch bei den reparaturdefizienten  $ATM^{-/-}$  Tieren gravierende DNA-Schäden entstanden sind, welche jedoch infolge des fehlenden ATM-Genprodukts nicht in vollem Ausmaß zu detektieren waren.



Zusammenfassend konnte im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden, dass in Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen von reparaturdefizienten Tieren ( $ATM^{-/-}$  und SCID) im Vergleich zu reparaturprofizienten Tieren (C57) sowie Tieren mit geringfügiger Einschränkung der Immunkompetenz ( $ATM^{+/-}$ ) DNA-Schäden, die nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis auftraten, in geringerem Maße repariert werden. Dabei zeigte sich auch, dass Alveolarzellen im Vergleich zu Bronchialepithelzellen vergleichsweise weniger 53BP1 Foci zu akkumulieren scheinen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen Tiere aller 5 Linien einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 oder 100 mGy Einzeldosis unterzogen wurden. Anschließend wurden die Bronchialepithelzellen und Alveolarzellen auf die Zahl der detektierbaren Foci untersucht. Bei Zellen der C57 Linie fällt nach fraktionierter und Einzeit-Bestrahlung mit 10 und 100 mGy Einzeldosis (24 Stunden) auf, dass zu allen Zeitpunkten signifikant höhere Fociwerte detektiert werden konnten als in der nicht bestrahlten Kontrolle. Bei der Bestrahlung mit 10 mGy Einzeldosis gilt dies auch für den späteren Zeitpunkt (72 Stunden). Die einzige Ausnahme dabei bildet der Messpunkt nach einmaliger Bestrahlung mit 10 mGy und Organentnahme nach 72 Stunden: Hier findet sich kein signifikanter Unterschied zur unbestrahlten Kontrolle. Dies könnte bedeuten, dass die DNA-Reparatursysteme offenbar in der Lage sind, innerhalb von 72 Stunden die durch einmalige Bestrahlung mit 10 mGy induzierten Strahlenschäden zu neutralisieren. Betrachtet man allerdings die Zahlenwerte ohne statistische Auswertung, so besteht ein Unterschied zwischen diesen beiden Zeitpunkten (Kontrolle und 1x 10 mGy, 72 Stunden) im Bronchialepithel, welcher lediglich nicht signifikant ist: 0,118 Foci pro Zelle in der Kontrolle stehen 0,169 Foci pro Zelle nach 1x 10 mGy, 72 Stunden gegenüber. Daher lässt sich aus diesen Ergebnissen ebenfalls die Tendenz zur Akkumulation von 53BP1 Foci nach niedrigdosierter Bestrahlung erkennen. Erhöht man die Anzahl der Fraktionen, so wird nach Applikation von 30 Fraktionen zu je 10 mGy zum 24 Stundenmesspunkt annähernd der Fociwert der Induktion (einmalige Bestrahlung mit 10 mGy und Organentnahme 0,5 Stunden nach Bestrahlung) erreicht. Trotz eines Differenzbetrags von 0,051 besteht kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Ergebniswerten. Dreißig Fraktionen zu je 10 mGy erzeugen somit 24 Stunden nach Bestrahlungsende ein vergleichbares Ergebnis wie eine Fraktion zu 10 mGy nach 0,5 Stunden. Wird die Anzahl der applizierten Fraktionen noch weiter erhöht, so ergibt sich nach 40 Fraktionen eine nochmals größere Anzahl an Foci, welche etwa auf gleichem Niveau mit derjenigen nach 50 Fraktionen zu je 10 mGy liegt. Anders verhält es

sich bei der fraktionierten Bestrahlung des Bronchialepithels mit 100 mGy Einzeldosen: Hierbei ergibt sich für die Induktion (1x 100 mGy, Entnahme nach 0,5 Stunden) eine Focianzahl, die auch durch Applikation von bis zu 50 Fraktionen bei Weitem nicht mehr erreicht wird.

Vergleicht man nun die Ergebnisse im Bronchialepithel nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 und 100 mGy, so ergeben sich zwischen den unterschiedlichen Einzeldosen lediglich für die Messpunkte nach Applikation von 20 und 30 Fraktionen signifikante Unterschiede. Dies legt den Schluss nahe, dass bei niedrigerer Fraktionenanzahl (1x und 10x, 24 und 72 Stunden) und damit niedrigerer Gesamtbelastung eine effektivere Reparatur erfolgt. Erst ab etwa 20 bis 30 applizierten Fraktionen überwiegt tendenziell der Effekt der höheren Einzeldosis im Verhältnis 100 zu 10 mGy. Dass dieser Effekt nach Applikation von 40 und 50 Fraktionen nicht mehr nachweisbar ist oder nicht noch deutlicher ausfällt, könnte durch eine Adaptation der Reparaturmechanismen bedingt sein.

Anders als Bronchialepithelzellen weisen die Alveolarzellen der C57 Tiere nach einmaliger Bestrahlung mit 10 mGy nur bei der Induktion (0,5 Stunden) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. Nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 mGy Einzeldosis findet sich jedoch zu allen Zeitpunkten eine signifikant höhere Anzahl an Foci als in der unbestrahlten Kontrolle. Wie in den Bronchialepithelzellen ist auch in den Alveolarzellen mit zunehmender Anzahl an Fraktionen eine zunehmende Fociakkumulation zu beobachten. Allerdings ist in den Alveolarzellen die Anzahl der Foci signifikant niedriger als in den Bronchialepithelzellen zu den entsprechenden Messpunkten. Dieses Ergebnis spricht für eine vergleichsweise niedrigere Tendenz zur Fociakkumulation in den Alveolarzellen.

Bei Einzeitbestrahlung mit 100 mGy Einzeldosis findet sich nicht nur in der Induktion (0,5 Stunden), sondern auch zum Entnahmezeitpunkt nach 24 Stunden eine signifikant höhere Anzahl an 53BP1 Foci als in der unbestrahlten Kontrolle. Nach fraktionierter Bestrahlung der Alveolarzellen mit 100 mGy Einzeldosis zeigen sich zu allen untersuchten Messpunkten signifikant höhere Focizahlen als nach Bestrahlung mit 10 mGy Einzeldosis. Wie in den Bronchialepithelzellen wird auch in den Alveolarzellen eine mit der Induktion (1x 100 mGy, Entnahme nach 0,5 Stunden) vergleichbare Focianzahl durch fraktionierte Bestrahlung nicht erreicht, obwohl die Anzahl der induzierten Foci mit zunehmender Anzahl an Fraktionen ebenfalls ansteigt.

Daraus lässt sich folgern, dass trotz des Unterschiedes der Einzeldosis im Verhältnis 1:10 bei C57 Mäusen eine steigende Anzahl an applizierten Fraktionen (unabhängig von der Einzeldosis) insgesamt einen zunehmend ähnlichen Effekt im Lungengewebe hinsichtlich verbleibender 53BP1 Foci hat. Möglicherweise ist weniger die Einzeldosis als vielmehr die Anzahl der applizierten Fraktionen maßgeblich für die verbleibenden DNA-Schäden.

Auch diese Untersuchungen, die fraktionierte Bestrahlung mit 10 und 100 mGy Einzeldosis, wurden an den reparaturdefizienten  $ATM^{-/-}$  und SCID Mäusen sowie an den  $ATM^{+/-}$  Tieren und den reparaturprofizienten  $ATM^{WT}$  Tieren durchgeführt.

Sowohl bei Organentnahme nach 24 Stunden als auch nach Entnahme nach 72 Stunden zeigt sich dabei, dass zwischen  $ATM^{WT}$  und  $ATM^{+/-}$  keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl detektierter 53BP1 Foci bestehen. Diese Beobachtung gilt sowohl für die fraktionierte Bestrahlung mit 10 als auch mit 100 mGy Einzeldosis. Dagegen ist die Anzahl der Foci in Zellen von  $ATM$ -defizienten Tieren zu allen Zeitpunkten signifikant höher als in Zellen von Tieren, welche heterozygot für die  $ATM$ -Mutation ( $ATM^{+/-}$ ) sind oder keine Mutation im  $ATM$ -Gen tragen ( $ATM^{WT}$ ). Zu allen Zeit- und Messpunkten liegen die Ergebnisse der  $ATM^{WT}$  und  $ATM^{+/-}$  Tiere näher beieinander als die der  $ATM^{+/-}$  und  $ATM^{-/-}$  Tiere. Offensichtlich wirkt sich der heterozygote Genotyp im Tiermodell nicht auf die Strahlensensibilität aus. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Untersuchungen gemacht: So befanden Kato et al., dass sich nach Bestrahlung mit 1 Gy und darauf folgender Analyse nach 12 oder 24 Stunden kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Reparaturkinetik in menschlichen Fibroblasten nachweisen lässt, die das intakte  $ATM$ -Genprodukt ( $ATM^{WT}$ ) oder die heterozygote Mutation ( $ATM^{+/-}$ ) exprimieren (Kato et al., 2006).

Die reparaturdefizienten  $ATM^{-/-}$  und SCID Tiere zeigen 24 Stunden nach Bestrahlungsende bei 100 mGy Einzeldosis in beiden untersuchten Zelltypen eine annähernd ähnliche und erhöhte Focianzahl, die sich deutlich und statistisch signifikant von derjenigen der übrigen Mauslinien abhebt. Die Ergebnisse, die 72 Stunden nach letztmaliger Bestrahlung erhoben wurden, unterstreichen diese Beobachtung. Diese Werte zeigen zusätzlich die geringfügige Tendenz einer höheren Anzahl an 53BP1 Foci bei den SCID Mäusen. Dabei liegt das Niveau der Focizahlen von  $ATM^{-/-}$  und SCID Tieren bereits nach 10 Fraktionen zu je 100 mGy (72 Stunden) im Bereich von durchschnittlich einem Focus pro Epithelzelle. In den Alveolarzellen wird der Wert von durchschnittlich einem Focus pro Zelle in beiden reparaturdefizienten Mauslinien erst nach 20 Fraktionen erreicht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass durchaus bis zu vier Foci pro Einzelzelle im Bronchialepithel und bis zu

zwei Foci pro Alveolarzelle gefunden werden können. Damit ergibt sich für  $ATM^{-/-}$  und SCID Tiere eine ähnliche Einschränkung der Reparaturkapazität bei genetisch unterschiedlich bedingter Reparaturdefizienz.

In Zusammenschau der Ergebnisse der einmaligen Niedrigdosisbestrahlung und der fraktionierten Bestrahlung jeweils mit Einzeldosen von 10 oder 100 mGy ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die C57 Mauslinie im Hinblick auf Reparaturvorgänge in der Lunge am wenigsten eingeschränkt und strahlensensibel ist. Eine geringfügig höhere Strahlensensibilität zeigt tendenziell die  $ATM^{WT}$  Mauslinie, die sich als Wildtyp hinsichtlich des genetischen Profils nur geringfügig von der C57 Mauslinie unterscheidet. Die für die ATM-Mutation heterozygote  $ATM^{+/-}$  Mauslinie unterscheidet sich allenfalls marginal von der  $ATM^{WT}$  Linie. Offensichtlich reicht das vorhandene intakte Allel aus, um einen Phänotyp aufrechtzuerhalten, welcher annähernd den Wildtyp-Tieren entspricht. Demgegenüber stehen die  $ATM^{-/-}$  und SCID Linien, welche beide im Hinblick auf die untersuchten Bronchialepithel- und Alveolarzellen einen auch im Ausmaß vergleichbaren Reparaturdefekt aufweisen. Im Vergleich zu den zuvor genannten Linien sind diese Tiere entsprechend deutlich strahlensensibler. In allen untersuchten Mauslinien kommt es mit zunehmender Anzahl applizierter Fraktionen zu einer ansteigenden Akkumulation von 53BP1 Foci. Dies ist am deutlichsten bei der reparaturprofizienten Mauslinie C57 nachvollziehbar, da diese fraktioniert mit 10, 20, 30, 40 und 50 Einzeldosen zu 10 oder 100 mGy bestrahlt wurde. Auch bei den reparaturprofizienten  $ATM^{WT}$  und den reparaturdefizienten  $ATM^{-/-}$  Tieren, bei denen lediglich mit 10 und 20 Fraktionen bestrahlte Tiere untersucht wurden, findet sich nach 20 Fraktionen eine signifikant höhere Anzahl an 53BP1 Foci als nach 10 Fraktionen. Bei den  $ATM^{+/-}$  und SCID Mäusen deuten die erhaltenen Ergebnisse ebenfalls auf eine mit zunehmender Fraktionenzahl ansteigende Anzahl an 53BP1 Foci hin, allerdings bestehen hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Applikation von 10 und 20 Fraktionen. In Anlehnung an die Ergebnisse der C57 Linie ist aber zu erwarten, dass eine Akkumulation von 53BP1 Foci nach Bestrahlung mit mehr als 20 Fraktionen auch in diesen Mauslinien noch deutlicher hervortreten würde. Bei den  $ATM^{-/-}$  und SCID Mauslinien wäre allerdings aufgrund des Reparaturdefekts der Zelltod eine mögliche Folge einer Applikation weiterer Fraktionen.

## 5.2. Methodik

In dieser Arbeit wurden zwei Zellpopulationen der Maus auf Strahlenschäden untersucht, die Zellen des Bronchialepithels der distalen Bronchioli und die Zellen des Alveolarraumes.

Dafür wurden 37.698 Bronchialepithelzellen und 62.536 Alveolarzellen ausgewertet.

Bei den ausgewerteten Bronchialepithelzellen handelte es sich stets um Zellen des einschichtigen prismatischen Epithels der Bronchioli, welches neben vereinzelt Clara-Zellen sowie wenigen endokrinen und serösen Zellen aus einigen kinzilientragenden Flimmerzellen, aber auch unbewimperten Epithelzellen besteht (Welsch and Sobotta, 2006). Der Aufbau des einschichtigen Epithels erleichtert die Auswertung, da alle Zellen auf der Basalmembran aufsitzen und somit eine Leitstruktur bei der Auszählung vorgegeben ist. Während das Bronchialepithel der Bronchioli im Wesentlichen aus Flimmerzellen besteht, finden sich im Alveolarraum gleich mehrere Zelltypen: So bedecken die Pneumozyten Typ I rund 90% der Alveolaroberfläche. Als Stammzellen für die Pneumozyten Typ I fungieren die Pneumozyten Typ II, welche zwar nur etwa 10% der Oberfläche einer Alveole einnehmen, aber in einer höheren Gesamtzahl als die Pneumozyten Typ I pro Alveole vorkommen (Welsch and Sobotta, 2006). Weitere Zellen im Alveolarraum sind die Alveolarmakrophagen als Zellen der unspezifischen Immunabwehr. Aufgrund dieser Vielfalt (und fehlender Leitstrukturen) gingen in die hier durchgeführte Untersuchung und quantitative Auswertung der Alveolarzellen die genannten Zelltypen ohne weitere Differenzierung mit ein.

Beim Vergleich der Zellen des Epithels und des Alveolarraumes müssen zudem unterschiedliche Zellvolumina berücksichtigt werden: So weisen die Alveolarzellen gegenüber den Bronchialepithelzellen zumeist ein kleineres Volumen des Zellkerns auf. Damit sinkt die Wahrscheinlichkeit, mehrere Foci in einem Zellkern selbst bei genauem Durchfokussieren des Gewebeschnitts zu unterscheiden. Diese Einschränkung könnte dazu führen, dass unter allen Bedingungen in den Alveolarzellen eine geringere Anzahl an Foci detektiert werden konnte. Sollte dies tatsächlich zutreffen, ergäbe sich für die Alveolarzellen eine deutlich höhere Belastung als sie mit der angewandten Methodik nachweisbar war. Dieser Annahme widerspricht jedoch die hohe Anzahl an Alveolarzellen, welche keinen Focus aufweisen. So mussten beispielsweise in Gewebeschnitten der unbestrahlten C57 Kontrollen durchschnittlich 833 Alveolarzellen gezählt werden, um die zuvor im Arbeitsprotokoll festgelegte Zahl von 40 Foci im jeweiligen Präparat zu erreichen. Im

Vergleich dazu mussten im selben Präparat lediglich 340 Bronchialepithelzellen auf Foci untersucht werden, um diese Bedingung zu erfüllen. Gegen eine höhere Belastung als nachgewiesen spricht auch, dass sich in den Bronchialepithel- und Alveolarzellen bei reparaturdefizienten Tieren bis zu vier bzw. zwei Foci in einer Zelle nachweisen lassen. Wenn eine solche Akkumulation in den Alveolarzellen auch deutlich seltener auftritt als in den Bronchialepithelzellen, so ist sie doch nachweisbar, sodass nach Abwägen dieser Argumente durchaus von einer deutlich niedrigeren Focibelastung der Alveolarzellen und damit repräsentativen Ergebnissen ausgegangen werden kann.

Bei den Experimenten zur Einzeitbestrahlung fällt in diesem Zusammenhang auf, dass die Zahl der induzierten Foci im Verhältnis betrachtet in den Alveolarzellen stärker ansteigt als in den Bronchialepithelzellen. Ausgehend von der unbestrahlten Kontrolle der C57-Linie ergibt sich im Bronchialepithel von 0,118 Foci pro Zelle eine Zunahme auf 0,916 Foci pro Zelle nach einmaliger Bestrahlung mit 100 mGy und Organentnahme nach 0,5 Stunden. Dies entspricht einer Zunahme um den Faktor 7,7. In den Alveolarzellen steigen die Werte von 0,048 Foci pro Zelle in der unbestrahlten Kontrolle auf 0,617 Foci pro Alveolarzelle nach Einzeitbestrahlung mit 100 mGy und Entnahme nach 0,5 Stunden, was einer Zunahme um den Faktor 12,8 entspricht. Auch bei der fraktionierten Bestrahlung ergibt sich insgesamt das Bild einer im Verhältnis betrachtet stärkeren Zunahme der induzierten Foci in den Alveolarzellen. Diesen Betrachtungen liegt dabei stets der Wert der unbestrahlten Kontrolle zugrunde: Basierend auf der niedrigeren Anzahl an Foci in den Alveolarzellen der unbestrahlten Kontrollen scheinen die Foci in den Alveolarzellen stärker zuzunehmen als in den Bronchialepithelzellen. Nach Bestrahlung ergibt sich hingegen durchgehend eine höhere Belastung der Bronchialepithelzellen, welche signifikant mehr 53BP1 Foci aufweisen als die Alveolarzellen. Auch die Anzahl der insgesamt analysierten Alveolarzellen im Verhältnis zu den Bronchialepithelzellen unterstreicht die im Bronchialepithel stärkere Akkumulation von 53BP1 Foci.

Weiterhin fiel in beiden Zellpopulationen, besonders aber in den Bronchialepithelzellen, bei der Auswertung auf, dass sich die Größe der ausgewerteten Foci in Abhängigkeit von frühen und späten Entnahmezeitpunkten unterscheidet. Erfolgt die Organentnahme als Kontrolle oder 0,5 bzw. 24 Stunden nach Bestrahlung, so sind die Foci in der Regel eher klein und stecknadelkopfförmig (auch im Gehirn beobachtet von Schanz, 2013, nicht publiziert). Zu den 72 Stunden-Messpunkten hingegen treten zunehmend größere, klecksförmige Foci auf, welche auch ein kräftigeres Fluoreszenzsignal aufweisen (vgl. Abb. 4-16, S. 71, A, SCID a-c).

Tendenziell könnte eher mit einer gegenteiligen Entwicklung zu rechnen sein: So könnte man erwarten, dass sich größere Foci zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung finden, welche durch Reparatur zu späteren Zeitpunkten kleiner geworden sind bis sie verschwinden. Außerdem könnte man annehmen, dass kleinere Foci eine geringere Beschädigung anzeigen und damit schneller repariert werden als größere.

Tatsächlich werden DNA-Doppelstrangbrüche mit unterschiedlicher Geschwindigkeit repariert. Einfache DNA-Doppelstrangbrüche können bereits binnen 15 bis 30 Minuten repariert sein, weswegen die Auswertung der Foci 0,5 Stunden nach Bestrahlungsende eine niedrigere Anzahl ergeben könnte als durch die Bestrahlung induziert wurde (Löbrich et al., 2010). Reparaturvorgänge können aber auch deutlich länger andauern: So wird ein Reparaturmechanismus, das Non-Homologous-End-Joining (NHEJ), vor allem während der G1- und G0-Phase des Zellzyklus aktiviert. Ein weiterer Mechanismus, die Homologe Rekombination (HR), ist in der Regel auf die späte G2- und S-Phase beschränkt, da sie auf ein Schwesterchromatid angewiesen ist. Da die untersuchten Zellpopulationen eine vergleichsweise niedrige Erneuerungsrate aufweisen, sollte die Reparatur von DNA-Schäden in erster Linie über den Mechanismus des NHEJ ablaufen und dementsprechend schneller vonstatten gehen, als wenn beide Mechanismen aktiv wären.

Mit entscheidend für die Geschwindigkeit der Reparatur scheint darüber hinaus die applizierte Bestrahlungsdosis zu sein. So können DNA-Doppelstrangbrüche, welche durch Bestrahlung mit 40 bis 80 mGy oder höhere Dosen hervorgerufen wurden, in Fibroblasten des Menschen relativ schnell repariert werden, während DNA-Doppelstrangbrüche, die mit 10 mGy oder noch geringeren Dosen induziert wurden, im gleichen Zeitraum unrepariert bleiben (Grudzenski et al., 2010).

Insgesamt geht man davon aus, dass etwa 85% der DNA-Doppelstrangbrüche vergleichsweise schnell, die verbleibenden rund 15% eher langsamer repariert werden (Goodarzi et al., 2010). Ursprünglich vermutete man, dass die langsamere Reparatur ursächlich in besonders komplexen Läsionen begründet liegt. Goodarzi et al. induzierten deshalb mit Neocarzinostatin, einem Zytostatikum, das DNA-Doppelstrangbrüche verursacht, komplexe DNA-Schäden. Dabei zeigte sich, dass auch diese Schäden mit einer schnellen und einer langsameren Kinetik repariert wurden (Goodarzi et al., 2010). Möglicherweise ist die Ursache für die unterschiedliche Reparaturgeschwindigkeit in der Chromatinstruktur zu suchen: So gilt mittlerweile die Struktur des kondensierten Heterochromatins als Barriere für eine schnelle Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Murray et al., 2012). Damit eine Reparatur

erfolgen kann, muss ATM KAP1 phosphorylieren, welches daraufhin das Heterochromatin elastischer und den Reparaturproteinen zugänglich macht (Goodarzi et al., 2008). Ohne phosphoryliertes KAP1 (pKAP1) erfolgt dementsprechend keine Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen im Heterochromatin (Noon et al., 2010). Im entknäuelten Euchromatin hingegen sind diese Schritte nicht notwendig, es kann also schneller zur Rekrutierung von Reparaturproteinen kommen.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchungen und der oben genannten Rekrutierungskaskade steht 53BP1, ein Protein, das als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche etabliert ist (Schultz et al., 2000) und in diesem Zusammenhang mit methylierten Histonen interagiert (FitzGerald et al., 2009). Durch Bindung mittels seiner so genannten Tudor-Domänen an phosphoryliertes Histon H2AX kommt es zu einer Kollokalisierung mit dem DNA-Doppelstrangbruch-Marker  $\gamma$ H2AX (Ward et al., 2003).

In der Kaskade, die zur Rekrutierung von Reparaturproteinen in der DNA-Doppelstrangbruchregion führt, wird 53BP1 am C- und am N-Terminus durch ATM und die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs, Harding and Bristow, 2012) phosphoryliert. Eine Aktivierung von 53BP1 kann allerdings auch unabhängig von ATM erfolgen (Zgheib et al., 2005). Welche weiteren Funktionen 53BP1 darüber hinaus innehat, ist Gegenstand aktueller Forschung. So schlugen Lukas et al. folgendes Modell für eine erweiterte Funktion von 53BP1 als DNA-Schadenssensor vor: Aus in der S- oder G2-Phase nicht vollständig replizierten DNA-Anteilen, welche an den Kontrollpunkten nicht detektiert werden, entstehen in der M-Phase DNA-Läsionen im Chromatin, woraufhin es in der G1-Phase zur Bildung von 53BP1 Foci kommt. In der darauf folgenden S-Phase ermöglicht die nun vorhandene Markierung dieser Läsionen eine zügige Reparatur (Lukas et al., 2011). Darüber hinaus wird dem 53BP1 Protein während des Zellzyklus eine protektive Funktion zugeschrieben. So werden instabile DNA-Regionen durch 53BP1 nicht nur markiert, sondern auch stabilisiert und dadurch vor weiterer Beschädigung geschützt, bis eine Reparatur erfolgen kann (Dundr, 2012). Darüber hinaus scheint 53BP1 die Reparatur auch dahingehend zu erleichtern, dass es nach Bindung an methyliertes Histon H3 eine Relaxation und erhöhte Mobilität des Chromatins in der Bruchregion erzielt (Dimitrova et al., 2008).

Die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Größe und Morphologie zwischen den bereits initial nach Bestrahlung vorhandenen 53BP1 Foci und den residuellen, länger persistierenden 53BP1 Foci können auf mehreren Wegen erklärt werden. So könnten größere Foci durch eine



Überlagerung kleinerer Einzelsignale zustande kommen, welche sich lichtmikroskopisch einer genauen Auswertung entziehen. Für diese Hypothese spricht, dass sich transmissionselektronenmikroskopisch bis zu 28 so genannte 53BP1 Cluster pro Gy Bestrahlung in einem Nucleus nachweisen lassen (Rübe et al., 2011). Größere residuelle Foci könnten auch als Folge der oben beschriebenen Mechanismen erklärt werden: So erleichtert 53BP1 die Reparatur schwerer Läsionen durch Chromatinrelaxation und ermöglicht dadurch eine stärkere lokale Akkumulation von Reparaturproteinen, welche ebenfalls visualisiert werden können und als morphologisch größere Foci imponieren. Auch für  $\gamma$ H2AX sind morphologisch vergleichsweise größere residuelle Foci beschrieben worden (Belyaev, 2010). Bei Betrachtung dieser residuellen  $\gamma$ H2AX Foci wurde auch die Kollokalisierung mit 53BP1 weiter untersucht. Dabei fiel auf, dass bis 24 Stunden nach Bestrahlung eine exakte Kollokalisierung nachweisbar war, welche aber über diesen Zeitpunkt hinaus nicht weiter Bestand hatte (Belyaev, 2010). Erklären lässt sich diese Diskrepanz durch eine Persistenz von  $\gamma$ H2AX am Schadensort auch über die Reparatur hinaus (Nelson et al., 2009).

Für 53BP1 ergeben sich damit derzeit zwei miteinander verbundene Wirkbereiche, im Zellzyklus und innerhalb der Reparatur von DNA-Schäden im Kontext des Chromatins. Bei der Reparatur von DNA-Schäden ist 53BP1 zudem beteiligt an der Annäherung der beiden Telomere der Bruchregion sowie an der Behebung physiologischer DNA-Doppelstrangbrüche im Rahmen der V(D)J-Rekombination von Antikörpern (Noon and Goodarzi, 2011). Die Bedeutung von 53BP1 für den Organismus wird bei der Untersuchung 53BP1-defizienter Organismen noch deutlicher. So sind 53BP1-defiziente Mäuse zwar wachstumsretardiert, immundefizient, besonders strahlensensibel und tumoranfällig, aber lebensfähig. Ein vergleichbares 53BP1-Defizienz Syndrom ist beim Menschen hingegen bisher nicht bekannt (Noon and Goodarzi, 2011).

### **5.3. Klinische Relevanz**

Bei therapeutischer Bestrahlung des menschlichen Thorax kommt der Lunge eine dosislimitierende Bedeutung zu (Gross, 1977), und als Komplikationen können eine Pneumonitis bis hin zur Lungenfibrose auftreten. Die auf ein Zielvolumen gerichtete Bestrahlung wird im Rahmen der konformalen Radiotherapie in Mehrfeldertechnik appliziert (Nutting et al., 2000). Die IMRT zeichnet sich als Weiterentwicklung der konformalen

Radiotherapie durch eine nochmalige Unterteilung dieser Felder beispielsweise mit Multilamellenkollimatoren aus (DGMP-Bericht, 2004). Üblicherweise plant die IMRT die Mitbestrahlung großer Volumina gesunden Normalgewebes mit ein, um im Planungs-Zielvolumen eine maximale applizierbare Bestrahlungsdosis zu erreichen (Salz et al., 2012). Das gesunde Normalgewebe wird darüber hinaus durch Streustrahlung belastet, welche beim Einsatz von Multilamellenkollimatoren im Bereich von 1 bis 3% der applizierten Dosis liegt (Hall, 2006). Folglich wird im Rahmen der IMRT häufig die gesamte Lunge mit möglicherweise biologisch relevanten Bestrahlungsdosen im mGy-Bereich belastet (100 mGy entsprechen der 5% Isodose einer Fraktion von 2 Gy), wie sie in dieser Arbeit angewandt wurden.

Die untersuchten Zellpopulationen in der Lunge der Maus zeigen unter Normalbedingungen vergleichsweise langsame Erneuerungsraten. So treten 1% der Bronchialepithelzellen innerhalb von 24 Stunden in die S-Phase des Zellzyklus ein (Stripp and Reynolds, 2008). Diese Rate konnte durch Toxin-Exposition auf 10% gesteigert werden (Reynolds et al., 2000). Demgegenüber unterliegen die Pneumozyten Typ II einer Erneuerungsrate von 20 bis 35 Tagen bei der Maus (Gross, 1977) und rund 80 Tagen beim Menschen (Herrmann and Baumann, 1997). Entsprechend konnten in nahezu allen untersuchten Mauslinien Ki-67 positive Zellen im Bronchialepithel und auch im Alveolarraum nachgewiesen werden. Kommt es zu einer Zellschädigung bis zur Freilegung der Basalmembran, so wird der entstandene Defekt zunächst weniger durch Zellproliferation als vielmehr durch Zellmigration kompensiert (Puchelle et al., 2006). Sowohl in Bronchialepithel als auch Alveolarraum besteht die initiale Schadensantwort auf Läsionen im jeweiligen Epithel in einer Migration benachbarter Progenitorzellen, welche den Defekt im Epithel bedecken. Erst danach setzt eine Zellproliferation und Zelldifferenzierung ein (Crosby and Waters, 2010). Dabei gelten im Alveolarraum die Pneumozyten Typ II als Progenitorzellen, während im Bronchialepithel die Clara-Zellen diese Funktion mit übernehmen. Diese Reparaturprozesse sind Teil des Krankheitsbildes der Radiopneumonitis, welche in eine Lungenfibrose übergehen kann. Das Risiko, eine Radiopneumonitis zu entwickeln, steigt beim Menschen bei Einzeitbestrahlung mit zunehmender Dosis: Wird einmalig mit 7,5 Gy bestrahlt, so beträgt das Risiko 0%. Bei einmaliger Applikation von 8,2 Gy besteht bereits ein Risiko von 5%, welches auf 50% nach Einzeitbestrahlung mit 9,3 Gy ansteigt (Van Dyk et al., 1981). Nach einmaliger Bestrahlung mit 10,6 Gy besteht ein Risiko von 95% (Van Dyk et al., 1981), dass es zu einem Untergang von Pneumozyten und zur Freilegung der Basalmembran kommt (Morgan and Breit, 1995).

Bei fraktionierter Bestrahlung eines Mammakarzinoms mit 2 Gy Einzeldosis (Gesamtdosis 50 Gy) kommt es in der Lunge zu einer Zunahme an freigesetzten Zellen und Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage sowie zu einer Abnahme von Vitalkapazität, Alveolarvolumen und Diffusionskapazität bei 13 von 17 untersuchten Patientinnen (Morgan and Breit, 1995). Sowohl einmalige als auch fraktionierte Bestrahlung führen damit zu zellulären Schäden, welche insbesondere im Alveolarraum über das Niveau einer Zytokinausschüttung und Entzündungsreaktion hinausgehen.

Ein pathologisch gesteigerter Zelluntergang im Lungengewebe der Maus konnte anhand der angewandten PARP-1 Färbung nach den im Rahmen dieser Arbeit applizierten Bestrahlungsdosen bei keiner Mauslinie nachgewiesen werden. Um herauszufinden, ob es infolge der Bestrahlung zu einer Zytokinfreisetzung kommt, wurde zusätzlich eine TGF- $\beta$ 1 Färbung durchgeführt. An der Zytokinfreisetzung in der Lunge sind vor allem Alveolarmakrophagen und die Zellen des Bronchialepithels über die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  maßgeblich beteiligt (Morgan and Breit, 1995).

Eine Einmalbestrahlung der Lunge der Maus mit 20 Gy führt zu einem weitestgehenden Funktionsverlust der Lunge: Neben schweren zellulären Schäden wird auch eine Ischämie der Alveolarräume berichtet (Travis et al., 1977). Wird hingegen fünfmalig eine Einzeldosis von 4 Gy appliziert, kommt es histologisch lediglich zu einer Hypertrophie der Pneumozyten, welche nach zehnmaliger Bestrahlung mit 2 Gy nicht nachweisbar ist (Travis et al., 1977). Nach Einzeldosisbestrahlungen ab 4 Gy beginnt hingegen bereits eine reaktive Freisetzung der Matrixmetalloproteinase 2 (Araya et al., 2001). Eine einmalige Bestrahlung mit 6 Gy führt zusätzlich zu einer messbaren Zunahme der TGF- $\beta$ -Expressierung (Rübe et al., 2000). Damit ist auf einem niedrigen Level bereits nach einer Bestrahlung mit Einzeldosen von 4 Gy bis 6 Gy immunhistochemisch eine Schadensantwort nachweisbar. Auch im Lungengewebe der mit 100 mGy Einzeldosis 20x fraktioniert bestrahlten reparaturdefizienten ATM<sup>-/-</sup> Mäuse deutete sich ein tendenziell stärkeres Signal in der TGF- $\beta$ 1 Färbung an, welches bei den reparaturprofizienten Mäusen in diesem Maße nicht nachweisbar war. Das Bronchialepithel reparaturprofizienter C57 Mäuse war unbestrahlt, nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung (20x 100 mGy, 24 und 72 Stunden) und nach einmaliger hochdosierter Bestrahlung mit 10 Gy (24 und 72 Stunden) hinsichtlich des TGF- $\beta$ 1 Signals vergleichbar. Dieses Ergebnis lässt sich in Relation zu den Ergebnissen nach einmaliger Bestrahlung mit 12 Gy (Rübe et al., 2000) setzen. Dabei ergab sich in einer APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) Färbung 24 Stunden nach Organentnahme ein kaum messbares, 72 Stunden

nach Organentnahme kein und acht Wochen nach Bestrahlung ein schwach positives Signal für TGF- $\beta$  sowohl in Bronchialepithel- als auch Alveolarzellen. Da in dieser Arbeit bei mit 1x 10 Gy hochdosisbestrahlten C57 Tieren nach 72 Stunden das Signal vergleichbar war mit demjenigen nach acht Wochen und diese beiden sich kaum von der unbestrahlten Kontrolle unterschieden, ist davon auszugehen, dass es sich bei den detektierten punktförmigen Fluoreszenzen weitestgehend um die Markierung von Vorstufen von TGF- $\beta$ 1 handelt, welche von dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper ebenfalls detektiert werden. Die Ergebnisse hinsichtlich des TGF- $\beta$  können daher unter Berücksichtigung der Anzahl der verwendeten Präparate und des Abgleichs mit der Literatur lediglich als Tendenzen bewertet werden, deren Validität durch weitergehende Studien evaluiert werden könnte.

Für andere Zytokine ist eine Schadensantwort nach einmaliger Bestrahlung mit 12 Gy sehr viel deutlicher beschrieben worden. Danach kommt es im Bronchialepithel zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, darunter TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  unverzüglich sowie IL-6 innerhalb der ersten Stunden nach Bestrahlung (Rübe et al., 2005).

Vergleicht man die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Lunge der Maus mit den Folgen der Bestrahlung der Lunge beim Menschen, müssen nicht nur die offensichtlichen Unterschiede zwischen den beiden Organismen wie Lebenserwartung, Gewicht und Größe berücksichtigt werden, sondern auch der Umstand, dass bei den untersuchten Mauslinien unterschiedlicher Genotypen eine Ganzkörperbestrahlung erfolgt, während dies beim Menschen nur selten erforderlich ist. Trotz der unterschiedlichen Voraussetzungen sind aber die Auswirkungen einer Einzeldosis- wie auch einer fraktionierten Bestrahlung in der Lunge der Maus und des Menschen vergleichbar. Auch wenn die Lunge nicht Primärziel einer thorakalen oder mediastinalen Bestrahlung ist, kann es abhängig vom genetischen Hintergrund des betroffenen Patienten auf DNA-Ebene zu einer unterschiedlich starken Akkumulation von strahlungsinduzierten DNA-Schäden kommen. Insofern können die beschriebenen Untersuchungen zu den Auswirkungen einer einmaligen wie auch einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung der Lunge der Maus möglicherweise auch einen Beitrag leisten, um Auswirkungen einer thorakalen oder mediastinalen Bestrahlung des Menschen abschätzen zu können.

Sicher auf den Menschen übertragbar ist das Ergebnis, dass die Akkumulation von DNA-Schäden und die Reaktion des Organismus auf selbst niedrig dosierte Bestrahlung abhängig vom genetischen Hintergrund des Individuums stark variiert. Durch die Charakterisierung der genetischen Ausstattung des Individuums ließen sich möglicherweise

Reaktionen und Komplikationen im Rahmen einer strahlentherapeutischen Behandlung vorhersagen. Da der Strahlentherapie in der Klinik eine Computertomographie zur Planung der Bestrahlung vorangeht, kommt es bereits auf dieser Stufe zu einer vergleichsweise niedrigen Strahlenbelastung des Menschen. Entnimmt man bei Patienten nach der Computertomographie Lymphozyten oder Fibroblasten und untersucht diese auf  $\gamma$ H2AX Foci, so ergibt sich für Lymphozyten von immunkompetenten Patienten eine Reparatur dieser Foci innerhalb von 24 Stunden (Löbrich et al., 2005). Bei immundefizienten Patienten fand in diesem Zeitraum keine vergleichbare Reparatur statt (Löbrich et al., 2005), weswegen dieses Verfahren als Indikator für die individuelle und genetisch determinierte Strahlensensibilität betrachtet werden kann. Eine klinische Anwendung dieser Methodik würde es ermöglichen, strahlentherapeutische Therapiepläne noch weiter zu individualisieren und möglichen radiogenen Komplikationen noch vor ihrem Entstehen entgegenzutreten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F.B., Starke, K., 2009. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Elsevier, Urban & Fischer, München.
2. Araya, J., Maruyama, M., Sassa, K., Fujita, T., Hayashi, R., Matsui, S., Kashii, T., Yamashita, N., Sugiyama, E., Kobayashi, M., 2001. *Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 production in human lung epithelial cells*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280, L30–38.
3. Bakkenist, C.J., Kastan, M.B., 2003. *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. *Nature* 421, 499–506.
4. Banin, S., 1998. *Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage*. *Science* 281, 1674–1677.
5. Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D., Wynshaw-Boris, A., 1996. *Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia*. *Cell* 86, 159–171.
6. Belyaev, I.Y., 2010. *Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry*. *Mutat. Res.* 704, 132–141.
7. Bergner, A., Stief, J., Holdenrieder, S., Stieber, P., Haimerl, W., Passlick, B., Waldschmidt, A., Kummermehr, J., Gamarra, F., Huber, R.M., 2003. *Effects of single-dose irradiation on bronchial epithelium: a comparison of BEAS 2B cell monolayers, human organ cultures, and Goettinger minipigs*. *Radiat. Res.* 160, 647–654.
8. Bhatti, S., Kozlov, S., Farooqi, A.A., Naqi, A., Lavin, M., Khanna, K.K., 2011. *ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress*. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2977–3006.
9. Bortfeld, T., 2006. *IMRT: a review and preview*. *Phys Med Biol* 51, R363–379.
10. Bosma, M.J., Carroll, A.M., 1991. *The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses*. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 323–350.
11. Brenner, D.J., Doll, R., Goodhead, D.T., Hall, E.J., Land, C.E., Little, J.B., Lubin, J.H., Preston, D.L., Preston, R.J., Puskin, J.S., Ron, E., Sachs, R.K., Samet, J.M., Setlow, R.B., Zaider, M., 2003. *Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13761–13766.
12. Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., Chen, D.J., 2001. *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks*. *J. Biol. Chem.* 276, 42462–42467.
13. Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., Nussenzweig, A., 2003. *Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks*. *Nat. Cell Biol.* 5, 675–679.
14. Charles River Laboratory, 2009. *A Fox Chase SCID Model, Technical Sheet*.
15. Cleaver, J.E., 2011.  *$\gamma$ H2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair “all that glitters is not gold!”* *Photochem. Photobiol.* 87, 1230–1239.
16. Coggle, J.E., Lambert, B.E., Moores, S.R., 1986. *Radiation effects in the lung*. *Environ. Health Perspect.* 70, 261–291.
17. Coker, R.K., Laurent, G.J., 1998. *Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance*. *Eur. Respir. J.* 11, 1218–1221.
18. Cortez, D., 1999. *Requirement of ATM-Dependent Phosphorylation of Brcal in the DNA Damage Response to Double-Strand Breaks*. *Science* 286, 1162–1166.

19. Crosby, L.M., Waters, C.M., 2010. *Epithelial repair mechanisms in the lung*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 298, L715–731.
20. Cuttler, J.M., 2007. *Health effects of low level radiation: when will we acknowledge the reality?* Dose Response 5, 292–298.
21. Czornak, K., Chughtai, S., Chrzanowska, K.H., 2008. *Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair*. J. Appl. Genet. 49, 383–396.
22. Degryse, A.L., Tanjore, H., Xu, X.C., Polosukhin, V.V., Jones, B.R., Boomershine, C.S., Ortiz, C., Sherrill, T.P., McMahon, F.B., Gleaves, L.A., Blackwell, T.S., Lawson, W.E., 2011. *TGF $\beta$  signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 300, L887–897.
23. Deutsche Krebshilfe, 2013. *Krebszahlen*, <http://www.krebshilfe.de/krebszahlen.html>
24. DGMP-Bericht, N., 19., Tübingen, 2004. *Leitlinie zur Strahlentherapie mit fluenzmodulierten Feldern*.
25. Dimitrova, N., Chen, Y.-C.M., Spector, D.L., de Lange, T., 2008. *53BP1 promotes Non-Homologous-End-Joining of telomeres by increasing chromatin mobility*. Nature 456, 524–528.
26. Douglas, P., Sapkota, G.P., Morrice, N., Yu, Y., Goodarzi, A.A., Merkle, D., Meek, K., Alessi, D.R., Lees-Miller, S.P., 2002. *Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase*. Biochem. J. 368, 243–251.
27. Dundr, M., 2012. *Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome*. Curr. Opin. Cell Biol. 24, 415–422.
28. Dvorak, C.C., Cowan, M.J., 2010. *Radiosensitive severe combined immunodeficiency disease*. Immunol Allergy Clin North Am 30, 125–142.
29. Eliezer, Y., Argaman, L., Rhie, A., Doherty, A.J., Goldberg, M., 2009. *The direct interaction between 53BP1 and MDC1 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of damage*. J. Biol. Chem. 284, 426–435.
30. Enkhbaatar, P., Traber, D.L., 2004. *Pathophysiology of acute lung injury in combined burn and smoke inhalation injury*. Clin. Sci. 107, 137–143.
31. Fischer, A., 2000. *Severe combined immunodeficiencies (SCID)*. Clin. Exp. Immunol. 122, 143–149.
32. FitzGerald, J.E., Grenon, M., Lowndes, N.F., 2009. *53BP1: function and mechanisms of focal recruitment*. Biochem. Soc. Trans. 37, 897–904.
33. Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., Stein, H., 1983. *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. Int. J. Cancer 31, 13–20.
34. Goodarzi, A.A., Jeggo, P., Lobrich, M., 2010. *The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax*. DNA Repair (Amst.) 9, 1273–1282.
35. Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M., Jeggo, P.A., 2008. *ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin*. Mol. Cell 31, 167–177.
36. Grégoire, V., 2005. *Tumor control probability (TCP) and normal tissue complication probability (NTCP) in head and neck cancer*. Rays 30, 105–108.
37. Gross, N.J., 1977. *Pulmonary effects of radiation therapy*. Ann. Intern. Med. 86, 81–92.
38. Grudzenski, S., Raths, A., Conrad, S., Rube, C.E., Löbrich, M., 2010. *Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 14205–14210.

39. Hagimoto, N., Kuwano, K., Inoshima, I., Yoshimi, M., Nakamura, N., Fujita, M., Maeyama, T., Hara, N., 2002. *TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells*. J. Immunol. 168, 6470–6478.
40. Hall, E.J., 2006. *Intensity-modulated radiation therapy, protons, and the risk of second cancers*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 65, 1–7.
41. Harding, S.M., Bristow, R.G., 2012. *Discordance between phosphorylation and recruitment of 53BP1 in response to DNA double-strand breaks*. Cell Cycle 11, 1432–1444.
42. Herrmann, T., Baumann, M., 1997. *Klinische Strahlenbiologie : kurz und bündig mit 33 Tabellen*. Fischer, Jena [u.a.].
43. Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R.A., Jr, Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S., Halazonetis, T.D., 2004. *Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks*. Nature 432, 406–411.
44. Iwabuchi, K., Basu, B.P., Kysela, B., Kurihara, T., Shibata, M., Guan, D., Cao, Y., Hamada, T., Imamura, K., Jeggo, P.A., Date, T., Doherty, A.J., 2003. *Potential role for 53BP1 in DNA end-joining repair through direct interaction with DNA*. J. Biol. Chem. 278, 36487–36495.
45. Jackson, S.P., 2002. *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. Carcinogenesis 23, 687–696.
46. Jonathan, E.C., Bernhard, E.J., McKenna, W.G., 1999. *How does radiation kill cells?* Curr Opin Chem Biol 3, 77–83.
47. Kastan, M.B., Bartek, J., 2004. *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature 432, 316–323.
48. Kato, T.A., Nagasawa, H., Weil, M.M., Little, J.B., Bedford, J.S., 2006. *Levels of gamma-H2AX Foci after low-dose-rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two at families and in another apparently normal individual*. Radiat. Res. 166, 443–453.
49. Kauffmann, G.W., Moser, E., Sauer, R., 2006. *Radiologie*. Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.].
50. Keegan, K.S., Holtzman, D.A., Plug, A.W., Christenson, E.R., Brainerd, E.E., Flaggs, G., Bentley, N.J., Taylor, E.M., Meyn, M.S., Moss, S.B., Carr, A.M., Ashley, T., Hoekstra, M.F., 1996. *The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes*. Genes Dev. 10, 2423–2437.
51. Lavin, M.F., 2008. *Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 759–769.
52. Lee, J.-H., Paull, T.T., 2007. *Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks*. Oncogene 26, 7741–7748.
53. Lee, Y., McKinnon, P.J., 2000. *ATM dependent apoptosis in the nervous system*. Apoptosis 5, 523–529.
54. Lees-Miller, S.P., Meek, K., 2003. *Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining*. Biochimie 85, 1161–1173.
55. Li, X., Heyer, W.-D., 2008. *Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance*. Cell Res. 18, 99–113.
56. Lieber, M.R., 2010. *The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway*. Annu. Rev. Biochem. 79, 181–211.
57. Löbrich, M., Rief, N., Kühne, M., Heckmann, M., Fleckenstein, J., Rube, C., Uder, M., 2005. *In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 8984–8989.
58. Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O., Jeggo, P.A., 2010. *gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization*. Cell Cycle 9, 662–669.



59. Löffler, G., Petrides, P.E., Heinrich, P.C., 2003. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin [u.a.].
60. Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grøfte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., Lukas, J., 2011. *53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress*. *Nat. Cell Biol.* 13, 243–253.
61. Mah, L.-J., El-Osta, A., Karagiannis, T.C., 2010. *gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair*. *Leukemia* 24, 679–686.
62. Mahaney, B.L., Meek, K., Lees-Miller, S.P., 2009. *Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining*. *Biochem. J.* 417, 639–650.
63. Marks, L.B., Yu, X., Vujaskovic, Z., Small, W., Jr, Folz, R., Anscher, M.S., 2003. *Radiation-induced lung injury*. *Semin Radiat Oncol* 13, 333–345.
64. Massagué, J., 1990. *The transforming growth factor-beta family*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 597–641.
65. Massagué, J., 1998. *TGF-beta signal transduction*. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753–791.
66. Mazin, A.V., 2003. *A Novel Function of Rad54 Protein. STABILIZATION OF THE Rad51 NUCLEOPROTEIN FILAMENT*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 14029–14036.
67. McIntosh, H.S., Spitz, S.A., 1939. *Study of radiation pneumonitis*. *Amer. J. Roentgen.*
68. McKinnon, P.J., 2012. *ATM and the molecular pathogenesis of ataxia telangiectasia*. *Annu Rev Pathol* 7, 303–321.
69. Mladenov, E., Iliakis, G., 2011. *Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways*. *Mutat. Res.* 711, 61–72.
70. Morgan, G.W., Breit, S.N., 1995. *Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31, 361–369.
71. Moses, H.L., Branum, E.L., Proper, J.A., Robinson, R.A., 1981. *Transforming growth factor production by chemically transformed cells*. *Cancer Res.* 41, 2842–2848.
72. Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A., de Villartay, J.P., 2001. *Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency*. *Cell* 105, 177–186.
73. Mottram, J.C., 1936. *A factor of importance in the radiosensitivity of tumours*. *British Journal of Radiology* 9, 606–614.
74. Movsas, B., Raffin, T.A., Epstein, A.H., Link, C.J., Jr, 1997. *Pulmonary radiation injury*. *Chest* 111, 1061–1076.
75. Muntau, A., 2011. *Intensivkurs Pädiatrie*. Elsevier, Urban & Fischer, München.
76. Murray, J.M., Stiff, T., Jeggo, P.A., 2012. *DNA double-strand break repair within heterochromatic regions*. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 173–178.
77. Nelson, G., Buhmann, M., von Zglinicki, T., 2009. *DNA damage foci in mitosis are devoid of 53BP1*. *Cell Cycle* 8, 3379–3383.
78. Noon, A.T., Goodarzi, A.A., 2011. *53BP1-mediated DNA double-strand break repair: insert bad pun here*. *DNA Repair (Amst.)* 10, 1071–1076.
79. Noon, A.T., Shibata, A., Rief, N., Löbrich, M., Stewart, G.S., Jeggo, P.A., Goodarzi, A.A., 2010. *53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair*. *Nat. Cell Biol.* 12, 177–184.
80. Nutting, C., Dearnaley, D.P., Webb, S., 2000. *Intensity modulated radiation therapy: a clinical review*. *Br J Radiol* 73, 459–469.

81. Olive, P.L., 1998. *The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation*. Radiat. Res. 150, S42–51.
82. Pagano, A., Métrailler-Ruchonnet, I., Aurrand-Lions, M., Lucattelli, M., Donati, Y., Argiroffo, C.B., 2007. *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) controls lung cell proliferation and repair after hyperoxia-induced lung damage*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 293, L619–629.
83. Park, H.-R., Jo, S.-K., Yu, D.-K., Jung, U., 2013. *Fractionated irradiations lead to chronic allergic airway inflammation through increasing the influx of macrophages*. Inflamm. Res. 62, 27–36.
84. Pelton, R.W., Moses, H.L., 1990. *The beta-type transforming growth factor. Mediators of cell regulation in the lung*. Am. Rev. Respir. Dis. 142, S31–35.
85. Perlman, S., Becker-Catania, S., Gatti, R.A., 2003. *Ataxia-telangiectasia: diagnosis and treatment*. Semin Pediatr Neurol 10, 173–182.
86. Prise, K.M., Schettino, G., Folkard, M., Held, K.D., 2005. *New insights on cell death from radiation exposure*. Lancet Oncol. 6, 520–528.
87. Puchelle, E., Zahm, J.-M., Tournier, J.-M., Coraux, C., 2006. *Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc 3, 726–733.
88. Reynolds, S.D., Giangreco, A., Power, J.H., Stripp, B.R., 2000. *Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration*. Am. J. Pathol. 156, 269–278.
89. Rink, H., 1971. *Die Radiolyse des Wassers*. Chemie in unserer Zeit 5, 90–95.
90. Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M., Sporn, M.B., 1981. *New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 5339–5343.
91. Rodemann, H.P., Bamberg, M., 1995. *Cellular basis of radiation-induced fibrosis*. Radiother Oncol 35, 83–90.
92. Ron, E., 2002. *Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology*. Pediatr Radiol 32, 232–237; discussion 242–244.
93. Rube, C.E., Lorat, Y., Schuler, N., Schanz, S., Wennemuth, G., Rube, C., 2011. *DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy*. DNA Repair (Amst.) 10, 427–437.
94. Rube, C.E., Uthe, D., Schmid, K.W., Richter, K.D., Wessel, J., Schuck, A., Willich, N., Rube, C., 2000. *Dose-dependent induction of transforming growth factor beta (TGF-beta) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 47, 1033–1042.
95. Rube, C.E., Uthe, D., Wilfert, F., Ludwig, D., Yang, K., König, J., Palm, J., Schuck, A., Willich, N., Remberger, K., Rube, C., 2005. *The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 61, 1482–1492.
96. Saleh-Gohari, N., Helleday, T., 2004. *Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells*. Nucleic Acids Res. 32, 3683–3688.
97. Salz, H., Eichner, R., Wiezorek, T., 2012. *Does IMRT increase the peripheral radiation dose? A comparison of treatment plans 2000 and 2010*. Z Med Phys 22, 6–12.
98. San Filippo, J., Sung, P., Klein, H., 2008. *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*. Annu. Rev. Biochem. 77, 229–257.
99. Scholzen, T., Gerdes, J., 2000. *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J. Cell. Physiol. 182, 311–322.

100. Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A., Halazonetis, T.D., 2000. *p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks*. J. Cell Biol. 151, 1381–1390.
101. Schwarz, K., Ma, Y., Pannicke, U., Lieber, M.R., 2003. *Human severe combined immune deficiency and DNA repair*. Bioessays 25, 1061–1070.
102. Shiloh, Y., 2006. *The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape*. Trends Biochem. Sci. 31, 402–410.
103. Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D.A., Kaplan, M.I., Jaspers, N.G., Raams, A., Byrd, P.J., Petrini, J.H., Taylor, A.M., 1999. *The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder*. Cell 99, 577–587.
104. Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., McBride, W.H., 2003. *Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms*. Lancet Oncol. 4, 529–536.
105. Stöver, I., Feyer, P., 2010. *Praxismanual Strahlentherapie*. Springer, Berlin; New York.
106. Stripp, B.R., Reynolds, S.D., 2008. *Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium*. Proc Am Thorac Soc 5, 328–333.
107. Suwa, A., Hirakata, M., Takeda, Y., Jesch, S.A., Mimori, T., Hardin, J.A., 1994. *DNA-dependent protein kinase (Ku protein-p350 complex) assembles on double-stranded DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 6904–6908.
108. Swift, M., Morrell, D., Massey, R.B., Chase, C.L., 1991. *Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia*. N. Engl. J. Med. 325, 1831–1836.
109. Thompson, D., Duedal, S., Kirner, J., McGuffog, L., Last, J., Reiman, A., Byrd, P., Taylor, M., Easton, D.F., 2005. *Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers*. J. Natl. Cancer Inst. 97, 813–822.
110. Travis, E.L., Harley, R.A., Fenn, J.O., Klobukowski, C.J., Hargrove, H.B., 1977. *Pathologic changes in the lung following single and multi-fraction irradiation*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2, 475–490.
111. van der Burg, M., Gennery, A.R., 2011. *Educational paper. The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency*. Eur. J. Pediatr. 170, 561–571.
112. van der Burg, M., Ijspeert, H., Verkaik, N.S., Turul, T., Wiegant, W.W., Morotomi-Yano, K., Mari, P.-O., Tezcan, I., Chen, D.J., Zdzienicka, M.Z., van Dongen, J.J.M., van Gent, D.C., 2009. *A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B- SCID patient inhibits Artemis activation and Non-Homologous-End-Joining*. J. Clin. Invest. 119, 91–98.
113. Van Dyk, J., Keane, T.J., Kan, S., Rider, W.D., Fryer, C.J., 1981. *Radiation pneumonitis following large single dose irradiation: a re-evaluation based on absolute dose to lung*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 7, 461–467.
114. Verheij, M., Bartelink, H., 2000. *Radiation-induced apoptosis*. Cell Tissue Res. 301, 133–142.
115. Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B., Elledge, S.J., 2002. *53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint*. Science 298, 1435–1438.
116. Wang, J., Pluth, J.M., Cooper, P.K., Cowan, M.J., Chen, D.J., Yannone, S.M., 2005. *Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression*. DNA Repair (Amst.) 4, 556–570.
117. Wannemacher, M., 2006. *Strahlentherapie*. Springer, Berlin; Heidelberg

118. Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G., Chen, J., 2003. *Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX*. J. Biol. Chem. 278, 19579–19582.
119. Welsch, U., Sobotta, J., 2006. *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*; mit 21 Tabellen. Elsevier, Urban und Fischer, München; Jena.
120. Wu, Z., Wang, X., Yang, R., Liu, Y., Zhao, W., Si, J., Ma, X., Sun, C., Liu, Y., Tan, Y., Liu, W., Zhang, X., DI, C., Wang, Z., Zhang, H., Zhang, Z., 2013. *Effects of carbon ion beam irradiation on lung injury and pulmonary fibrosis in mice*. Exp Ther Med 5, 771–776.
121. Wyman, C., Ristic, D., Kanaar, R., 2004. *Homologous recombination-mediated double-strand break repair*. DNA Repair (Amst.) 3, 827–833.
122. Zgheib, O., Huyen, Y., DiTullio, R.A., Jr, Snyder, A., Venere, M., Stavridi, E.S., Halazonetis, T.D., 2005. *ATM signaling and 53BP1*. Radiother Oncol 76, 119–122.
123. Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., Shiloh, Y., 2006. *Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway*. Nat. Cell Biol. 8, 870–876.

## **7. Publikationen**

- 2013 *Flockerzi E., Schanz S., Rübe C.E.* (2013):  
„Akkumulation von DNA-Schäden in der Lunge nach fraktionierter  
Niedrigdosisbestrahlung“  
Abstract und Posterbeitrag  
Strahlentherapie und Onkologie, Vol. 189, p. 117,  
19th Annual Congress of the German-Society-for-Radiation-Oncology / DEGRO,  
09. bis 12. Mai 2013, Berlin, Deutschland
- 2013 *Flockerzi E., Schanz S., Rübe C.E.* (2013):  
“Effects of low-dose irradiation upon mouse lung tissue”  
Abstract und Vortrag auf der Jahrestagung der  
Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. (GBS),  
25. bis 27. September 2013, Darmstadt, Deutschland

## 8. Lebenslauf

## **9. Dank**

Ich bedanke mich beim Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Herrn Prof. Dr. med. Christian Rübe, und bei der Leiterin des Strahlenbiologischen Labors des Universitätsklinikums des Saarlandes, Frau Prof. Dr. med. Claudia E. Rübe, für die Überlassung dieses Dissertationsthemas, die Unterstützung und die Einblicke in die aktuelle Forschung und Wissenschaft, die ich erhalten habe.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dipl. Chem. Stefanie Schanz für die gute Einweisung und zu allen Zeiten ausgezeichnete und freundliche Betreuung.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes sei für ihre Offenheit und Geduld während des experimentellen Teils der Arbeit in der Klinik gedankt.

Gleiches gilt für die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Experimentellen Chirurgie (Direktor Herr Prof. Dr. med. Michael D. Menger) des Universitätsklinikums des Saarlandes, in deren Obhut sich die Tiere vor und nach der Bestrahlung befanden.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung zu allen Zeiten und das Ermöglichen meines Studiums einschließlich dieser Dissertation.