

Biologischer Nachweis niedriger Dosen ionisierender Strahlung



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

M.Sc. Johanna Mirsch

aus Darmstadt

1. Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

2. Referent: Prof. Dr. Bodo Laube

Tag der Einreichung: 3. Februar 2017

Tag der mündlichen Prüfung: 17. März 2017

Darmstadt 2017

D 17

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	ix
Vorwort	xiii
1.....Zusammenfassung / Summery	1
2.....Einleitung	7
2.1. Ionisierende Strahlung ist allgegenwärtig	7
2.1.1. Die terrestrische Strahlenexposition durch Radon	8
2.1.2. Die kosmische Strahlenexposition durch Schwerionen	9
2.1.3. Die zivilisatorische Strahlenexposition in der Medizin	10
2.2. Was macht ionisierende Strahlung für den Organismus so gefährlich?	12
2.2.1. Physikalische Wechselwirkungen von Photonen mit Materie und die Auswirkung dieser Interaktion auf die DNA	14
2.2.2. Physikalische Wechselwirkungen von geladenen Teilchen mit Materie und die Auswirkung dieser Interaktion auf die DNA	15
2.3. Schutz- und Reparaturmechanismen der Zelle	16
2.3.1. Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen	18
2.3.2. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	18
2.4. γ -H2AX-Foci-Assay zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen und dessen Anwendung in der biologischen Dosimetrie	20
2.5. Zielsetzung	22
3.....Material und Methoden	25
3.1. Material	25
3.1.1. Chemikalien	25
3.1.2. Lösungen und Puffer	26
3.1.3. Antikörper und kommerziell erhältliche Kits	26
3.1.4. Zelllinien und Mäusestamm	27
3.1.5. Verwendete Software	27
3.2. Methoden	28
3.2.1. Kultivierung und Aussaat von Zellen	28

3.2.2.	Behandlung von konfluenten HOMSF1-Zellen mit Wasserstoffperoxid oder N-Acetylcystein	29
3.2.3.	Bestrahlung von HOMSF1- und MEF-Zellen	30
3.2.4.	Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von HOMSF1- und MEF-Zellen	31
3.2.5.	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung in HOMSF1-Zellen	32
3.2.6.	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung in MEF-Zellen	33
3.2.7.	Präparation, Kultivierung der murinen Retina und deren ex vivo Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder Schwerionen	34
3.2.8.	Behandlung der C57BL/6-Mäuse mit N-Acetylcystein und deren anschließende <i>in vivo</i> Bestrahlung mit Röntgenstrahlen	36
3.2.9.	<i>In vivo</i> Bestrahlung von Mäuse mit Röntgenstrahlen oder Schwerionen	37
3.2.10.	Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von Gewebe	38
3.2.11.	Immunfluoreszenzmikroskopie und Auswertung von Retina-Explantaten	40
3.2.12.	Immunfluoreszenzmikroskopie und Auswertung von Gewebeschnitten	41
4...	Biodosimetrie: Direkte Messung der dreidimensionalen Schadensverteilung nach der Exposition mit Schwerionen in der Mausretina	45
4.1.	Ergebnisse	47
4.1.1.	Die murine Retina als Modellorgan für die Biodosimetrie nach Bestrahlung mit Schwerionen	47
4.1.2.	Biodosimetrie nach Bestrahlung mit Schwerionen	50
4.2.	Diskussion	60
5...	LowDose-Effekt: Kritische Rolle des intrazellulären oxidativen Stresslevels auf die DSB-Reparatur nach niedrigen Strahlendosen	65
5.1.	Ergebnisse	67
5.1.1.	Humane Fibroblasten zur Untersuchung von niedrigen Strahlendosen	67
5.1.2.	Doppelstrangbrüche verbleiben nach Bestrahlung von HOMSF1 mit niedrigen Strahlendosen unrepariert	70
5.1.3.	Kritische Rolle des oxidativen Stresses bei der DSB-Reparatur	72
5.1.4.	<i>In vivo</i> -Relevanz des <i>LowDose</i> -Effektes und dessen Abhängigkeit vom oxidativen Stress	80
5.1.5.	Untersuchung der DSB-Reparatur von Zellen nach der Bestrahlung mit einer niedrigeren Fluenz von Nickel-Ionen	83
5.2.	Diskussion	86

5.2.1.	Limitierungen bei der Übertragung des Experimentes mit kultivierten Zellen auf das Mausmodell	91
5.2.2.	Computergestützte Quantifizierung von Foci mit "AutoFoci"	93
5.2.3.	Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der DSB-Reparatur	94
5.2.4.	Abschließende Zusammenfassung der Ergebnisse	97
6.....Biodosimetrie: Direkte Messung der DNA-Schäden nach der Exposition mit Radon		101
6.1.	Ergebnisse	103
6.1.1.	Inhomogene Dosisdeposition durch Radon im Körper	103
6.1.2.	Entwicklung von Dosis-Korrekturfaktoren zur Bewertung der Strahlenexposition	107
6.1.3.	Die Aerosolkonzentration als kritischer Faktor bei der Schädigung der Lunge	112
6.1.4.	Langsame Reparatur von Radon-induzierten DSBs	114
6.2.	Diskussion	117
6.2.1.	Limitierungen des Foci-Assays und die Etablierung von Korrekturfaktoren	119
6.2.2.	Übertragbarkeit der Biodosimetrie	120
6.2.3.	Abschließende Zusammenfassung der Ergebnisse	121
7.....Literaturverzeichnis		125
8.....Anhang		xv
8.1.	Makros zur Bestimmung der X,Y,Z-Koordinaten von Zellen und γ H2AX-Foci in Stapelaufnahmen	xv
8.2.	Physikalische Berechnung der Dosisdeposition von Schwerionen	xvi
8.3.	Lebenslauf	xviii
8.4.	Publikationen, Tagungsbeiträge und Auszeichnungen	xix
8.5.	Eigen- und Fremdbeiträge der Arbeit	xxii
8.6.	Ehrenwörtliche Erklärung	xxiii
8.7.	Danksagung	xxv

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad
µl	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
53BP1	<i>Tumor suppressor p53-binding protein 1</i>
Abb.	Abbildung
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
APE1	<i>Apurinic/aprimidinic endonuclease</i>
AR-Element	<i>Antioxidant response element</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BER	Basenexisionsreparatur
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Chk2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
CtIP	<i>C-terminal-binding protein interacting protein</i>
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>
DPSS-Laser	<i>Diode pumped solid state laser</i>
DSB	Doppelstrangbruch (<i>double strand break</i>)
EdU	Ethynyldeoxyuridin
eV	Elektronenvolt
F	Fläche
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
g	Gramm
G1-Phase	Phase im Zellzyklus, G von engl. <i>gap</i>
G2-Phase	Phase im Zellzyklus, G von engl. <i>gap</i>
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid

Gy	Gray (Einheit der Energiedosis)
H	Histon
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HR	Homologe Rekombination
Hsp27	<i>Heat shock protein 27</i>
hTNF α	Humanes TNF α
HZE	Hochenergetischen Schwerionen mit höherer Kernladungszahl
I	Intensität
ICRP	<i>International Commission on Radiological Protection</i>
K	Lysin
kBq	Kilobecquerel
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
kV	Kilovolt
l	Liter
LEM	<i>Local effect model</i>
LET	Linearer Energie Transfer
LKB1	<i>Liver kinase B1</i>
LMDS	<i>Locally multiply damaged site</i>
LNT	<i>linear-no-threshold</i>
m	Meter
M	Molar
mA	Milliamper
Mbp	Megabasenpaare
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
me	Methylierung
MeV	Megaelektronenvolt
mg	Milligramm
mGy	Milli-Gray
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mSv	Milli-Sievert
Mre11	<i>Meiotic recombination 11</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
n.s.	Nicht signifikant
NA	Nummerische Apertur
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
Nbs1	Nibrin oder <i>nijmegen breakage syndrome 1</i>
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren

NfκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (<i>Non-homologous End-joining</i>)
nm	Nanometer
Nrf2	<i>Nuclear factor, erythroid 2 like 2</i>
NT	unbehandelt (<i>not treated</i>)
Ogg1	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>
p	Signifikanzwert, p von eng. <i>probability</i>
PBS	Phosphatgepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PP2A	Protein Phosphatase 2A
Rad50	<i>Radiation repair protein 50</i>
RENEB	Realizing the European Network of Biodosimetry
RNF168	<i>RING finger 168</i>
RNF8	<i>RING finger 8</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SE	Standardfehler aus dem Mittelwert (<i>standard error of the mean</i>)
S-Phase	Synthese-Phase im Zellzyklus
Sv	Sievert (Einheit der effektiven Dosis und der Äquivalentdosis)
Tab.	Tabelle
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
u	Atomare Masseneinheit, u von engl. <i>unified atomic mass unit</i>
u.a.	unter anderem
ub	Ubiquitylierung
WLM	<i>Working Level Month</i> (Einheit der Arbeitsmedizin)
WT	Wildtyp
vgl.	vergleiche
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>
XRCC4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 4</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Exposition des Menschen mit ionisierender Strahlung anhand von Beispielen aus dem Alltag	7
Abb. 2:	Ausschnitt der Uran-Radium-Zerfallsreihe in dessen Verlauf Radon (Rn-222) und seine ebenfalls radioaktiven Tochternuklide entstehen.....	9
Abb. 3:	Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen unterscheiden sich durch ihre lokale Energiedeposition.....	13
Abb. 4:	Verteilung der DNA-Schäden nach Exposition mit Radikalen, Niedrig- oder Hoch-LET-Strahlung	15
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade am DNA-Doppelstrangbruch	19
Abb. 6:	DSB-Reparatur über das NHEJ.....	20
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Bestrahlungsgeometrie der Retina-Explantate.....	35
Abb. 8:	Schematische Darstellung des erwarteten Schadensmusters von Schwerionen sowie der geplanten Biodosimetrie	46
Abb. 9:	Die Photorezeptorzellkerne in der murinen Retina sind dicht gepackt und zeigen eine einzigartige Chromatinstruktur	48
Abb. 10:	Lineare Induktion von γ H2AX-Foci in Photorezeptorzellen nach niedrigen Dosen Röntgenstrahlung	49
Abb. 11:	Photorezeptorzellen ermöglichen den Nachweis von Bahnsuren über γ H2AX-Foci nach Bestrahlung mit Titan-Ionen.....	51
Abb. 12:	γ H2AX-Foci im Inneren der Bahnspur sind größer und heller als Foci im äußeren Bereich	54
Abb. 13:	Abstandsabhängige Quantifizierung der γ H2AX-Foci nach der Bestrahlung mit Titan-Ionen korreliert mit der berechneten, physikalischen Dosisdeposition	57
Abb. 14:	Anzahl der γ H2AX-Foci pro Voxel fällt mit zunehmendem Radius nahezu quadratisch ab	59
Abb. 15:	Konfluente HOMSf1-Zellen verfügen über eine geringe Anzahl spontan auftretender DSBs.....	69
Abb. 16:	Lineare Induktion von Foci in HOMSf1-Zellen nach niedrigen Dosen Röntgenstrahlung	71

Abb. 17: HOMSF1-Zellen zeigen bei niedrigen Strahlendosen eine verminderte Reparatureffizienz.....	72
Abb. 18: H ₂ O ₂ stimuliert die DSB-Reparatur nach Bestrahlung.	75
Abb. 19: N-Acetylcystein (NAC) verschlechtert die DSB-Reparatureffizienz nach Bestrahlung.....	78
Abb. 20: Die DSB-Reparatur ist nach Bestrahlung in Leber und Niere stark eingeschränkt und wird in der Lunge durch den vorliegenden oxidativen Stresslevel beeinflusst.....	82
Abb. 21: Die DSB-Reparatur wird in der Niere durch die Bestrahlung mit Nickel-Ionen stimuliert..	85
Abb. 22 Schematische Darstellung der kritischen Rolle des ROS-induzierten oxidativen Stresses in der Zelle bei der Reparatur von DSBs	90
Abb. 23: Die Exposition mit Radon führt zu einer erhöhten DSB-Induktion in der Lunge	105
Abb. 24: Ionenspuren aus großen und signalintensiven 53BP1-Foci treten nur selten auf. ...	108
Abb. 25: 53BP1-Foci innerhalb der Ionenspur repräsentieren mehrere geclusterte DSBs.....	109
Abb. 26: Foci in Ionenspuren treten nach der Bestrahlung von MEF-Zellen mit α -Partikeln häufig auf und repräsentieren geclusterte DSBs.	112
Abb. 27: Aerosolen-anhaftende Tochternuklide des Radons verursachen die hohe Schädigung in der Lunge	114
Abb. 28: Reparatur von komplexen DSBs nach der Radonexposition ist zeitaufwendig.....	116
Code 1: Makro zur Ausgabe von Pixelkoordinaten (X,Y,Z) in einer Stapelaufnahme.....	xv
Tab. 1: Exemplarische Angaben der durchschnittlichen Strahlenexposition für medizinische Untersuchungen aus der Radiologie	11
Tab. 2: Einstellungen für die Bestrahlung von kultivierte Zellen mit Röntgenstrahlen	31
Tab. 3: Verwendete Kombinationen aus Primär- und Sekundärantikörpern sowie ihre Verdünnung	32
Tab. 4: Inkubationsbedingungen für die Dehydrierung und Einbettung von Organen und Retina-Explantaten in Paraffin sowie für die Rehydrierung von Gewebeschnitten....	39
Tab. 5: Verwendete Kombinationen aus Primär- und Sekundärantikörpern sowie ihre Verdünnung	39

Vorwort

Dieses Vorwort soll dem Leser helfen die Struktur und das Konzept der vorliegenden Arbeit leichter zu verstehen. Typischerweise ist eine naturwissenschaftliche Dissertation über Einleitung, Material & Methoden, Ergebnisse und Diskussion in 4 Kapitel gegliedert. Jenes Grundkonzept wurde für diese Arbeit an die Darstellung von drei Projekten angepasst.

In allen Projekten wurden die Konsequenzen von niedrigen bzw. alltäglich vorkommenden Strahlenexpositionen untersucht, jedoch verfügt jedes Projekt über einen anderen thematischen Schwerpunkt. Aus didaktischen Gründen wurde daher jedem Projekt ein eigenes Kapitel gewidmet. Diese Projektkapitel umfassen jeweils die Unterkapitel Ergebnisse und Diskussion, sodass die klassischen großen Kapitel Ergebnisse und Diskussion in der vorliegenden Arbeit zu Gunsten einer in sich geschlossenen Darstellung der Projekte aufgeteilt wurden.

Weiterhin wurden Diskusionelemente innerhalb der Beschreibung der Ergebnisse integriert, wenn die einzelnen Resultate stark aufeinander aufbauten und dies zur Einordnung oder zum Verständnis der darauf folgenden Resultate beitrug.

1. Zusammenfassung / Summary

Menschen sind, ohne es wahrzunehmen, zeitlebens in Kontakt mit ionisierender Strahlung. Für die deutsche Bevölkerung beträgt die durchschnittliche Strahlenexposition circa 4 mSv pro Jahr, die sich aus der natürlich auftretenden und der zivilisatorischen Strahlung zusammen setzt. Das assoziierte gesundheitliche Risiko von solch niedrigen beziehungsweise alltäglichen Strahlenexpositionen wird intensiv und kontrovers diskutiert, was die gesellschaftliche Relevanz von Studien mit niedrigen Strahlendosen unterstreicht. Im Zuge dieser Diskussion können durch molekulare Studien wichtige Erkenntnisse zur Strahlenwirkung auf den Organismus gewonnen werden, die zu einem detaillierten Verständnis beitragen und damit derzeitige Modelle zur Risikoabschätzung verbessern. Ein Ansatzpunkt für molekulare Studien sind die mannigfaltigen Schäden in den Zellen des Organismus, die der Strahlenwirkung zugrundeliegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in drei Projekten mit unterschiedlichen thematischen Schwerpunkten der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) analysiert. Dieser wird als der gefährlichste DNA-Schaden nach einer Strahlenexposition für eine Zelle betrachtet, da er im Vergleich zu anderen DNA-Schäden relativ leicht zum Verlust von genetischer Information führen kann und damit ein erhebliches Risiko für die genetische Integrität der Zelle darstellt.

Im ersten Projekt der vorliegenden Arbeit konnten erstmals umfangreiche biologische Ergebnisse zur Bahnstruktur von Schwerionen für den Vergleich mit den bisher ausschließlich physikalischen Dosimetrieverfahren gewonnen werden. Schwere Ionen sind ein Teil der natürlich auftretenden Strahlung, werden aber auch aufgrund ihrer, im Vergleich zu Röntgenstrahlen, hohen Strahlenwirksamkeit zunehmend in der Tumorthherapie eingesetzt. Die hohe Strahlenwirksamkeit beruht auf der charakteristischen Energiedeposition und Bahnstruktur, welche bei der Bestrahlung von lebenden Zellen ein dreidimensionales Schadensmuster hinterlässt. Dieses Muster ist das Resultat einer hohen Dosisdeposition entlang der Ionenspur sowie einer sehr niedrigen Dosisdeposition von wenigen Milli-Gray im äußeren Bereich um die Ionenspur. Mit der murinen Retina als einzigartiges Modellorgan gelang es, einen Abfall der Dosis im sub- μm -Bereich mit zunehmendem Abstand zur Ionenspur nachzuweisen. Darüber hinaus wurden erste biologische Daten erhoben, die die Existenz einer Hintergrunddosis aufzeigten, welche aus der Dosisaddition zahlreicher, voneinander unabhängiger Bahnstrukturen resultiert. Somit setzt diese Arbeit an dem Punkt an, wo die physikalische Strahlenwirkung in eine biologische Strahlenwirkung übergeht und bietet umfangreiche biologische Daten für die Verifikation von physikalischen Dosimetrieverfahren beziehungsweise den darauf aufbauenden Modellen. Diese werden unter anderem zur Bestrahlungsplanung bei einer Tumorthherapie mit Ionen eingesetzt.

Im zweiten Projekt wurde aufbauend auf vorangegangenen Studien die Reparatur von DSBs nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen analysiert. Für diese Studien wurden Strahlendosen

verwendet, wie sie weltweit tagtäglich in der medizinisch-radiologischen Diagnostik eingesetzt werden. Während für die Induktion von DSBs ein linearer Zusammenhang mit der applizierten Dosis festgestellt wurde, war die anschließende Reparatur der DSBs jedoch stark beeinträchtigt, wenn nur wenige Milli-Gray Röntgenstrahlen appliziert wurden. Erste Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus wurden in der Studie von Grudzenski *et al.* (2010, in PNAS 107:14205-10) beschrieben. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass ein bestimmter ROS-induzierter oxidativer Stress notwendig ist, um die DSB-Reparatur effizient zu aktivieren. Um diese Hypothese zu testen, wurden humane Fibroblasten vor der Bestrahlung mit dem Radikalfänger N-Acetylcystein behandelt. Tatsächlich zeigten mit N-Acetylcystein behandelte Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen eine verschlechterte DSB-Reparatureffizienz. Entsprechende *in vivo* Studien mit der Maus als Modellorganismus bestätigten die physiologische Relevanz dieses Ergebnisses und verdeutlichen damit die kritische Rolle des zellulären Stresslevels auf die DSB-Reparatur.

Im dritten Teilprojekt wurde ebenfalls die Maus als Modellorganismus eingesetzt, um die inhomogene Verteilung von Radon im Körper über die beim Zerfall in lebenden Zellen induzierten DSBs erstmalig biologisch nachzuweisen. Radon ist ein natürlich auftretendes radioaktives Edelgas, welches überall auf der Welt in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommt und zur Strahlenbelastung der Bevölkerung beiträgt. Obwohl die Exposition von Radon ein wesentlicher Risikofaktor bei der Entstehung von Lungenkrebs ist, sind Radon-Kuren ein beliebtes Heilmittel beispielsweise zur Behandlung von Patienten mit entzündlichen Krankheiten des Bewegungsapparates. Da für die Experimente Therapie-relevante Rahmenbedingungen gewählt wurden, spiegelt die innerhalb des Projektes bestimmte Dosis der analysierten Organe die Therapie-assoziierte Strahlenexposition wider. Das gewonnene detaillierte Verständnis zur inhomogenen Verteilung von Radon im Körper und der damit verbundenen biologischen Effekte wird auch bei der Erforschung der bisher ungeklärten therapeutischen Wirkung von Radon bei entzündlichen Erkrankungen helfen. Allgemeiner betrachtet bieten diese umfangreichen biologischen Daten die einzigartige Möglichkeit, die mathematischen Modelle zur Risikoabschätzung von Radonexpositionen biologisch zu verifizieren und entsprechend weiter zu entwickeln.

Zusammengefasst wurden in drei Projekten die Konsequenzen einer Bestrahlung von niedrigen, alltäglich vorkommenden Strahlenexpositionen untersucht. Im Kontext der anhaltenden Diskussion über die Effekte solcher niedrigen Strahlendosen verdeutlicht jedes der Projekte, dass auch niedrige Expositionen zu nicht vernachlässigbaren Effekten führen. Daher ist ein detailliertes Verständnis der Strahlenwirkung essentiell für deren therapeutische Anwendung sowie den Strahlenschutz.

Throughout life, every person is constantly exposed to different types of ionising radiation, without even noticing the exposure. The mean radiation exposure for people living in Germany amounts to approximately 4 mSv per year and encompasses the exposure from natural and man-made sources. The risks associated with exposure to low doses of radiation are still the subject of intense and highly controversial discussions, emphasizing the social relevance of studies investigating the effects of low radiation doses. Molecular studies could provide new insights into the radiation response of cells and organisms, thus contributing to a better understanding of radiation effects and improving current risk assessment models. One approach focuses on the diverse damages induced by ionising radiation in cells of the organism which are the underlying cause for radiation effects. In this thesis, DNA double-strand breaks (DSBs) were analyzed within three projects covering different aspects. DSBs are among the most hazardous DNA lesions induced by ionizing radiation, because this type of damage can easily lead to the loss of genetic information. Consequently, the DSB presents a high risk for the genetic integrity of the cell.

In the first project, extensive results uncovered the track structure of charged particles in a biological model tissue. This provided the first biological data that could be used for comparison with data that were measured or predicted using theoretical physical dosimetry methods and mathematical simulations. Charged particles contribute significantly to the natural radiation exposure and are used increasingly in cancer radiotherapy because they are more efficient in tumor cell killing than X- or γ -rays. The difference in the biological effects of high energy charged particles compared with X- or γ -rays is largely determined by the spatial distribution of their energy deposition and the track structure inducing a three-dimensional damage pattern in living cells. This damage pattern consists of cells directly hit by the particle receiving a high dose and neighboring cells not directly hit by primary particles but exposed to far-reaching secondary electrons (δ -electrons). These cells receive a much lower dose deposition in the order of a few mGy. The radial dose distribution of single particle tracks was assessed with sub- μ m resolution by utilizing the unique morphology of the retina as a model tissue. The analysis revealed a $1/r^2$ dependency of the dose deposition by δ -electrons, which was hitherto only determined with physical approaches in inorganic material. Moreover, the biological measurements indicate the presence of a background dose at larger distances from primary particles, which arises as a result of additive dose contributions from several independent particles. In conclusion, this interdisciplinary project put emphasis on the transition between the physical and the biological radiation effects and provided extensive data for the biological verification of physical measurements and models. Some of these models are used for the planning of tumor treatment with charged particles.

The second project built upon previously obtained data and focused on the investigation of the DSB repair efficiency of cells irradiated with low doses. For this project, radiation doses were selected that are comparable to the doses, which are routinely used during diagnostic medical examinations. While a linear induction of DSBs with the applied dose was detected in human fibroblasts, these cells fail to repair DSBs efficiently after very low doses of X-rays. However, the repair efficiency was increased in cells pre-treated with low concentrations of hydrogen peroxide, suggesting that this induces a response, which is required for the repair of radiation-induced DSBs after exposure to low radiation doses (Grudzinski *et al.*, 2010, PNAS 107:14205-10). One interpretation of this finding is that a certain cellular radical level is required to efficiently activate the repair machinery. To test this hypothesis, we asked if the DSB repair capacity at low doses can be further diminished when cells are treated with a radical scavenger prior to irradiation. Indeed, a decreased DSB repair capacity in cells pre-treated with the radical scavenger N-Acetylcystein was observed. Appropriate *in vivo* experiments with mice confirmed the physiological relevance of our cellular studies and suggests that the cellular radical level is critical for efficient DSB repair after low doses.

In the third project, the inhomogeneous distribution of radon within the body of the mouse was investigated using a biological approach for the first time. To determine the distribution of radon, the DSBs induced by the decay of radon and its daughter nucleotides were quantified in several tissues. Radon is a naturally occurring noble gas, which can be found all over the world in different concentrations and contributes significantly to the natural radiation exposure of the population. Although the exposure to radon is a well-characterized risk factor for the development of lung cancer, radon is a popular remedy for the treatment of patients suffering from painful inflammatory diseases. Since conditions for the animal experiments were comparable to radon therapy sessions, the experimentally detected doses in the organs reflect their therapy-associated radiation exposure. Knowledge of the inhomogeneous radon distribution within the body and its resulting biological effects will help to shed light on the underlying mechanism that results in the therapeutic effect during the treatment of inflammatory diseases. The extensive biological data obtained here generally provides the unique possibility to verify and optimise mathematical models for risk assessment of radon exposures.

Collectively, the three projects of this thesis investigated consequences of the exposure to low radiation doses. The controversy surrounding the effects of low doses is still standing and the presented results support the view that every exposure leads to non-negligible biological effects. Therefore, detailed knowledge of radiation effects is essential for the therapeutic application as well as for radiation protection.

2. Einleitung

2.1. Ionisierende Strahlung ist allgegenwärtig

Ohne es wahrzunehmen, sind Menschen täglich natürlich-auftretender, terrestrischer und kosmischer Strahlung ausgesetzt (Abb. 1). Die Exposition durch terrestrische und kosmische Strahlung auf der Erde variiert je nach Höhe über dem Meeresspiegel, der geographischen Breite, den dominierenden Gesteinsarten einer Region sowie den Lebensgewohnheiten der Menschen. Zusätzlich werden über die Nahrung radioaktive Isotope in den Körper aufgenommen, die, wenn sie im Körper zerfallen, zur Strahlenbelastung beitragen. Aus der natürlichen Strahlenexposition resultiert für ein Mitglied der Bevölkerung in Deutschland eine durchschnittliche effektive Dosis von 2,1 Milli-Sievert (mSv) pro Jahr (1).

Neben der natürlichen Strahlenexposition sind die Menschen zusätzlich in Kontakt mit künstlich erzeugter Strahlung, die auch als zivilisatorische Strahlung bezeichnet wird (Abb. 1). In Deutschland beträgt die mittlere effektive Dosis durch die zivilisatorische Strahlenexposition etwa 1,9 mSv pro Jahr (1). Diese ist hauptsächlich auf die Anwendung von ionisierenden Strahlen in der Medizin zurückzuführen. Andere künstliche Strahlenquellen wie beispielsweise technische Geräte, Kernkraftwerke sowie aus Brennstoffen freigesetzten Radionuklide tragen weniger als 0,05 mSv zur jährlichen Strahlenexposition bei.

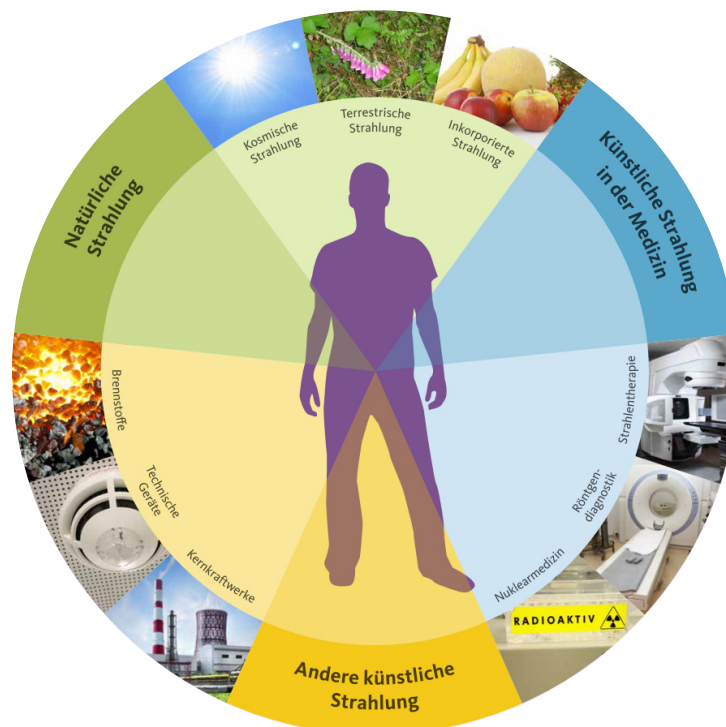


Abb. 1: Exposition des Menschen mit ionisierender Strahlung anhand von Beispielen aus dem Alltag. Die Strahlenexposition setzt sich aus der natürlichen Strahlenexposition (grün), der künstlichen, zivilisatorischen Strahlenexposition durch die Medizin (blau) und anderen künstlichen Strahlenquellen (gelb) zusammen. Vom Poster "Strahlung ist überall" aus der Ausstellung "Strahlenforschung" des Kompetenzverbundes Strahlenforschung (KVFSF)

Die jährliche Strahlenexposition und damit die Strahlenbelastung einzelner Menschen kann von der durchschnittlichen effektiven Dosis für die Bevölkerung in Deutschland (circa 4 mSv pro Jahr) abweichen (1). Entscheidende Faktoren bei der individuellen Strahlenexposition sind der Wohnort, die Ernährungs- und Lebensgewohnheiten eines Menschen sowie die Exposition mit ionisierenden Strahlen bei medizinischen Untersuchungen. Darüber hinaus können Menschen durch ihre berufliche Tätigkeit oder ihren Arbeitsplatz einer erhöhten Strahlenbelastung ausgesetzt sein.

2.1.1. Die terrestrische Strahlenexposition durch Radon

Die terrestrische Strahlung geht von natürlich vorkommenden Radionukliden und ihren Zerfallsprodukten aus, die in den Böden und Gesteinen der Erdkruste vorhanden sind. Eines dieser Zerfallsprodukte ist das radioaktive Edelgas Radon, welches mit circa 1,1 mSv pro Jahr wesentlich zur natürlichen Strahlenexposition in Deutschland beiträgt (1).

Das stabilste und damit biologisch relevanteste Radon-Isotop ist Radon-222 (künftig als Radon bezeichnet) mit einer Halbwertszeit von 3,8 Tagen. Es entsteht innerhalb der Uran-Radium-Zerfallsreihe (Abb. 2), weshalb sein Vorkommen vom regionalen Anteil uranhaltiger Gesteine abhängt. Aufgrund seiner Edelgaseigenschaften ist Radon relativ reaktionsträge. Es kann daher über Risse und Spalten aus dem Erdreich entweichen und sich in geschlossenen bzw. schlecht durchlüfteten Keller- oder Wohnräumen in der Atemluft anreichern. Vermischt mit der Atemluft wird Radon wegen seiner langen Halbwertszeit zum größten Teil ein- und wieder ausgeatmet. Zerfällt Radon, entstehen kurzlebiger Tochterprodukte wie das Polonium-214 mit einer Halbwertszeit von wenigen Mikrosekunden und das Polonium-218 mit einer Halbwertszeit von drei Minuten (Abb. 2). Diese haben keine Edelgaseigenschaften und können sich an kleinste Partikel in der Atemluft, sogenannte Aerosole, heften. Gelangen die radioaktiven Aerosole in die Atemwege, adhären diese wie andere Partikel der Atemluft an den Epithelzellen der Lunge. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Poloniums erfolgt dessen weiterer Zerfall in der Lunge, wobei energiereiche α -Strahlung emittiert wird. Diese schädigt die Zellen der Lunge und kann die Entstehung von Lungenkrebs begünstigen. Daher geht die gesundheitliche Gefährdung durch eine chronische Radon-Exposition weniger vom Radon selbst als von seinen kurzlebigen radioaktiven Zerfallsprodukten aus (2, 3).

Der Zusammenhang zwischen der Radonkonzentration in Wohnräumen und dem Auftreten von Lungenkrebs wurde in epidemiologischen Studien untersucht und konnte von diesen bestätigt werden (2, 4-6). Die größte epidemiologische Studie zur Gefährdung durch Radon in Wohnräumen wurde von Darby *et al.* durchgeführt, bei welcher die Daten von 13 europäischen Studien gemeinsam analysiert wurden (2). Bei einer durchschnittlichen Radon-Aktivitätskonzentration in europäischen Wohnungen von 59 Becquerel (Bq)/m³ wurden 8 % der jährlichen

Todesfälle durch Lungenkrebs (18.000 Menschen) auf eine chronische Radonexposition zurückgeführt (2, 5, 7). Die zugrundeliegende Dosis-Wirkungsbeziehung ist wahrscheinlich linear, wobei kein Hinweis auf einen Schwellenwert gefunden wurde (2, 8). Dies impliziert, dass keine noch so geringe Radonexposition ungefährlich ist. Eine in Deutschland durchgeführte Studie von Menzler *et al* zeigte bei einer durchschnittlichen Radon-Aktivitätskonzentration in Wohnungen von 49 Bq/m^3 , dass 5 % Todesfälle durch Lungenkrebs pro Jahr (1.900 von 37.000 Fällen) auf eine Radonexposition zurückgeführt werden können (9).

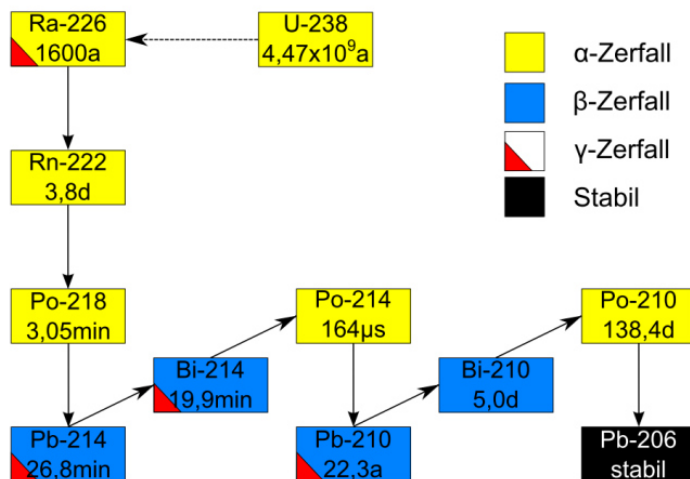


Abb. 2: Ausschnitt der Uran-Radium-Zerfallsreihe in dessen Verlauf Radon (Rn-222) und seine ebenfalls radioaktiven Tochternuklide entstehen. Für die auftretenden Tochternuklide ist deren Halbwertszeit sowie die Art ihres Zerfalls durch die farbliche Hinterlegung angegeben. Von A. Maier (10)

2.1.2. Die kosmische Strahlenexposition durch Schwerionen

Die kosmische Strahlung ist eine hochenergetische Teilchenstrahlung, die von der Sonne und aus den Tiefen des Weltalls zur Erde gelangt. Sie besteht aus einer galaktischen Komponente und einer solaren Strahlungskomponente, die häufig auch als Sonnenwind bezeichnet wird. Beim Sonnenwind handelt es sich um niederenergetische Protonen (85 %), Alphateilchen (13 %) und Elektronen (2 %), die bereits von den oberen Atmosphärenschichten der Erde absorbiert werden. Daher trägt der Sonnenwind nicht zur Strahlenexposition auf der Erde bei. In den Polargebieten der Erde kann die Wechselwirkung von starken Sonnenwinden mit den Luftmolekülen der Atmosphäre als Polarlichter beobachtet werden (11, 12).

Die galaktische Komponente der kosmischen Strahlen besteht aus 88 % Protonen, 11 % Alphateilchen, 2 % Elektronen und 1 % schwereren Nukliden (Schwerionen). Diese Teilchen können sehr hohe Energien von mehreren 100 bis 1000 Mega-Elektronenvolt aufweisen (11). Beim Auftreffen dieser primären kosmischen Teilchenstrahlung auf die Luftmoleküle der Erdatmosphäre kommt es zu Elementarteilchenreaktionen, die einen Teilchenschauer mit einer großen Anzahl an Sekundärteilchen auslösen. Die dabei entstehende Strahlung nennt man sekundäre kosmische Strahlung, von der aber nur ein geringer Teil die Erdoberfläche erreicht. Die Intensität der kosmischen Strahlung hängt somit von der Höhe über dem Meeresspiegel ab.

Sie ist beispielsweise auf der Zugspitze viermal höher als an der Küste (11). Bei einer Flugreise von London nach New-York und zurück sind die Passagiere sowie die Besatzung des Flugzeuges einer Strahlenexposition von ca. 0,1 mSv ausgesetzt (13). Da die Besatzung abhängig von den Flugstrecken einer erhöhten Strahlenbelastung durch kosmische Strahlung ausgesetzt ist, wird ihre Strahlenexposition seit 2003 überwacht (1).

Während die kosmische Strahlenexposition für die Bevölkerung durch die Erdatmosphäre abgeschwächt wird, sind Astronauten dieser Strahlung direkt ausgesetzt. Sie erhalten mit ca. 0,1 mSv pro Tag eine zehnfach höhere Dosis als die Bevölkerung auf der Erde (13). Die Hälfte der Strahlenbelastung ist auf Schwerionen oder sogenannte HZE-Partikel zurückzuführen, die eine hohe Ordnungszahl und Energie aufweisen (14, 15). Diese sind zwar nur ein kleiner Bestandteil der Strahlung, können aber wegen ihrer hohen Energie nicht vom Raumschiff abgeschirmt werden und sind biologisch hoch wirkungsvoll (siehe auch Kapitel 1.3). Was in diesem Fall gefährlich für die genetische Integrität der Zellen des Astronauten ist und bei der Risikoabschätzung von längeren Weltraummissionen intensiv diskutiert wird, wird unter streng kontrollierten Bedingungen in der Tumorthherapie mit Kohlenstoffionen ausgenutzt (16-19).

2.1.3. Die zivilisatorische Strahlenexposition in der Medizin

Ionisierende Strahlen werden in der Medizin im Rahmen einer Strahlentherapie zur Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt. Dabei sollen die Tumorzellen durch die Bestrahlung mit sehr hohen Strahlendosen und den so induzierten Schäden idealerweise abgetötet werden. Die Tumorzellen werden je nach Tumorentität typischerweise in Fraktionen von 1-2 Gray (Gy) bestrahlt, bis eine Gesamtdosis von 40-70 Gy erreicht ist. Neben der klassischen Strahlentherapie mit Photonen können seit 2009 in Heidelberg bzw. seit 2015 in Marburg auch Kohlenstoffionen zur Strahlentherapie von besonders strahlenresistenten Tumoren eingesetzt werden. Für diese Standorte wurde die Strahlentherapie mit Kohlenstoffionen am Schwerionenbeschleuniger des Helmholtzzentrums für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt erprobt, weiterentwickelt und für die klinische Anwendung etabliert (20-22). Durch die präzise, lokale Dosisdeposition, die mit den Kohlenstoffionen erreicht wird, können auch Tumore in der Nähe von strahlenempfindlichen Organen oder deren Substrukturen bestrahlt werden (23-26).

Neben der Anwendung in der Strahlentherapie werden geringere Dosen von ionisierender Strahlung in der Diagnostik beispielweise bei einer Röntgenaufnahme oder einer Computertomographie (CT) eingesetzt (siehe Tab. 1). Die Einführung des CTs im Jahr 1970 revolutionierte die Bildgebung in der Diagnostik, sodass dessen Einsatz in der Diagnostik in den vergangenen zwei Jahrzehnten stark zugenommen hat (27, 28). Dies ist auf die zunehmende Verbreitung der CT-Geräte in den Kliniken sowie auf deren technischen Weiterentwicklung zurückzuführen, was dem CT immer mehr Anwendungsfelder in der Medizin eröffnete. Doch

neben dem nicht infrage gestellten Nutzen des CTs ist die Strahlenbelastung im Vergleich zur konventionellen Röntgenaufnahme um ein vielfaches höher. Bereits 2001 wiesen von Brenner *et al.* durchgeführte Modellrechnungen, die auf den Daten von Atombombenüberlebenden basierten, auf ein erhöhtes Krebsrisiko durch die Exposition von Kindern mit ionisierender Strahlung im CT hin (29).

Tab. 1: Exemplarische Angaben der durchschnittlichen Strahlenexposition für medizinische Untersuchungen aus der Radiologie. Alle Dosisangaben beziehen sich auf eine Ganzkörperdosis, ausgenommen der Angaben zu Dosen, die, mit einem Sternchen markiert, für spezifische Organe angegeben sind. Im Strahlenschutz wird die effektive Dosis in der Einheit Sievert verwendet, welche einen Strahlenwichtungsfaktor für verschiedene Strahlenarten sowie die Strahlenempfindlichkeit verschiedener Organe bei der Berechnung der Ganzkörperdosis berücksichtigt. Für eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, wie sie in der Radiologie verwendet werden, ist der Strahlenwichtungsfaktor 1, sodass der angegebene Zahlenwert unverändert bleibt. Zusammengestellt nach Studien von D.J. Brenner *et al.* und F.A. Mettler (13, 30).

Medizinische Untersuchung	Durchschnittliche Dosis
Röntgenaufnahme der Extremitäten	0,0002-0,1 mSv
Röntgenaufnahme des Kopfes	0,03-0,22 mSv
Computertomographie des Kopfes	0,9-4 mSv
<i>Organdosis für die Augenlinse*</i>	30-50 mSv
Computertomographie des Brustkorbs	4-18 mSv
<i>Organdosis für die Brust*</i>	20-60 mSv
Weitere Strahlenexpositionen im Vergleich	
natürliche Hintergrundstrahlung auf der Erde	0,01 mSv pro Tag
natürliche Hintergrundstrahlung im Weltraum	0,1 mSv pro Tag
Transatlantikflug (Hin- und Rückflug)	0,1 mSv
Expositionslimit von Nukleararbeitern (ICRP 1991)	20 mSv pro Jahr

Der Zusammenhang zwischen der Strahlenexposition von Kindern im CT und einer späteren Entstehung von Tumorerkrankungen wurde weltweit in epidemiologischen Studien untersucht. Seit 2012 wurden die Ergebnisse von epidemiologischen Studien aus Großbritannien (31, 32), Australien (33), Taiwan (34), Frankreich (35) und Deutschland (36) veröffentlicht, die ein erhöhtes Krebsrisiko nach Exposition mit ionisierender Strahlung durch eine oder mehrere CT-Untersuchungen für Kinder und Jugendliche bestätigten. In diesen Studien wurde ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Leukämien und Hirntumoren festgestellt (31-34, 36). Patienten, die eine Computertomographie aufgrund eines Tumorverdachtes bekamen, wurden in den Studien aus Deutschland (36), Frankreich (35) und der neuen Studie aus Großbritannien (31) ausgeschlossen. Dazu wurde der medizinische Hintergrund des jeweiligen Patienten analysiert sowie eine entsprechenden Zeitspanne zwischen der ersten CT-Untersuchung und der Diagnose des Tumors berücksichtigt. Für Deutschland wurden von Krille *et al.* die Daten von 45.000 Kindern analysiert, die im Zeitraum von 1980 bis 2010 vor ihrem 13. Lebensjahr eine oder mehrere CT-Untersuchungen bekamen (36). Ausgehend von den insgesamt ca. 21.000 Kindern unter 13 Jahren, bei denen in Deutschland pro Jahr eine oder mehrere CT-

Untersuchungen durchgeführt werden, ist das zusätzliche Auftreten von 2,3 Leukämien und einem Tumor des Zentralen-Nervensystems durch die Strahlenexposition im CT zu erwarten.

Die Methoden und Ergebnisse dieser Studien werden immer noch kritisch und intensiv diskutiert (37, 38). Häufige Kritikpunkte am Studiendesign sind die folgenden Fragen: wurde das CT nicht aufgrund eines Tumorverdachtes durchgeführt, was aufgrund von nicht-standardisierter Formulare zum Teil nicht zweifelsfrei auszuschließen ist; kann das erhöhte Risiko auf Kinder mit einer Prädisposition für die Entwicklung bestimmter Tumore zurückgeführt werden (35, 39, 40); ist die bisherige Beobachtungszeit der Patienten von vier bis zehn Jahren ausreichend, um eine valide Aussage über das Risiko zu treffen. Eine zusätzliche Problematik ist, dass die individuell applizierte Dosis (bzw. die Organdosis) während des CTs nicht bekannt ist. Diese Limitationen der bisherigen Studien sollen in einer großen europäischen Studie, der EPI-CT, adressiert werden (41, 42). Im Rahmen von EPI-CT sollen über eine Million Patienten aus 9 Ländern rekrutiert und über eine lange Zeit medizinisch begleitet werden. Durch die Kohortengröße und ein standardisiertes Protokoll können kritische Einflussgrößen, wie mögliche Prädispositionen und die Latenzzeit für das Auftreten von verschiedenen Tumorarten genauer untersucht werden. Darüber hinaus sieht die Studie eine genaue Altersklassen-entsprechende Berechnung der Organdosen vor, sodass auch der unterschiedliche, körperliche Entwicklungsstand der Kinder berücksichtigt wird (42).

Die anhaltenden, kontroversen Diskussionen und die vorgenommenen Anstrengungen mit EPI-CT eine große europäische Studie zu initiieren, verdeutlichen die gesellschaftliche Relevanz von Studien zur Auswirkung niedriger Strahlenexpositionen (13, 37, 38, 41-43). Darüber hinaus können molekulare Studien in kultivierten Zellen sowie in Modellorganismen helfen, um die Schadensantwort nach Exposition mit niedrigen Strahlendosen zu charakterisieren und zugrundeliegende Mechanismen besser zu verstehen.

2.2. Was macht ionisierende Strahlung für den Organismus so gefährlich?

Ionisierende Strahlung umfasst elektromagnetische Strahlung (Röntgen- oder γ -Strahlung) und Teilchenstrahlung. Bei der Wechselwirkung mit anderen Atomen ist ionisierende Strahlung in der Lage Elektronen aus der Atomhülle herauszulösen. Durch den Verlust eines Elektrons wird das Atom positiv geladen und bleibt als Ion zurück, weshalb dieser Prozess als Ionisation bezeichnet wird. Ist dieses Atom in ein Makromolekül eingebunden, beeinflusst dessen positive Ladung zunächst die chemischen Eigenschaften des Moleküls, da beispielsweise atomare Bindungen aufgebrochen werden. Werden dabei funktionelle Gruppen für die Reaktionen mit anderen Molekülen modifiziert, verändert dies auch die biologischen Eigenschaften des

Moleküls. Ein besonders wichtiges Molekül innerhalb der Zelle ist die DNA. Schädigungen der DNA können zum Verlust von genetischer Information führen und durch einen mehrstufigen Prozess, der weitere Veränderungen im Stoffwechsel der Zelle einschließt, bis hin zur malignen Transformation der Zelle führen (44-47).

Die Ausprägung des biologischen Effektes nach einer Exposition des Organismus mit ionisierender Strahlung ist von der Strahlenart und deren Energiedeposition abhängig. Ein klassisches Beispiel ist hier die höhere biologische Wirksamkeit von Kohlenstoff-Ionen im Vergleich zur Röntgenstrahlen, was derzeit zunehmend in der Behandlung von Tumoren ausgenutzt wird. Dieser Effekt ist auf die unterschiedliche räumliche Verteilung der Energie im bestrahlten Volumen, beispielsweise einer Zelle zurückzuführen. Während Röntgenstrahlen ihre Energie homogen auf die bestrahlte Zelle übertragen, deponieren die Kohlenstoff-Ionen ihre Energie entlang einer sogenannten Bahnspur durch die Zelle und erzeugen so zahlreiche Schäden in räumlicher Nähe (Abb. 3).

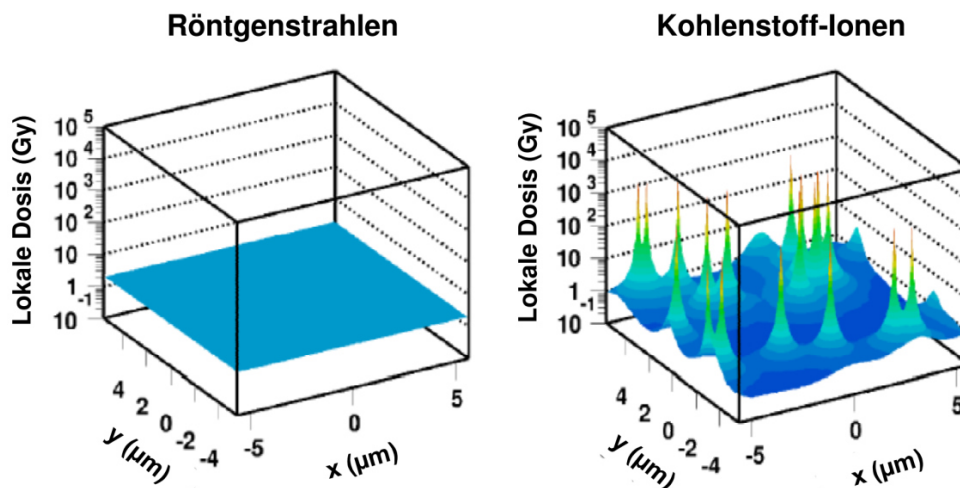


Abb. 3: Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen unterscheiden sich durch ihre lokale Energiedeposition. Dargestellt ist die Verteilung der Energiedeposition durch eine Exposition mit 2 Gy Röntgenstrahlen sowie mit 2 Gy Kohlenstoff-Ionen. Der gezeigte Ausschnitt entspricht der Größe eines typischen Fibroblastenzellkerns. Frei modifiziert nach M. Scholz (48)

Wie viel Energie entlang des Weges der Strahlung in der durchdrungenen Materie deponiert wird, wird durch den Linearen Energie Transfer (LET) beschrieben, der typischerweise in der Einheit $\text{keV}/\mu\text{m}$ angegeben wird. Allgemein ist der LET von der Geschwindigkeit und der Kernladungszahl des Teilchens bzw. von der Frequenz bei elektromagnetischer Strahlung abhängig. Röntgen- und γ -Strahlung (Photonen) aber auch β -Strahlung (Elektronen) wird ein niedriger LET zugeordnet, da nur wenige Ionisationen in räumlicher Nähe erfolgen. α -Teilchen sowie Schwerionen hingegen wird ein hoher LET zugeordnet, da durch die räumlich stark-begrenzte, hohe Energiedeposition viele Ionisationen in räumlicher Nähe erfolgen. Um diese Unterschiede genauer zu verstehen, müssen die zugrundeliegenden, physikalischen Wechselwirkung der verschiedenen Strahlenarten mit der Materie sowie deren Auswirkung auf die DNA betrachtet werden.

2.2.1. Physikalische Wechselwirkungen von Photonen mit Materie und die Auswirkung dieser Interaktion auf die DNA

Photonen besitzen keine elektrische Ladung, daher ist die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung mit der durchdrungenen Materie generell geringer als bei geladenen Teilchen. Photonen können in Abhängigkeit ihrer Energie mit den Atomhüllen oder den Atomkernen der durchdrungenen Materie wechselwirken. Bei einer Wechselwirkung der Photonen mit der Atomhülle kommt es zu einer Streuung (Richtungsänderung), die ohne Energieübertragung stattfindet. Alternativ wechselwirken sie über den Photo- und den Comptoneffekt, wobei eine Energieübertragung erfolgt. Bei der Übertragung von Energie auf ein Elektron der Atomhülle wird dieses aus dem Atomverband gelöst, was zur Ionisation des Energie-absorbierenden Atoms führt. Bei der Wechselwirkung von hochenergetischen Photonen ($> 1 \text{ MeV}$) mit dem elektrischen Feld des Atomkerns kann die Energie des Photons in ein Elektron und ein Positron (Paarbildung) umgewandelt werden. Durch die Ionisation freigesetzte Elektronen werden als Sekundärelektronen bezeichnet und können in Abhängigkeit von ihrer Energie weitere Atome bzw. Moleküle anregen oder Ionisationen durchführen. Aufgrund ihrer Ladung und geringen Masse wechselwirken die Sekundärelektronen mit nahezu allen passierten Atomen und werden dabei häufig von diesen gestreut. So erzeugen die Elektronen eine homogene Dosisdeposition in der von Röntgenstrahlen durchdrungenen Materie, weshalb die Röntgenstrahlung auch oft als indirekt ionisierende Strahlung bezeichnet wird.

In der Zelle wechselwirken die Photonen sowie bereits entstandene Sekundärelektronen hauptsächlich mit Wassermolekülen. Bei der Ionisation von Wassermolekülen entstehen neben Sekundärelektronen auch hochreaktive Radikale, wie beispielsweise das Hydroxylradikal. Dieser Prozess wird als Radiolyse bezeichnet. Aufgrund der homogenen Dosisdeposition liegen die meisten Elektron-vermittelten Ionisationen von Molekülen sowie die resultierenden Radikale relativ isoliert voneinander vor (Abb. 4A+B; 10 keV Elektron). Dadurch werden hauptsächlich isolierte Schäden am Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA sowie Verluste und Modifikationen von DNA-Basen induziert. Einige dieser Schäden am Zucker-Phosphat-Rückgrat können zur Entstehung von Einzelstrangbrüchen führen. Treten lokal zwei Einzelstrangbrüche auf den gegenüberliegenden DNA-Strängen auf, können diese zur Induktion eines Doppelstrangbruches (engl. *double strand break*, DSB) führen. Durch die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen werden DSBs im Verhältnis zu den anderen DNA-Schäden (je Schadensart ungefähr 20:1) nur relativ selten erzeugt (49). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Ionisationsdichte zur Erzeugung eines DSBs nur von sogenannten *Track-end* Elektronen erreicht wird (Abb. 4B; 0,5 keV Elektron). Diese Elektronen besitzen nur noch eine geringe kinetische Energie und können aufgrund ihrer geringeren Geschwindigkeit, mit der sie die Materie durchdringen, mehr Wechselwirkungen mit den passierten Molekülen eingehen und somit mehr Ionisationen in räumlicher Nähe erzeugen.

2.2.2. Physikalische Wechselwirkungen von geladenen Teilchen mit Materie und die Auswirkung dieser Interaktion auf die DNA

Im Gegensatz zu Photonen wechselwirken geladene Teilchen aufgrund ihres umgebenden, elektrischen Feldes mit nahezu allen passierten Atomen. Geladene Teilchen können in Abhängigkeit ihres Abstandes zum Kern des wechselwirkenden Atoms mit dessen Atomhülle oder dem Coulomb-Feld des Atomkerns wechselwirken. Neben der elastischen Streuung wechselwirken die geladenen Teilchen bei großem Abstand zum Atom (in der durchdrungenen Materie) über sogenannte weiche Stöße mit den äußeren Hüllenelektronen, die dadurch aus dem Atomverband gelöst werden und somit zur Ionisation des Atoms führt. Wenn der Abstand zwischen dem geladenen Teilchen und dem wechselwirkenden Atom ungefähr dem Atomradius entspricht, kommt es zu harten Stößen, wobei innere Elektronen der Atomhülle mit hohen kinetischen Energien freigesetzt werden. Diese Elektronen werden aufgrund ihrer hohen Energie und ihres größeren Streuwinkels als δ -Elektronen bezeichnet. Die freigesetzten Sekundär- und δ -Elektronen können in Abhängigkeit ihrer Energie weitere Ionisationen durchführen. Durch die häufige Interaktion von geladenen Teilchen mit hohem LET, wie α -Teilchen und Schwerionen, mit den Atomen der durchdrungenen Materie werden viele Ionisationen in geringem Abstand zueinander erzeugt und so zahlreiche Elektronen freigesetzt, was zur inhomogenen Dosisdeposition entlang der Bahnspur der Teilchen führt.

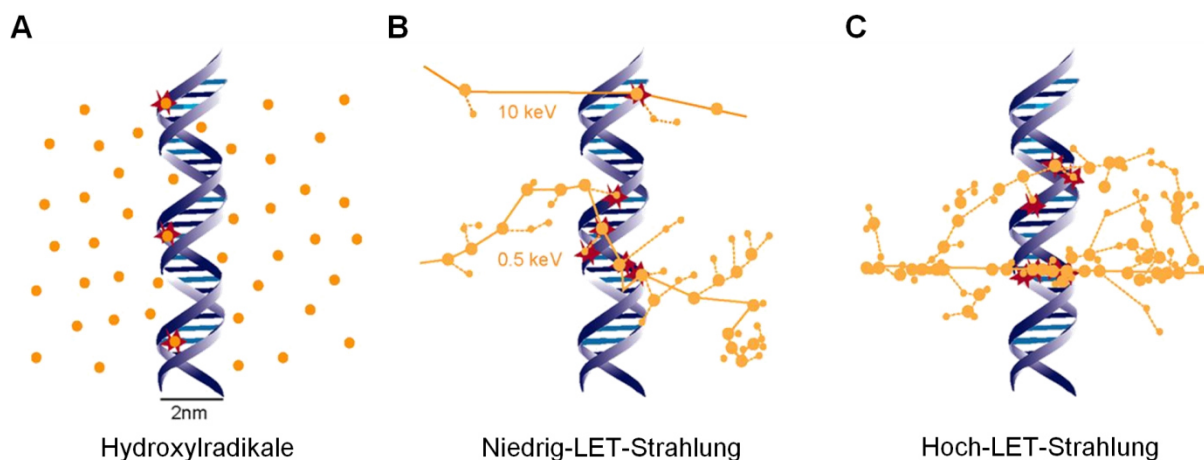


Abb. 4: Verteilung der DNA-Schäden nach Exposition mit Radikalen, Niedrig- oder Hoch-LET-Strahlung. (A+B) Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$), die durch Wasserstoffperoxid generiert wurden, sind homogen verteilt und erzeugen voneinander isolierte DNA-Schäden. Dies ist auch der Fall, wenn die Radikale durch Elektronen mit einer Energie von 10 keV generiert werden, sodass die Elektronen wie auch die entstehenden Radikale voneinander isolierte DNA-Schäden erzeugen. Wenn das Elektron (0,5 keV) den größten Teil seiner Energie verloren hat und die Ionisationen (und damit auch die Radikalbildung) entlang des Weges durch die durchdrungenen Materie zunehmen, steigt die Komplexität der induzierten DNA-Schäden (Track-end Elektronen). Durch die Schädigung der gegenüberliegenden DNA-Stränge in räumlicher Nähe können auch DSBs entstehen. (C) Bei einer weiteren Erhöhung des LETs (10 keV Elektron < 0,5 keV Elektron < 4 MeV α -Partikel) steigt die Ionisationsdichte entlang des Weges des Partikels durch die durchdrungene Materie weiter an. Dies führt zu einer weiteren Zunahme der Komplexität der DNA-Schäden. DSBs sowie andere DNA-Schäden können nun mit weiteren DNA-Schäden als Cluster auftreten. (A-C) Große Punkte symbolisieren Ionisationen und kleine Punkte die Anregung von Atomen entlang des Weges des Partikels durch die durchdrungene Materie. Bei der Darstellung der Energiedeposition eines 0,5 MeV Elektrons sowie eines 4 MeV α -Partikels handelt es sich um eine neue Illustration der Monte Carlo-Simulation von D.T. Goodhead (50). Frei nach Schipler et al. (51)

Im Zellkern erfolgt die Schädigung der DNA durch die Schwerionen häufig über eine direkte Ionisation im DNA-Molekül. Aufgrund der hohen Ionisationsdichte innerhalb der Ionenspur steigt neben der Anzahl der Sekundär- und δ -Elektronen auch die lokale Radikalkonzentration stark an. Dies hat zur Folge, dass die induzierten DNA-Schäden, beispielsweise DSBs, Einzelstrangbrüche und Basenschäden, häufig als Cluster, dem sogenannten *locally multiply damaged site* (LMDS) auftreten (Abb. 4C) (52-54). Wenn zwei LMDSs mit einem DSB innerhalb eines Chromatinloops (höhere Strukturorganisation der DNA, die ca. 1,6 Mbp umfasst) vorliegen, kann dies zur Instabilisierung des Loops und zum Verlust des entstandenen DNA-Fragmentes führen. Abbildung 4 zeigt ein exemplarisches Schadensmuster eines α -Partikels (Hoch-LET-Strahlung), dass zum Verlust eines kleinen DNA-Fragmentes und somit zum Verlust von genetischer Information führen kann. Durch die Sekundär- und δ -Elektronen können auch isolierte Einzelstrangbrüche, Basenschäden sowie DSBs abseits der Ionenspur auftreten.

Eine Besonderheit der Bahnspur von Schwerionen (α -Partikel eingeschlossen) ist, dass die Energiedeposition und damit auch die Schadensinduktion nicht auf die direkte Spur des Ions selbst begrenzt ist. Die Energiedeposition dehnt sich in Abhängigkeit der Energie des Ions durch die freigesetzten Elektronen lateral aus. Bei α -Partikeln haben die Sekundärelektronen nur eine geringe Reichweite, während sie bei hochenergetischen Schwerionen mit höherer Kernladungszahl (HZE-Partikeln) eine Reichweite von mehreren Zentimetern aufweisen können. Entsprechend der klassischen Theorie der Bahnspur von Schwerionen wird etwa die Hälfte der Energiedeposition eines hochenergetischen Ions nahe an dessen Trajektorie in der durchdrungenen Materie deponiert, während die restliche Energiedeposition durch δ -Elektronen abseits der Ionenspur erfolgt (55). Daher repräsentiert die Energiedeposition der δ -Elektronen eine dünn-ionisierende, der Photonenbestrahlung vergleichbare Komponente innerhalb der Bahnspur von hochenergetischen Ionen.

2.3. Schutz- und Reparaturmechanismen der Zelle

Zellen besitzen verschiedene Mechanismen, um die Ausbildung von strahleninduzierten Schäden wenn möglich zu verhindern und entstandene DNA-Schäden zu reparieren. Diese Mechanismen sind in der Zelle entstanden, da ihre genetische Integrität nicht nur durch exogene Faktoren wie einer Exposition mit ionisierender Strahlung gefährdet ist, sondern auch durch endogene Prozesse. Einige bekannte Beispiele sind: die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) während des Zellmetabolismus' (56), die oxidativen Stress erzeugen und so zu oxidativen Basenschäden führen können; die im Immunsystem zur Produktion von Antikörpern durchgeführte V(D)J-Rekombination, bei der gezielt DSBs erzeugt werden (57); die

Replikation der DNA in der S-Phase, wobei durch den Kollaps von Replikationsgabeln oder durch andere DNA-Schäden in der zu replizierenden DNA häufig DSBs entstehen (58-60).

Um zelluläre Schäden durch Radikale bzw. ROS und den resultierenden oxidativen Stress in der Zelle zu verhindern, können diese durch Antioxidantien sowie antioxidative Enzyme abgefangen werden. Ein wichtiges zelluläres Antioxidans ist Glutathion (GSH), ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutamin, Glycin und Cystein. In einer chemischen Reaktion werden die Radikale durch die Übertragung eines Elektrons und eines Protons chemisch reduziert und so unschädlich gemacht. Dabei wird das Glutathion selbst oxidiert und bildet eine Disulfidbrücke zu einem weiteren Glutathionmolekül (GSSG) aus. Neben der Übertragung von Elektronen auf ROS, kann Glutathion auch oxidierte Vitamine regenerieren, die in ihrer reduzierten Form ebenfalls als Antioxidantien wirken. GSSG kann durch das Enzym Glutathionreduktase wieder regeneriert werden, sodass die zwei GSH-Moleküle für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen. Die Entgiftung von ROS ist ein komplexer Vorgang und wird auch von Enzymen, wie der Superoxiddismutase und der Katalase unterstützt. Darüber hinaus werden durch den in der Zelle vorliegenden, oxidativen Stress weitere Signalwege und Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Nrf2 (*nuclear factor, erythroid 2 like 2*) aktiviert, die die antioxidative Zellantwort unterstützen und diese regulieren (61, 62).

Dennoch entstandene, geschädigte Proteine werden kontrolliert abgebaut (Autophagy) und von der Zelle neu hergestellt, während Schäden an der DNA von der Zelle repariert werden können. Die Induktion von DNA-Schäden kann in der Veränderung einzelner Basen (z.B. durch Methylierungen, Alkylierungen, Oxygenierungen) bestehen oder in der Induktion von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen (49, 63). Einzelstrangbrüche und Basenschäden können effektiv durch die Basenexzisionsreparatur, die Nukleotidexzisionsreparatur oder Mismatchreparatur repariert werden, wobei der intakte DNA-Strang als Matrize dient. Die Reparatur von strahleninduzierten DSBs ist dagegen schwieriger. Dies ist einerseits auf die Durchtrennung der beiden gegenüberliegenden DNA-Stränge (Zucker-Phosphat-Rückgrat) zurückzuführen; andererseits können DSBs zur Entstehung von komplexeren Schäden beitragen, wenn diese in Clustern oder assoziiert mit anderen DNA-Schäden (LMDS) auftreten. Da es durch einen DSBs leicht zum Verlust genetischer Information kommen kann, werden diese aufgrund des hohen Risikos für die genetische Integrität allgemein als gefährlichster DNA-Schaden betrachtet. Dennoch bergen prinzipiell alle unreparierten oder falsch reparierten DNA-Schäden das Risiko Mutationen zu induzieren, durch welche Erbkrankheiten oder Tumore entstehen können. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Zelle neben den Reparaturmechanismen auch Mechanismen besitzt, um bei schwerwiegenden Schäden das Zellwachstum einzustellen (Seneszenz) oder kontrolliert abzusterben (Apoptose).

2.3.1. Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Zellen verfügen über Signaltransduktionskaskaden, die zur Schadenserkenkung des DSBs und dessen Reparatur dienen. Als zentrale Komponenten für die DSB-Erkennung gelten die Serin-Threonin-Kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und der MRN-Komplex bestehend aus Mre11 (*meiotic recombination 11*), Rad50 (*radiation repair protein 50*) und Nbs1 (*Nibrin* oder *nijmegen breakage syndrome 1*). Der MRN-Komplex bindet an die freien Enden des DSBs und rekrutiert ATM zum Bruch, woraufhin ATM durch eine Autophosphorylierung am Serin 1981 aktiviert wird (Abb. 5A; (64-70)). Die aktivierte Kinase ATM (pATM) phosphoryliert die zu 2-10 % natürlich vorkommende Histonvariante H2AX am Serin 139 zum sogenannten γ H2AX (71). Diese Phosphorylierung kann auch durch die Kinase DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) sowie in der S- und G2-Phase des Zellzykluses bzw. in der Anwesenheit von einzelsträngiger DNA durch die Kinase ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) erfolgen (72, 73).

γ H2AX dient als Plattform für die Aktivierung, Rekrutierung und den Verbleib verschiedenster Reparaturfaktoren und ist daher von besonderer Bedeutung für den weiteren Fortgang der Signalkaskade (74). Durch die Bindung von MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) an γ H2AX wird ein positiver *Feedback-loop* über die Rekrutierung des MRN-Komplexes und pATM ausgelöst (Abb. 5A+B; (75, 76)). Über diesen *Feedback-loop* wird H2AX im Bereich von 2 Mbp um die Bruchstelle herum zu γ H2AX phosphoryliert (72). Neben der Phosphorylierung des H2AX zu γ H2AX erfolgen mit der Ubiquitynylierung von Lysin 13 bzw. Lysin 15 des Histons H2A am Bruchende weitere Histonmodifikationen. Die Ubiquitynylierung erfolgt durch die E3 Ubiquitinligase RNF8 (*RING finger 8*) und RNF168 (*RING finger 168*) (Abb. 5B; (77-79)). Die Polyubiquitynylierung des Histons H2A (H2AK13ub bzw. K15ub) erlaubt die Rekrutierung des Mediatorproteins 53BP1 (*Tumor suppressor p53-binding protein 1*) zum Bruch (Abb. 5C), welches H2AK15ub und die nun sterisch zugängliche mono- oder di-Methylierung des Histons H4 (H4K20me) bindet (80-82).

2.3.2. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die anschließende Reparatur von strahleninduzierten DSBs wird in Zellen in der G0/G1-Phase, wie sie im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurde, über das Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) vorgenommen. Es stellt in Säugern den wesentlichen Reparaturweg für DSBs im gesamten Zellzyklus dar und basiert auf einer einfachen Ligation der gebrochenen DNA-Enden. Der zweite zentrale Reparaturweg, die Homologe Rekombination (HR) ist nur für Zellen in der S- und G2-Phase möglich, da die homologe Sequenz auf der Schwesterchromatide als Matrize für die Reparatur des DSBs dient (84-86).

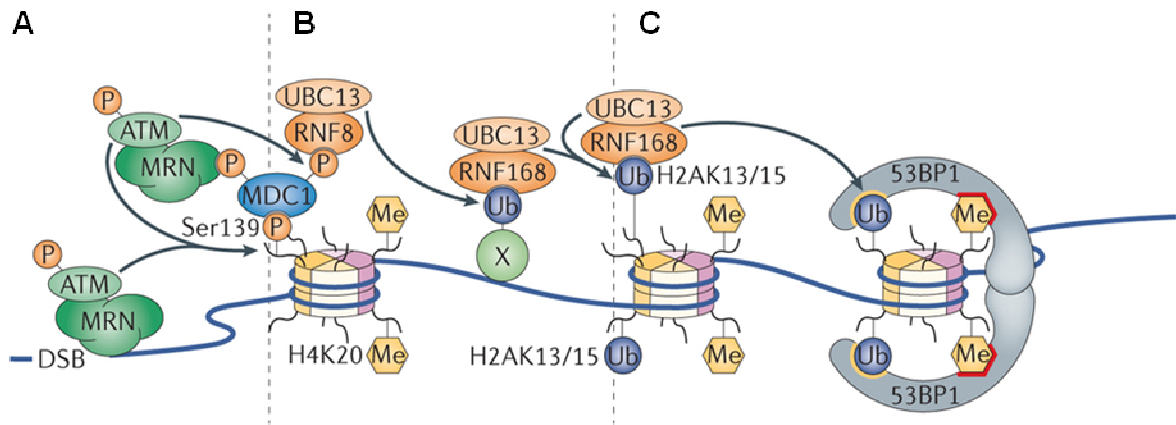


Abb. 5 Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade am DNA-Doppelstrangbruch. (A) Der DSB wird durch den Sensorproteinkomplex MRN gebunden, der die Kinase ATM rekrutiert. Die durch eine Autophosphorylierung aktivierte Kinase phosphoryliert die Histonvariante H2AX am Serin 139. Durch die Bindung von MDC1 an γ H2AX wird ein positiver Feedback-loop über die Rekrutierung des MRN-Komplexen und der aktivierten Kinase ATM ausgelöst. (B) Die Phosphorylierung von MDC1 führt zur Rekrutierung der Ubiquitin Ligasen RNF8 und RNF168 sowie des Cofaktors UBC13. RNF168 ubiquitiniert das Histon H2A am Lysin 13 oder 15 (H2AK13ub und H2AK15ub). (C) Durch die Ubiquitinierung wird das Mediatorprotein 53BP1 rekrutiert, welches das H2AK15ub sowie die nun sterisch zugängliche Methylgruppe am Histon H4 (H4K20me) bindet. Frei nach S. Panier et al. (83)

Für die Reparatur von DSBs über das NHEJ werden zunächst die freien DNA-Enden durch das ringförmige Heterodimer aus Ku70 und Ku80 gebunden (Abb. 6). Die Bindung des Heterodimers an die DNA-Enden erfolgt unabhängig von deren DNA-Sequenz und verhindert dadurch die Degradation der DNA (87). Weiterhin rekrutiert es die DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) und bildet mit ihr den Holoenzymkomplex DNA-PK (88, 89). Die an beiden Bruchenden gebundene DNA-PK hält die Bruchenden in räumlicher Nähe. Für die anschließende Ligation der DNA-Enden wird ein Komplex aus der DNA-Ligase IV und deren Kofaktoren XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*) und XLF (*XRCC4-like factor*) rekrutiert (90-93). Durch eine Autophosphorylierung der DNA-PKcs an den komplementären Bruchenden werden für die Ligation durch den XRCC4/Ligase IV-Komplex freigegeben (94-96). Eine direkte Ligation ist jedoch nur für glatte DSB-Enden oder Enden mit kurzen einzelsträngigen DNA-Bereichen möglich, daher benötigen strukturell komplexere DSBs vor der Ligation eine entsprechende Prozessierung (98, 99). Diese erfolgt durch die Nuklease Artemis, welche von der DNA-PK aktiviert wird (100, 101). Bei komplexeren DSBs kann teilweise auch eine Resektion der Bruchenden durch Nukleasen wie CtIP (*C-terminal-binding protein interacting protein*) notwendig werden (102-105). Durch die Prozessierung entfernte, geschädigte Nukleotide werden vor der Ligation wahrscheinlich durch die Polymerase μ ergänzt (97, 106, 107). Nach der Ligation und dem Abschluss der Reparatur verlassen die Reparaturproteine die reparierte doppelsträngige DNA. In diesem Zuge wird auch die Markierung des DSBs durch γ H2AX mittels Phosphatasen wie der Protein Phosphatase 2A (PP2A) entfernt (108-111). Je nach dem Grad der zur DSB-Reparatur erforderlichen Prozessierung steigt das Risiko für den Verlust von genetischer Information (51).

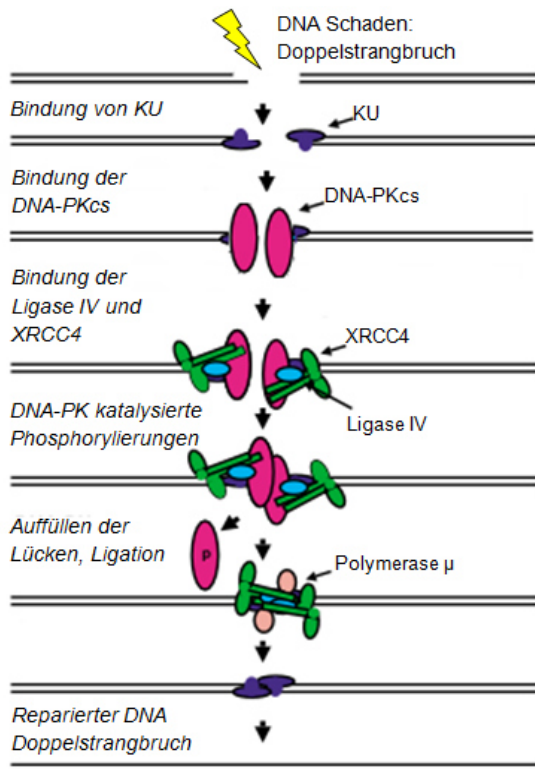


Abb. 6: DSB-Reparatur über das NHEJ. Das NHEJ stellt den wesentlichen Reparaturweg für DSBs in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus dar. Es basiert auf einer einfachen Ligation der gebrochenen DNA-Enden. Liegt kein glatter Bruch vor oder sind Basen beschädigt, wird eine entsprechende Prozessierung der Bruchenden vorgenommen. Die zentralen Komponenten des NHEJ sind das Heterodimer aus Ku70/Ku80, die DNA-PKcs und ein Komplex aus XRCC4, Ligase IV und XLF. Frei nach K. Valerie & L.F. Povirk (97)

Eine besondere Situation liegt nach der Exposition mit Schwerionen vor, wo DSBs häufig in LMDS aus mindestens zwei DNA-Schäden innerhalb von 1-2 Windungen der DNA-Helix auftreten (112). Bei diesen Schäden kann es sich um abasische Stellen, Basenschäden, Einzelstrangbrüche und DSBs handeln. Dies erfordert die Reparatur verschiedener Schäden auf engem Raum, was den Reparaturvorgang für die Zelle schwieriger gestaltet. Zahlreiche Studien zur DSB-Reparatur nach der Bestrahlung mit Schwerionen mittels Pulsfeldgelelektrophorese, γ H2AX-Foci-Analyse oder mittels Fluoreszenz-markierter Proteine in der Lebendzellmikroskopie zeigten, dass mit steigender Komplexität der DSBs deren Reparaturrate abnahm (51, 113-120).

2.4. γ -H2AX-Foci-Assay zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen und dessen Anwendung in der biologischen Dosimetrie

Modifikationen von Proteinen am Bruchende (wie die Phosphorylierung von H2AX) oder deren Rekrutierung zum Schadensort (wie bei 53BP1) können über eine Immunfluoreszenzfärbung in der Mikroskopie als diskrete Foci visualisiert werden und erlauben den Nachweis von DSBs auf Einzelzell-Ebene (121-125). Aufgrund der klassischen und häufigeren Verwendung von γ H2AX zum Nachweis von DSBs und der Kolo-kalisation der Signale mit anderen Proteinen der Schadensantwort, wird sich der folgende Abschnitt auf γ H2AX beschränken.

γ H2AX-Foci können bereits wenige Minuten nach der Schadensinduktion in einem 1:1 Verhältnis zu isoliert vorliegenden DSBs nachgewiesen werden (125-127). Aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode können sogar Expositionen von niedrigen Strahlendosen (im Bereich von wenigen mGy) nachgewiesen werden. Deshalb löste dieser Assay die Analyse von chromosomalen Schäden zum Nachweis von sehr niedrigen Strahlendosen als "Goldstandard" für biodosimetrische Anwendungen ab (128, 129). Bei der Biodosimetrie wird die Messung einer strahleninduzierten Schädigung der DNA in den Zellen eingesetzt, um die im Körper deponierte Dosis nach einer Strahlenexposition anhand einer entsprechenden, etablierten Dosis-Wirkungsbeziehung abzuschätzen. Diese biologisch bestimmte Dosis kann beispielsweise mit einer Dosis verglichen werden, die über ein physikalisches Dosimetrieverfahren bestimmt wurde.

Aufgrund der hohen Sensitivität des γ H2AX-Foci-Assays ist es nicht verwunderlich, dass dieser Assay zur Analyse der induzierten Schäden (bzw. der deponierten Dosis) im Menschen durch eine CT-Untersuchung eingesetzt wurde (22-25). Bei diesen Studien wird in der Regel die Anzahl der γ H2AX-Foci in peripheren Lymphozyten aus dem Blut der Patienten vor und nach dem CT quantifiziert. Aktuell wird die Durchführung des γ H2AX-Foci-Assays als Ergänzung zur physikalischen Dosimetrie in der epidemiologischen Studie EPI-CT getestet, welche das Krebsrisiko für Kinder und Jugendliche durch eine Strahlenexposition im CT analysiert (42, 130). Darüber hinaus ist der γ H2AX-Assay einer der fünf biologischen Methoden, die von der europäischen Initiative *Realizing the European Network of Biodosimetry* (RENEB) für eine retrospektive, biologische Dosimetrie bei einem Strahlenunfall oder einem nuklearen Notfall etabliert wurde (131-133). Neben der Dosis können anhand der Heterogenität des Auftretens der Schäden in der analysierten Zellpopulation auch Rückschlüsse über den strahlenexponierten Anteil des Körpers (Ganzkörperexposition vs. Teilkörper) gezogen werden (134). Die Anwendung dieses Assays ist nicht, wie bisher vorgestellt, auf einzeln vorliegende Zellen begrenzt, sondern kann auch zum Nachweis von DSBs in Zellen im Gewebeverband eingesetzt werden (135, 136).

Eine essentielle Information bei der Anwendung des γ H2AX-Foci-Assays zum Nachweis von DSBs und der anschließenden Abschätzung der Dosis ist die Zeitspanne, die zwischen der Strahlenexposition und der Analyse der Foci liegt. Dies ist auf die unmittelbar nach der Strahlenexposition beginnende Reparatur der Schäden zurückzuführen. Dabei wird nach dem Abschluss der Reparatur eines DSBs auch dessen Markierung durch γ H2AX entfernt (siehe auch Kapitel 1.3.1 und 1.3.2). Aus diesem Grund wird zur Abschätzung der Dosis einer Strahlenexposition eine Reparaturkinetik benötigt, von welcher auf den initialen Strahlenschaden und damit auf eine Dosis geschlossen werden kann. Liegt die Exposition zulange zurück, um strahleninduzierte DSBs nachzuweisen, kann für eine Biodosimetrie auf die Analyse von stabilen, strahleninduzierten Veränderungen der Chromosomen zurückgegriffen werden.

2.5. Zielsetzung

Menschen sind zeitlebens in Kontakt mit ionisierender Strahlung, wodurch jeden Tag mannigfaltige Schäden in den Zellen des menschlichen Körpers entstehen. Dabei werden DSBs für eine Zelle als die gefährlichsten DNA-Schäden nach einer Strahlenexposition betrachtet, da diese im Vergleich zu anderen DNA-Schäden relativ leicht zum Verlust von genetischer Information führen und damit ein erhebliches Risiko für die genetische Integrität der Zelle darstellen (44-47). In zahlreichen Studien wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Induktion von DSBs und der applizierten Dosis beschrieben, wobei DSBs sogar nach Strahlenexpositionen im Milli-Gray-Bereich nachweisbar waren (126, 137, 138). Das assoziierte Risiko von solch niedrigen bzw. alltäglichen Strahlenexpositionen wird intensiv und kontrovers diskutiert. Dies spiegelt die allgemeine Unsicherheit bei der Risikobewertung wider und unterstreicht die gesellschaftliche Relevanz von Studien zur Wirkung von niedrigen Strahlendosen durch alltägliche Strahlenquellen auf (13, 37, 38, 43). Auch wenn molekulare Studien die Notwendigkeit von epidemiologischen Studien zur Risikoabschätzung nicht mindern, können sie helfen, ein detailliertes Verständnis der Strahlenwirkung auf den Organismus zu erlangen und damit derzeitige Modelle zur Risikoabschätzung verbessern.

In drei Projekten wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Aspekte zur Induktion und Reparatur von DSBs nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen alltäglicher Strahlenquellen untersucht. Dazu wurden nicht nur die tagtäglich tausendfach in der Diagnostik verwendete Röntgenstrahlung untersucht, sondern mit Radon und hochenergetischen Schwerionen auch zwei natürliche Strahlenquellen. Neben dem natürlichem Vorkommen von Radon und Schwerionen ist Radon ein beliebtes Heilmittel zur Schmerzreduktion bei rheumatischen Erkrankungen, während Schwerionen (hauptsächlich Kohlenstoff-Ionen) zunehmend in der Tumorthherapie eingesetzt werden. Im ersten und dritten Teilprojekt wurden im Modellorganismus Maus die durch die Bestrahlung von lebenden Zellen mit Schwerionen bzw. Radon entstehenden DSBs zur biologischen Charakterisierung des Schadensmusters sowie zur Bewertung der Strahlenexposition herangezogen. Diese wurde bislang lediglich mittels physikalischer Messungen oder mathematischer Modelle erfasst und bewertet. Deren zugrundeliegenden Annahmen und Ergebnisse wurden jedoch nicht mit einem biologischen System validiert. Diese längst überfällige Verifikation wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommen. Im zweiten Teilprojekt wurden aufbauend auf vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe vertiefende Studien zur Reparatur von DSBs nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlen vorgenommen, wie sie in der Diagnostik eingesetzt werden. Dabei stand die kritische Rolle des intrazellulären, oxidativen Stresslevels bei der DSB-Reparatur in kultivierten Zellen sowie die Überprüfung dessen physiologischer Relevanz im Modellorganismus Maus im Fokus.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Alle Standard-Chemikalien wurden, soweit kein anderer Hersteller angegeben wird, von AppliChem, Biochrom AG, Merck, Roth oder Sigma-Aldrich und in molekularbiologischer Qualität bezogen.

Bezeichnung	Hersteller
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	PAA Laboratories
<i>Collagen I Rat Protein, Tail</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Dako REAL Target Retrieval Solution, 10x</i>	Dako
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i> für die Kultivierung der Retina-Explantate	c.c.pro
für die Kultivierung von HOMSf1-, MEF-Zellen	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth
Ethanol (unvergällt)	Applichem
<i>Fetal Bovine Serum (FBS)</i>	Sigma-Aldrich
Formaldehyd (37 %) für die Histologie, säurefrei	Roth
Ham's F12 Medium	c.c.pro
<i>ibidi Mounting Medium</i>	ibidi
L-Glutamin	Lonza
N-Acetylcystein (NAC)	Sigma-Aldrich
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Merck
Methanol (Rotipuran)	Roth
<i>Microscopy Histosec</i> Pastillen	Merck
para-Formaldehyd	Roth
Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/ml, 10 mg/ml)	Sigma
<i>UseDecalc</i>	Medite Cancer Diagnostics
<i>VEKTASHIELD Mounting Medium</i>	Vektor Laboratories Inc.
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30 %)	Roth
Xylol	Roth

3.1.2. Lösungen und Puffer

Collagenlösung zur Beschichtung der Mylarfolie

6,6 ml/l (v/v) Collagen I Rat Protein
in 0,02 M steril filterter Essigsäure

Formaldehydlösung (5 %) zur Fixierung von Gewebe (pH 7,3)

9 g/l (w/v) Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)
11,8 g/l (w/v) Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄ * 2H₂O)
860 ml (v/v) Formaldehyd (37 %)
in Reinstwasser

Formaldehyd (2,5 %) zur Fixierung von MEF-Zellen (pH 7,6)

67,8 ml/l (v/v) Formaldehyd (37 %)
in 1x PBS

N-Acetylcystein-Stammlösung (1M; pH 7,3 - 7,4)

16,3 g/l (w/v) N-Acetylcystein
in 1x PBS

Para-Formaldehyd (3 %) zur Fixierung von HOMSf1-Zellen (pH 7,2)

30 g/l (w/v) Paraformaldehyd
in 1x PBS

3.1.3. Antikörper und kommerziell erhältliche Kits

Primärantikörper:

Anti-53BP1, <i>polyclonal rabbit</i> (IHC-00001)	Bethyl (Biomol)
Anti-53BP1 H-300, <i>polyclonal rabbit</i> (sc-22760)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-53BP1, <i>monoclonal mouse</i> (05-726)	Upstate
Anti-Cyclin (GNS11), <i>monoclonal mouse</i>	Invitrogen
Anti-γH2AX (Ser139), <i>monoclonal mouse</i> (05-636)	Millipore
Anti-γH2AX (Ser139), <i>monoclonal rabbit</i> (ab81299)	Abcam
Anti-H3K4me3, <i>polyclonal rabbit</i> (ab8898)	Abcam
Anti-Lamin B, <i>polyclonal goat</i> (sc-6217)	Santa Cruz Biotechnology

Sekundärantikörper:

Alexa Flour 594, <i>chicken-anti-goat</i>	Invitrogen
Alexa Flour 488 oder - 594, <i>goat-anti-rabbit</i>	Invitrogen
Alexa Flour 488 oder - 594, <i>goat-anti-mouse</i>	Invitrogen

Kommerziell erhältliche Kits:

EdU-Click 594 oder -647

PANATecs

Wasserstoffperoxid-Test

Merck

3.1.4. Zelllinien und Mäusestamm

Bei der Zelllinie HOMSf1 handelt es sich um primäre, humane Fibroblasten, die freundlicherweise von der Humangenetik der Universität des Saarlandes (Homburg) zur Verfügung gestellt wurden. HOMSf1-Zellen wurden in DMEM (supplementiert mit 15 % FCS, 1 % NEAA, 100 Units/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin) kultiviert. Die Zellen wurden einmal wöchentlich im Verhältnis 1:2 passagiert.

Bei der Zelllinie MEF H2AX^{+/+} WT handelt es sich um embryonale Fibroblasten der Maus, die freundlicherweise vom Labor von P.A. Jeggo (Sussex University, Brighton, England) zur Verfügung gestellt wurden. MEF-Zellen wurden in DMEM (supplementiert mit 10 % FCS, 1 % NEAA, 100 Units/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin) kultiviert. Die Zellen wurden dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 bis 1:20 passagiert.

Der Mäusestamm C57BL/6 wurde von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) oder von JANVIER LABS (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen und im TU-eigenen Tierstall gezüchtet. Die Mäuse lebten in Gruppen von 4-5 Tieren pro Käfig mit *Laminar Air Flow-System* in einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 h. Sie wurden mit Wasser und spezieller Laborkost (Altromin, Deutschland) versorgt. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2 °C und die Luftfeuchtigkeit 55 ± 10 %. Die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes wurden strikt befolgt und es fanden regelmäßige veterinärmedizinische Untersuchungen statt.

3.1.5. Verwendete Software

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, Bildbearbeitung und Auswertung wurden die folgenden Programme verwendet:

ImageJ	NIH Software
LAS AF (lite)	Leica Microsystems
µManager	Vale Lab
MetaCyte	MetaSystems Hard- und Software GmbH
OriginPro 9	OriginLab

3.2. Methoden

3.2.1. Kultivierung und Aussaat von Zellen

Die Zelllinien HOMS F1 und MEF wurden in entsprechenden Zellkulturflaschen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das zur Kultivierung verwendete Medium, dessen Supplemente sowie das jeweilige Verhältnis in dem die Zellen passagiert wurden, sind im Abschnitt 3.1.4 aufgeführt. Zur Passage bzw. für die Aussaat der adhärent wachsenden Zellen wurden diese mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und in frischem, vorgewärmtem Medium vereinzelt. Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurden diese im entsprechenden Verhältnis auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Alternativ wurde für die Durchführung von Experimenten die Zellzahl pro ml mit Hilfe eines Hämocytometers bestimmt und eine definierte Zellzahl in ein Zellkulturgefäß mit frischem Medium überführt.

Aussaat von HOMS F1-Zellen

Für die Durchführung von Experimenten wurden HOMS F1-Zellen der Passage 11 bis 16 verwendet. Jeweils 10.000 Zellen pro cm² wurden in 24-Well-Glasplatten (Greiner bio-one), in mit Deckgläschen ausgelegten Zellkulturschalen oder in 4-Well- μ -Slides (ibidi) ausgesät. Das entsprechende Mediumvolumen betrug 500 μ l pro Vertiefung der Wellplatte, 5 ml bei einem Schalendurchmesser von 6 cm oder 600 μ l pro Vertiefung der 4-Well- μ -Slides. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen bis zur Konfluenz kultiviert, wobei das Zellkulturmedium während dieser Inkubationszeit einmal erneuert wurde. Die Konfluenz der HOMS F1-Zellen wurde stichprobenartig über die Analyse der Zellzyklusverteilung der Zellen überprüft. Dazu wurden die Zellen eines Wells jeweils für 3 h bei 37 °C mit 5 μ M des Nukleotidanalogs Ethynyldeoxyuridin (EdU) inkubiert und anschließend fixiert. Zum Vergleich wurde die Zellzyklusverteilung von exponentiell wachsenden Zellen analysiert, die lediglich für drei Tage kultiviert wurden.

Konfluente HOMS F1-Zellen wurden vor der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen entweder mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bzw. N-Acetylcystein (NAC) behandelt (siehe Kapitel 3.2.2), oder verblieben komplett unbehandelt (engl. *not treated*, NT). Die Zellen wurden nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen sowie während der sich anschließenden Reparaturzeit von 15 min oder 24 h in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Aussaat von MEF-Zellen

Für die Durchführung von Experimenten mit MEF-Zellen wurden zunächst 24-Well-Platten mit *Fluorocarbon*-Folienboden (Molecular Biotechnology) für die Aussaat der Zellen vorbereitet. Dazu wurde der 25 µm dicke Folienboden der Platten entfernt und durch die dünnere Mylarfolie (2 µm, DuPont) ersetzt. Die Mylarfolie wurde mit Hilfe des Zweikomponentenklebers UHU Plus Endfest 2-K-Epoxidkleber an die Platte angebracht, sodass die Folie wasserdicht mit der Well-Platte abschloss. Der Austausch der Folie war für die Bestrahlung mit α -Teilchen essentiell, da diese nur über eine kurze Reichweite verfügen und durch die dickeren Folie die Zellen nicht mehr durchdringen würden. Die Platten wurden mit 70 %igem unvergälltem Ethanol sterilisiert und die Wells mit sterilem 1x PBS gespült, um eventuell vorhandene Ethanolrückstände zu entfernen. Anschließend wurde der Mylarfolienboden der Platten mit Collagen beschichtet, wozu in jede Vertiefung 200 µl der Collagenlösung gegeben wurde. Die Inkubation mit der Collagenlösung erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur (RT). Nach einem Waschschriff mit 1x PBS wurde der Folienboden unter der Sterilbank luftgetrocknet. Die vorbereiteten Zellkulturplatten wurden entweder direkt verwendet oder bei 4 °C gelagert.

Zur Aussaat der Zellen wurden 21.000 MEF-Zellen pro cm² in die beschichteten Mylarfolie- 24-Well-Platten überführt. Dazu wurde die Zellkonzentration im Medium nach dem Ablösen der Zellen so eingestellt, dass 1 ml Medium in jedem Well vorlag. Die Zellen wurden für zwei Tage in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlen oder α -Teilchen. Zur Kontrolle der Zellzyklusphase, in welcher sich die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung befanden, wurde dem Zellkulturmedium 30 min vor der Bestrahlung 10 µM EdU zugesetzt. In der Zeitspanne von 15 min zwischen der Bestrahlung und der Fixierung der Zellen wurden diese in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.2. Behandlung von konfluenten HOMSf1-Zellen mit Wasserstoffperoxid oder N-Acetylcystein

Für die Behandlung von konfluenten HOMSf1-Zellen mit H₂O₂ wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 µM oder 150 µM H₂O₂ in eiskaltem 1x PBS für 30 min bei 4 °C inkubiert. Als Behandlungskontrolle (*Mock*) wurden Zellen mit eiskaltem 1x PBS (ohne H₂O₂) behandelt. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, mit frischem, vorgewärmten Medium bedeckt und für 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Konzentration der H₂O₂-Lösungen wurde stichprobenartig mit dem Wasserstoffperoxid-Test (Merck) photometrisch überprüft. Der Test wurde nach Herstelleranweisung durchgeführt.

Für die Behandlung konfluenter HOMSF1-Zellen mit NAC wurde zunächst eine 1 M NAC-Stammlösung in PBS hergestellt und steril filtriert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit 1, 10 oder 50 mM NAC in frischem oder konditioniertem Medium in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Diese Behandlung erfolgte 1 h vor der Bestrahlung, wobei NAC über den gesamten Versuchszeitraum im Medium verblieb. Als Behandlungskontrolle (*Mock*) wurden Zellen lediglich mit frischem oder konditioniertem Medium versorgt. Für welche Versuche mit frischem oder mit konditioniertem Medium gearbeitet wurde, ist im Ergebnisteil angegeben.

Bis zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlen sowie während der anschließenden Reparaturzeit von 15 min oder 24 h wurden die Zellen in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für jeden Versuch wurden in der Regel unbehandelte (NT), mit H₂O₂- bzw. NAC-behandelte Zellen sowie Zellen aus deren Behandlungskontrollen (*Mock*) bestrahlt. Zusätzlich wurden entsprechend behandelte Zellen nicht bestrahlt. Diese dienten bei der Auswertung der Experimente als unbestrahlte Kontrolle (0 mGy), in welcher die spontan auftretenden DSBs quantifiziert werden.

3.2.3. Bestrahlung von HOMSF1- und MEF-Zellen

Bestrahlung von Zellen mit Röntgenstrahlen

Zur Bestrahlung von Zellen mit Röntgenstrahlen wurde eine Röntgenröhre des Typs Titan Isovolt 160 (GE Sensing & Inspection Technologies) eingesetzt. Die Röntgenstrahlen wurden durch 2 mm Aluminium vor dem Strahlenaustrittsfenster sowie durch zwei zusätzliche Aluminiumplatten (je 1 mm dick) gefiltert. Diese wurde auf 37 °C vorgewärmt und dienten neben der Filterung der Röntgenstrahlen auch zur Positionierung der in Zellkulturgefäßen wachsenden Zellen im Strahlenfeld. Die Bestrahlung der Zellen mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlen (5 mGy bis 1 Gy) erfolgte immer bei einem Abstand von 72 cm zur Strahlenquelle und einer Spannung von 90 kV. Die Dosisleistung wurde über die Stromstärke an die jeweils zu applizierende Dosis angepasst (Tab. 2) und mit einem PTW Weichstrahlkammer-Dosimeter kontrolliert.

Für die Bestrahlung von HOMSF1-Zellen, die auf einem Glasboden wuchsen, wurde ein Dosis-Korrekturfaktor von drei verwendet. Dieser wurde zuvor experimentell ermittelt und berücksichtigt die zusätzliche Schädigung der Zellen durch strahleninduzierte Sekundärelektronen aus dem Glas (siehe auch Kapitel 5.1; (139)). Für die Bestrahlung von MEF-Zellen, die auf einer Mylarfolie wuchsen, wurden diese auf einem 2 mm dicken Plastikboden einer Zellkulturschale auf der Aluminiumplatte positioniert. Der zusätzliche Plastikboden sollte den direkten Kontakt mit der Aluminiumplatte und damit eine zusätzliche Schädigung der Zellen durch Sekundärelektronen aus dem Aluminium vermeiden (139).

Tab. 2: Einstellungen für die Bestrahlung von kultivierte Zellen mit Röntgenstrahlen. Angegeben sind jeweils die Einstellungen von Spannung, Strom, der Abstand zur Strahlenquelle sowie die resultierende Dosisleistung für verschiedene Bestrahlungsdosen von 5 mGy bis 1 Gy. Für alle Bestrahlungen wurden die Röntgenstrahlen durch 2 mm Aluminium vor dem Strahlenausstrittsfenster sowie durch zwei zusätzliche Aluminiumplatten (je 1 mm dick) gefiltert. Für Zellen, die in Zellkulturgefäßen mit einem Glasboden wuchsen, wurde bei der Bestrahlung ein experimentell ermittelter Dosis-Korrekturfaktor von 3 berücksichtigt, sodass bei der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen jeweils nur ein Drittel der Gesamtdosis appliziert wurde (siehe auch Kapitel 4.1; (139)). Für Zellen, die auf Mylarfolie wuchsen, wurde bei der Bestrahlung ein 2 mm dicker Plastikboden einer Zellkulturschale untergelegt (139).

	HOMSF1-Zellen			MEF-Zellen
Dosis	5-12 mGy	25-100 mGy	1 Gy	100 mGy
Spannung	90 kV	90 kV	90 kV	90 kV
Stromstärke	3 mA	6 mA	19 mA	19 mA
Abstand	72 cm	72 cm	72 cm	72 cm
Aluminiumfilterung	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm
Dosisleistung	0,5 mGy/s	1 mGy/s	3,8 mGy/s	3,8 mGy/s

Bestrahlung von Zellen mit α -Teilchen

Die Bestrahlung von Zellen mit α -Teilchen erfolgte mit einem Americium-241-Flächenstrahler von Amersham-Buchler. Der Americium-Flächenstrahler emittiert $7,88 \times 10^4$ α -Teilchen pro cm^2 . Die Bestrahlung erfolgte im Abstand von 3 mm zur Strahlenquelle, bei welchem die α -Teilchen eine Energie von 3,66 MeV und einen LET von 114 keV/ μm besitzen. Die resultierende Dosisleistung beträgt 0,87 Gy/min (140).

3.2.4. Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von HOMSF1- und MEF-Zellen

Zur Fixierung von Zellen wurden diese kurz mit 1x PBS gewaschen und unmittelbar danach wurden die HOMSF1-Zellen für 10 min mit 3 % para-Formaldehyd bedeckt; die MEF-Zellen für 15 min mit 2,5 % Formaldehydlösung. Die Zellen wurden erneut mit 1x PBS gewaschen und deren Zellmembran mit 0,2 % TritonX100 in 1x PBS permeabilisiert. Nach drei Waschschritten mit 1x PBS wurden die Zellen für 30 min mit der Blocklösung aus 1 % FCS, 3 % BSA in 1x PBS inkubiert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen mit der Primärantikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert (Tab. 3). Für Zellen, die auf Deckgläsern wuchsen, wurden alle Inkubationsschritte mit Antikörpern in einer Feuchtkammer durchgeführt. Dies sollte das Austrocknen der Zellen während der Inkubation mit geringen Volumina der Antikörperlösung verhindern. Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern wurden die Zellen dreimal mit 0,1 % Tween in 1x PBS gewaschen und mit der Sekundärantikörper-Lösung für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden ebenfalls unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Zellen wurden dreimal mit 0,1 % Tween in 1x PBS gewaschen und die DNA der Zellen mit DAPI (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 1x PBS) angefärbt. Abschließend wurden die Zellen mit

Reinstwasser gewaschen, mit VECTASHIELD *Mounting Medium* oder ibidi *Mounting Medium* bedeckt, eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C unter Lichtausschluss.

Tab. 3: Verwendete Kombinationen aus Primär- und Sekundärantikörpern sowie ihre Verdünnung. Die Antikörper wurden zur Immunfluoreszenzfärbung von HOMSF1-Zellen in 1x PBS mit 1 % FCS verdünnt; für die Färbung von MEF-Zellen in 1x PBS mit 5 % BSA, 1 % FCS, 0,1 % Tween20.

Primärantikörper (Verdünnung)	Sekundärantikörper (Verdünnung)
Anti-53BP1, <i>monoclonal mouse</i> (1:2000)	Alexa Flour 594, <i>goat-anti-mouse</i> (1:1000)
Anti-53BP1 (H-300), <i>polyclonal rabbit</i> (1:2000)	Alexa Flour 594, <i>goat-anti-rabbit</i> (1:1000)
Anti-Cyclin, <i>monoclonal mouse</i> (1:200)	Alexa Flour 488, <i>goat-anti-mouse</i> (1:1000)
Anti- γ H2AX (Ser139), <i>monoclonal rabbit</i> (1:1000)	Alexa Flour 488, <i>goat-anti-rabbit</i> (1:500)

Wenn die Zellen zur Kontrolle der Zellzyklusverteilung mit EdU inkubiert wurden, wurde das in die DNA-eingebaute EdU mittels einer Click-iT-Reaktion sichtbar gemacht (141). Die Click-iT-Reaktion wurde zwischen der Inkubation der Zellen mit den primären und den sekundären Antikörpern durchgeführt. Entsprechend der Anleitung des Herstellers (Panatecs) wurden die Zellen für 30 min bei RT und Dunkelheit mit der Reaktionslösung inkubiert.

3.2.5. Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung in HOMSF1-Zellen

Für die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX und 53BP1 wurden Stapelaufnahmen am Mikroskop Axio (Zeiss) angefertigt. Mit dem 20x Objektiv (Plan-APOCHROMAT, Zeiss) wurden für ein Blickfeld jeweils drei Aufnahmen pro Fluoreszenz-Kanal mit einem Abstand von 1,2 μ m zwischen den Bildebenen angefertigt. Insgesamt wurde zur Analyse der DSB-Induktion (15 min nach Bestrahlung) ein Scanfeld von 5x5 Einzelbildern (je 439,3 x 330,8 μ m²) und zur Analyse der DSB-Reparatur (24 h nach Bestrahlung) ein Scanfeld von 10x10 Einzelbildern aufgenommen. Diese serielle Bildaufnahme der Stapelaufnahmen erfolgte automatisch mittels der Autofokusfunktion des Programmes μ Manager. Bei den Aufnahmen wurde immer darauf geachtet, dass sich die Fluoreszenzsignale nicht in der Sättigung befanden und das Intensitätsspektrum (0-255 bei 8 Bit) für jeden Fluorophor ausgenutzt wurde. Gegebenenfalls wurde über die Signalintensität über die Belichtungszeit entsprechend angepasst.

Die Quantifizierung der Foci erfolgte anhand der vorliegenden Bildaufnahmen, wobei deren Dateinamen zu diesem Zweck umbenannt und damit verblindet wurden. Bei der manuellen Quantifizierung der DSB-Induktion wurden die kolokalisierenden 53BP1- γ H2AX-Foci in min. 100 Zellen nach Bestrahlung mit 5 bis 300 mGy bzw. in min. 40 Zellen nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlen anhand der Stapelaufnahmen erfasst. Die Kolokalisation der Fluoreszenzsignale von 53BP1 und γ H2AX wurde als Kriterium für das Vorliegen eines DSBs gewählt, um

die Computer-gestützte Quantifizierung der DSBs zu ermöglichen. Ein entsprechendes Programm wurde in Kooperation mit N. Lengert (AG Drossel, TU Darmstadt) entwickelt. Analog zum Computer-gestützten Auswerteverfahren wurden bei der Analyse der DSB-Reparatur die kolokalisierenden 53BP1- γ H2AX-Foci in min. 500 Zellen anhand der schärfsten, mittleren Bildebene der Stapelaufnahme ausgezählt.

Für die Analyse der Zellzyklusverteilung von exponentiell wachsenden sowie konfluenten HOMS1-Zellen wurden die Deckgläser auf denen die Zellen wuchsen mit dem 20x Objektiv am Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss) mit dem Programm MetaCyte abgescannt. Die Zellzyklusverteilung wird von MetaCyte anhand der DAPI- und EdU-Fluoreszenzsignale der Zellen erstellt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen in den Zellzyklusphasen G1, S und G2 bestimmt.

3.2.6. Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung in MEF-Zellen

Für die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung gegen 53BP1 in MEF-Zellen wurden Stapelaufnahmen am Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5 II) angefertigt. Für die Bildaufnahmen wurde ein Deckglas mit einem Tropfen VECTASHIELD *Mounting Medium* an der Mylarfolie fixiert. Dies sollte ein Verrutschen oder Reißen der Folie während der Bildaufnahme verhindern. Die Laserintensität war für alle Bildaufnahmen auf 8 % für die 405 nm Diode, auf 16 % für den 488 nm Argon-Laser (Laserstrom 15 %) und auf 14 % für den 561 nm DPSS (*diode pumped solid state*)-Laser, 10 % für den 633 nm Helium-Neon-Laser eingestellt. Bei den Aufnahmen wurde immer darauf geachtet, dass sich die Fluoreszenzsignale nicht in der Sättigung befanden und das Intensitätsspektrum (0-255 bei 8 Bit) für jeden Fluorophor ausgenutzt wurde. Gegebenenfalls wurde über die Einstellung der Signalverstärkung, dem sogenannten *Gain*, die Signalintensität entsprechend angepasst. Aufgrund des geplanten Vergleiches der Signalintensität und der Fläche eines Focus nach Bestrahlung der MEF-Zellen mit Röntgenstrahlen oder α -Teilchen wurde die Laserintensität bzw. der Gain anhand der 53BP1-Tracks in α -Teilchen-bestrahlten Zellen eingestellt, da diese erfahrungsgemäß die höchste Signalintensität aufweisen. Diese Einstellungen wurden dann für die folgenden Aufnahmen von Foci in unbestrahlten sowie in Röntgen-bestrahlten Zellen beibehalten.

Für die Quantifizierung der 53BP1-Foci sowie der Messung deren Signalintensität und Fläche wurden mehrere repräsentative Bereiche ($246 \times 246 \mu\text{m}^2$) ausgewählt. Die Aufnahme von Stapelaufnahmen erfolgte mit dem 63x HCX PL APO lambda blue Immersionsobjektiv (NA 1,4) mit einer resultierende Bildauflösung (Voxelgröße) von $0,24 \times 0,24 \times 0,21 \mu\text{m}^3$. Die Quantifizierung der 53BP1-Foci wurde anhand der Stapelaufnahmen in 40 G1-Zellen aus mehreren Blickfeldern vorgenommen. Die Zellen in der S- und G2-Phase des Zellzyklus wurden über den Nachweis von Cyclin B (Marker für Zellen in der G2-Phase) und EdU (Marker für

Zellen in der S-Phase) identifiziert und bei der Quantifizierung ausgeschlossen. Für die anschließende Messung der Fläche und der Intensität von 53BP1-Foci in G1-Zellen wurde das Fluoreszenzsignal eines Focus in einer mittleren, signalintensiven Z-Ebene manuell umrandet und die Anzahl der Pixel sowie deren mittlere Signalintensität mit dem Programm ImageJ bestimmt. Über einen *Line-Plot* wurde stichprobenartig überprüft, dass das Fluoreszenz-Signal nicht gesättigt war und die manuelle Umrandung möglichst bei der Halbwertshöhe des Fluoreszenzsignals gesetzt wurde. Es wurden jeweils 50-100 Foci aus verschiedenen Bildaufnahmen vermessen.

3.2.7. Präparation, Kultivierung der murinen Retina und deren ex vivo Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder Schwerionen

Präparation und Kultivierung

Die Mäuse wurden zur Organentnahme getötet, worauf umgehend die Entnahme der Augen und die Präparation der Retina in eisgekühltem F12-Medium unter dem Binokular erfolgte. Mit Hilfe von Pinzetten wurde das umliegende Augengewebe, sowie das Pigmentepithel von der Retina entfernt. Der Glaskörper mit der umliegenden Retina wurde in vorgewärmtes DMEM-Medium (supplementiert mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin) überführt und bis zur Bestrahlung für 30 - 60 min in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37 °C sowie 5 % CO₂ kultiviert.

Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder hochenergetischen Schwerionen

Zur Bestrahlung von Retina-Explantaten mit Röntgenstrahlen wurde eine Röntgenröhre des Typs Titan Isovolt 160 (GE Sensing & Inspection Technologies) eingesetzt, wobei die Röntgenstrahlen jeweils durch 2 mm Aluminium vor dem Strahlenaustrittsfenster gefiltert werden. Für die Bestrahlung wurden die in 6-well Platten kultivierten Retina-Explantate auf einer 1 mm dicken Aluminiumplatte im Abstand von 72 cm zur Strahlenquelle positioniert. Die Bestrahlung mit 5 bis 50 mGy Röntgenstrahlen erfolgte bei 90 kV und 6 mA. Die resultierende Dosisleistung (1,3 mGy/s) bzw. die applizierte Dosis wurde mit einem PTW Weichstrahlkammer-Dosimeter kontrolliert.

Die Bestrahlung der Retina-Explantate mit hochenergetischen Titan-Ionen erfolgte am Teilchenbeschleuniger SIS18 der GSI (Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH) im sogenannten Eingangskanal des Bestrahlungsfeldes, sodass der Energieverlust der Ionen beim Durchqueren der Materie klein war (~5 % über 2 cm wasseräquivalente Länge). Da die entsprechende Veränderung im LET sehr gering (<<1 %) und die Retina selbst sehr dünn ist (Durchmesser des Retina-Explantates: ca. 0,3 mm), war somit eine homogene Bestrahlung gewährleistet (142). Die Retina-Explantate wurden mit $7,5 \times 10^3$ - $7,5 \times 10^5$ Ionen/cm² bestrahlt,

die eine Energie von 0,85 GeV/u (128 keV/μm) oder von 1 GeV/u (114 keV/μm) hatten. Die genauen Bestrahlungsbedingungen sind im Ergebnisteil angegeben. Für die Bestrahlung wurden die Retina-Explantate in senkrecht stehenden 6-Well-Platten im Strahlenfeld positioniert. Die resultierende Ausrichtung der Explantate mit der Linse zum Boden der jeweiligen Vertiefung im Well ermöglichte eine standardisierte Orientierung der Retina während der Bestrahlung. Dies ermöglichte die Gewebeschnitte parallel zur Trajektorie der Ionen anzufertigen. In Abb. 7 ist die Bestrahlungsgeometrie sowie die Schnittrichtung der Gewebeschnitte zum Nachweis von Ionenspuren schematisch dargestellt.

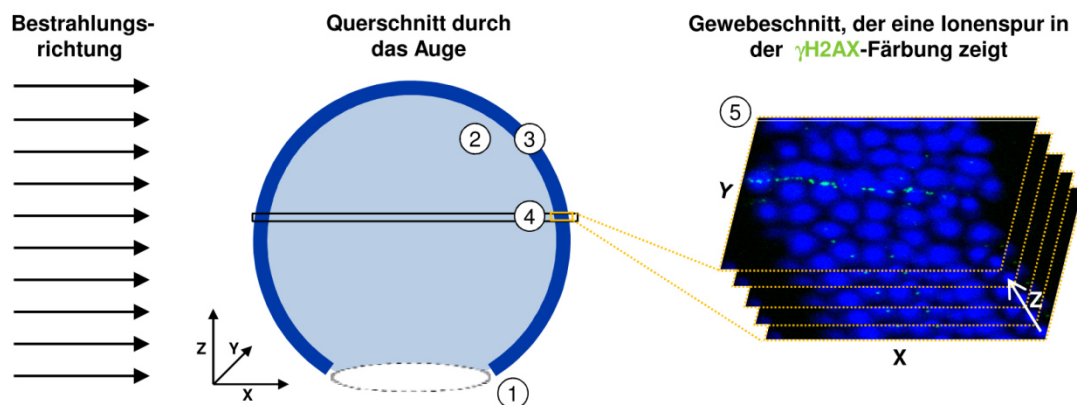


Abb. 7: Schematische Darstellung der Bestrahlungsgeometrie der Retina-Explantate. Die präparierten Retina-Explantate (aus Linse (1), Glaskörper (2) und Retina mit der Photorezeptorzellschicht (3)) richteten sich mit der Linse nach unten aus. Dies ermöglichte es Gewebeschnitte (4) nahezu parallel zur Bestrahlungsrichtung anzufertigen und die Trajektorie der Ionen nach der Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX (5) über mehrere Zellen hinweg zu beobachten. (Frei modifiziert nach Mirsch et al. 2015, (143))

In der Zeitspanne von 15 min zwischen der Bestrahlung und der Fixierung der Retina-Explantate wurden diese bei 37 °C sowie 5 % CO₂ in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre kultiviert. Entsprechend behandelte Retina-Explantate wurden nicht bestrahlt. Diese dienen bei der Quantifizierung der strahleninduzierten DSBs als unbestrahlte Kontrolle (0 mGy), in welcher die spontan auftretenden DSBs quantifiziert werden.

Färbung der DNA in lebenden und fixierten Photorezeptorzellen

Für die Messung des Zellkerndurchmessers in lebenden sowie fixierten Photorezeptorzellen wurden Retina-Explantate für 30 min bei 37 °C sowie 5 % CO₂ in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit dem Membran-permeablen DNA-Farbstoff Syto16 green (*Life Technologies*) kultiviert. Aufgeschnitten wie ein Kleeblatt wurde die Retina flach ausgebreitet und Bildaufnahmen der Photorezeptorzellen am Konfokalmikroskop (siehe Abschnitt 3.2.11) angefertigt. Anschließend wurde die Retina fixiert und die Photorezeptorzellen erneut am Konfokalmikroskop aufgenommen. Zur Kontrolle der Spezifität bzw. der Lokalisation des Syto16 wurde nach der Fixierung die Kernmembran über den Antikörper gegen Lamin B (sc-6217) angefärbt. Bei dieser Immunfluoreszenzfärbung wurde die Retina (in der Kleeblattform) entsprechend dem Protokoll zur Färbung von kultivierten Zellen (siehe Abschnitt 3.2.4) gefärbt.

3.2.8. Behandlung der C57BL/6-Mäuse mit N-Acetylcystein und deren anschließende in vivo Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Aufbauend auf den Ergebnissen von Experimenten mit kultivierten Zellen wurde in diesem Experiment die physiologische Relevanz des *LowDose*-Effektes und dessen Abhängigkeit vom intrazellulären Stresslevel der Zellen untersucht. Der Versuch sowie dessen Durchführung wurde vom Regierungspräsidium Darmstadt geprüft und genehmigt. Die Narkose, Bestrahlung und Tötung der Mäuse wurde ausschließlich durch im Versuchsvorhaben berechnigte Personen durchgeführt.

Behandlung mit N-Acetylcystein

Adulte C57BL/6-Mäuse bekamen über 14 Tage NAC-haltiges Trinkwasser, während eine entsprechende Kontrollgruppe reguläres Wasser erhielt. Die NAC-Konzentration von 40 mM im Trinkwasser entspricht einer täglichen Dosis von ca. 1 g NAC pro kg Körpergewicht (144, 145). Um eine gleichbleibende NAC-Konzentration im Trinkwasser über den Behandlungszeitraum zu gewährleisten, wurde das Trinkwasser täglich ausgetauscht. Nach der zweiwöchigen Behandlungszeit wurden die Mäuse mit 10 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt.

Während der Rekonvaleszenzzeit (Reparaturzeit) von 15 min oder 24 h wurden die Mäuse in ihrer gewohnten Umgebung gehalten. Anschließend wurden die Mäuse getötet, um die DSB-Induktion sowie deren Reparatur in verschiedenen Organen zu analysieren. Mit einer Gruppe von NAC-behandelten sowie unbehandelten Mäusen wurde entsprechend verfahren, jedoch wurden diese Tiere nicht bestrahlt. Sie dienen bei der Auswertung der DSB-Reparaturstudien als unbestrahlte Kontrolle (0 mGy), in welcher die spontan auftretenden DSBs quantifiziert werden.

Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen erfolgte mit einer Röntgenröhre des Types Isovolt 160 (GE Sensing & Inspection Technologies), wobei die Röntgenstrahlen jeweils durch 2 mm Aluminium vor dem Strahlenaustrittsfenster gefiltert werden. Für die Bestrahlung (*in vivo*) wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und in einer Bestrahlungsbox auf der 1 mm dicken Aluminiumplatte positioniert. Die Bestrahlung erfolgte bei 135 kV, 6 mA und einem Abstand von 72 cm zur Strahlenquelle. Die resultierende Dosisleistung von 2,3 mGy/s bzw. die applizierte Dosis wurde mit einem PTW Weichstrahlkammer-Dosimeter kontrolliert. Für die verwendete Spannung von 135 kV wurde experimentell zwischen dem Eintritt der Strahlung in die seitlich liegende Maus und deren Austritt ein Dosisabfall von ca. 26 % festgestellt (146). Daher wurde für eine homogene Dosisverteilung jeweils die Hälfte der Dosis pro Körperseite appliziert.

3.2.9. *In vivo* Bestrahlung von Mäuse mit Röntgenstrahlen oder Schwerionen

In diesem Experiment wurde die Verteilung des radioaktiven Edelgases Radon-222 im Körper anhand des Modellorganismus Maus untersucht, die mit klassischen Methoden der Dosimetrie nicht messbar ist. Mit diesem biologischen Ansatz kann über die Quantifizierung der DSB-Induktion in verschiedenen Organen auf deren Strahlenexposition geschlossen werden (Biodosimetrie). Zur Abschätzung der Strahlenexposition sind entsprechende Analysen der DSB-Induktion bei bekannter Dosis notwendig. Aufgrund dessen wurden Mäusen mit 10 mGy Röntgenstrahlen oder mit einer niedrigen Fluenz von Schwerionen bestrahlt. Neben der Analyse der DSB-Induktion wurde in allen Experimenten auch die DSB-Reparatur überprüft, um das genetische Risiko einer Radonexposition besser einzuschätzen. Die einzelnen Versuche sowie deren Durchführung wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt geprüft und genehmigt. Die Narkose, Bestrahlung und Tötung der Mäuse wurde ausschließlich durch im Versuchsvorhaben berechnigte Personen durchgeführt.

Bei allen Versuchen wurden die Mäuse während der Rekonvaleszenzzeit (Reparaturzeit) von 15 min, 1 h, 24 h oder 7 d in ihrer gewohnten Umgebung gehalten. Anschließend wurden die Mäuse getötet, um die DSB-Induktion sowie deren Reparatur in verschiedenen Organen zu analysieren. Mit einer Gruppe von Mäusen wurde entsprechend verfahren, jedoch wurden diese Tiere nicht bestrahlt. Sie dienen bei der Auswertung der DSB-Reparaturstudien als unbestrahlte Kontrolle (0 mGy), in welcher die spontan auftretenden DSBs quantifiziert werden.

Bestrahlung mit Schwerionen

Für die *in vivo* Bestrahlung mit Schwerionen wurden adulte C57BL/6-Mäuse bereits vor Beginn des Versuches an die GSI (Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH) gebracht. Die Mäuse wurden entweder über 1 h in einer speziellen Kammer mit Radon exponiert oder am Beschleuniger SIS18 mit Nickel-Ionen bestrahlt:

Die Exposition der Mäuse mit 44 oder 440 kBq/m³ Radon-222 erfolgte ohne Narkose in einer von A. Maier speziell angefertigten Radonkammer an der GSI (10, 147). Zur Erzeugung des Radons dient eine Radium-226-Quelle mit einer Aktivität von 41,9 kBq ± 4 %. Die Radonaktivitätskonzentration, Luftfeuchtigkeit, CO₂-Gehalt und Temperatur in der Kammer kann über den Bestrahlungszeitraum von 1 h permanent kontrolliert und wenn nötig entsprechend angepasst werden. Über eine Kamera in der Radonkammer konnte das Verhalten der Mäuse über den Bestrahlungszeitraum hinweg beobachtet werden.

Für die Bestrahlung der Mäuse mit Nickel-Ionen wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und in einer Plexiglas-Bestrahlungsbox positioniert. Die Inhalationsnarkose wurde während der Bestrahlung durch das Narkosegerät UniVet prota (Groppler Medizintechnik) aufrecht erhalten. Die Mäuse wurden am SIS18 mit 1 GeV/u Nickel-Ionen (175 keV/μm, 7,5x10³ Ionen/cm²)

bestrahlt (siehe Abschnitt 3.2.7). Über Kameras im Bestrahlungsraum konnten die Mäuse über den Bestrahlungszeitraum hinweg beobachtet und so die Narkose überwacht werden.

Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen erfolgte mit einer Röntgenröhre des Types Isovolt 320 (GE Sensing & Inspection Technologies), wobei die Röntgenstrahlen jeweils durch 2 mm Aluminium vor dem Strahlenaustrittsfenster gefiltert werden. Für die Bestrahlung (*in vivo*) wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und in einer Bestrahlungsbox auf einer Aluminiumplatte positioniert. Die Bestrahlung erfolgte bei 250 kV, 1 mA und einem Abstand zur Strahlenquelle von 75 cm. Die resultierende Dosis bzw. Dosisleistung (1 mGy/s) wurde mit einem PTW-Weichstrahlkammer-Dosimeter kontrolliert.

3.2.10. Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von Gewebe

Fixierung und Einbettung von Gewebe in Paraffin

Zur Fixierung wurden die Retina-Explantate oder die Organe der Maus, die unmittelbar nach deren Tötung entnommen wurden, in neutral gepuffertes 5 %iges Formaldehyd überführt. Alle größeren Organe wie die Lunge, Niere, Leber, Herz etc. wurden zur homogenen Fixierung mit einem Skalpell in kleinere Stücke geschnitten. Anschließend wurden die Organe in Einbettkassetten überführt und für weitere 16 h bei RT in Formaldehyd fixiert. Mittels einer ansteigenden Ethanolreihe und anschließender Inkubation in Xylol bei RT wurden die Organe dehydriert und anschließend in Paraffin (70 °C) eingebettet (Tab. 4). Knochen wurden vor der Dehydrierung für 24 bis 48 h bei RT zur Dekalzifizierung in *UseDecalc* inkubiert und anschließend für 1 h unter fließendem Leitungswasser gewaschen.

Aufbereitung von Gewebeschnitten für die Immunfluoreszenzfärbung

Am Mikrotom (Hydrax M55, Zeiss) wurden 3 µM oder 4 µM dicke Gewebeschnitte angefertigt, die über Nacht bei 50 °C getrocknet und anschließend bei RT gelagert wurden. Vorbereitend für die Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten wurde das Paraffin von den Gewebeschnitten durch eine Inkubation in Xylol entfernt und das Gewebe mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Tab. 4). Die rehydrierten Gewebeschnitte wurden in Reinstwasser geschwenkt und zur Antigendemaskierung für 1 h bei 99 °C in vorgeheizten Citratpuffer (*Dako REAL Target Retrieval Solution*) überführt. Anschließend wurden die abgekühlten Gewebeschnitte in 1x PBS gewaschen.

Tab. 4: Inkubationsbedingungen für die Dehydrierung und Einbettung von Organen und Retina-Explantaten in Paraffin sowie für die Rehydrierung von Gewebeschnitten.

Dehydrierung	Organe	Retina	Rehydrierung		
70 %iger Ethanol	30 min	30 min	Xylol	8 min	
	45 min	40 min		8 min	
96 %iger Ethanol	60 min	40 min	100 %iger Ethanol	5 min	
	45 min	30 min		5 min	
100 %iger Ethanol	45 min	30 min	96 %iger Ethanol	5 min	
	45 min	45 min		5 min	
Xylol	60 min	45 min	80 %iger Ethanol	5 min	
	30 min	20 min		5 min	
Einbettung	Paraffin	60 min	40 min	70 %iger Ethanol	5 min
		45 min	30 min		5 min
		60 min	45 min		

Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde der Gewebeschnitt mit einem Fettstift (Pap Pen, Kirsker Biotech) umrandet und in einer Feuchtkammer mit Primärantikörper-Lösung für 5 h bei 37 °C inkubiert (Tab. 5). Bei Verwendung des Antikörpers Anti-53BP1 H-300 wurden die Gewebeschnitte vor der Antikörperinkubation für 10 min mit eiskaltem Methanol inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal mit 0,1 % Tween in 1x PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht in 1x PBS bei 4 °C gelagert. Nach einem Waschschrift mit 1x PBS wurden die Gewebeschnitte in einer Feuchtkammer mit Sekundärantikörper-Lösung für 3 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden ebenfalls unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden dreimal in 0,1 % Tween in 1x PBS gewaschen. Die DNA der Zellen im Gewebe wurde mit DAPI (0,4 µg/ml in 1x PBS) angefärbt. Abschließend wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit 1x PBS gewaschen, mit VECTASHIELD *Mounting Medium* bedeckt, eingedeckelt und mittels Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C unter Lichtausschluss.

Tab. 5: Verwendete Kombinationen aus Primär- und Sekundärantikörpern sowie ihre Verdünnung. Alle Antikörper wurden in 1x PBS mit 0,2 % TritonX100 verdünnt.

Primärantikörper (Verdünnung)	Sekundärantikörper (Verdünnung)
Anti-53BP1, <i>polyclonal rabbit</i> (1:600)	Alexa Flour 594, <i>goat-anti-rabbit</i> (1:500)
Anti-53BP1 H-300, <i>polyclonal rabbit</i> (1:600)	Alexa Flour 594, <i>goat-anti-rabbit</i> (1:500)
Anti-γH2AX (Ser139), <i>monoclonal mouse</i> (1:400)	Alexa Flour 488, <i>goat-anti-mouse</i> (1:500)
Anti-γH2AX (Ser139), <i>monoclonal rabbit</i> (1:400)	Alexa Flour 488, <i>goat-anti-rabbit</i> (1:500)
Anti-H3K4me3, <i>polyclonal rabbit</i> (1:500)	Alexa Flour 594, <i>goat-anti-rabbit</i> (1:500)
Anti-Lamin B, <i>polyclonal goat</i> (1:200)	Alexa Flour 594, <i>chicken-anti-goat</i> (1:500)

3.2.11. Immunfluoreszenzmikroskopie und Auswertung von Retina-Explantaten

Für die Auswertung der Retina-Explantate wurden Stapelaufnahmen am Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5 II) angefertigt. Die Laserintensität war für alle Bildaufnahmen auf 6 % für die 405 nm Diode, auf 8 % für den 488 nm Argon-Laser (Laserstrom 15 %) und auf 10 % für den 561 nm DPSS-Laser eingestellt. Bei den Aufnahmen wurde immer darauf geachtet, dass sich die Fluoreszenzsignale nicht in der Sättigung befanden und das Intensitätsspektrum (0-255 bei 8 Bit) für jeden Fluorophor ausgenutzt wurde. Gegebenenfalls wurde über die Einstellung der Signalverstärkung, dem sogenannten *Gain*, die Signalintensität entsprechend angepasst.

Quantifizierung von γ H2AX-Foci als DSB-Marker

Für die Quantifizierung der γ H2AX-Foci nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen sowie in Bereichen ohne Ionenspuren nach der Bestrahlung mit Schwerionen wurden von jeder Retina 3-4 repräsentative Bereiche ($82 \times 82 \mu\text{m}^2$) ausgewählt. Die Aufnahme von Stapelaufnahmen erfolgte mit dem 63x HCX PL APO lambda blue Immersionsobjektiv (NA 1,4) und zusätzlichem 3x digitalen Zoom. Die resultierende Bildauflösung (Voxelgröße) betrug $54 \times 54 \times 210 \text{ nm}^3$. Diese Voxelgröße wurde entsprechend des *SVI Nyquist calculator* gewählt (Scientific Volume Imaging B.V.). Die γ H2AX-Foci wurden anhand der Stapelaufnahmen in min. 1000 Zellen aus min. zwei gefärbten Gewebeschnitten pro Retina ausgezählt.

Für die Quantifizierung der Foci nach Bestrahlung mit Schwerionen wurden von jeder Retina 10-15 repräsentative Bereiche ($102 \times 102 \mu\text{m}^2$) für die Bildaufnahme ausgewählt, die eine γ H2AX-Foci markierte Ionenspur zeigten und keine weiteren sichtbaren Ionenspuren in unmittelbarer Umgebung (min. $\pm 50 \mu\text{m}$ in XY-Richtung) aufwiesen. Die Stapelaufnahmen wurden mit dem 63x HCX PL APO lambda blue Immersionsobjektiv (NA 1,4) mit zusätzlichem 2,4x digitalen Zoom angefertigt. Die resultierende Bildauflösung (Voxelgröße) betrug $50,1 \times 50,1 \times 130 \text{ nm}^3$. In diesen Aufnahmen mit sichtbarer Ionenspur wurden die Koordinaten (X, Y, Z) aller γ H2AX-Foci innerhalb von $20 \mu\text{m}$ rund um die Ionenspur erfasst. Dabei wurde manuell zwischen γ H2AX-Foci, welche sich innerhalb der Ionenspur (γ H2AX_I-Foci) im Zentrum der Bahnspur befanden und Foci im äußeren Bereich der Bahnspur (γ H2AX_O-Foci) differenziert. Die Koordinaten der Foci und Zellen wurden im manuell bestimmten Mittelpunkt ihres Fluoreszenzsignals mit den eigens dafür geschriebenen ImageJ-Makros "Foci" und "Zellen" (siehe Anhang, Kapitel 8.1) erfasst. Bei der Erfassung der Zellkernkoordinaten wurde vorausgesetzt, dass die durch die DAPI-Färbung sichtbare stark verdichtete heterochromatische DNA im Zentrum des Zellkerns lokalisiert ist (siehe auch Abb. 9; (148, 149)). Anschließend wurde eine 3D-Regressionsanalyse (über eine Hauptachsentransformation, OriginPro 9) mit den Koordinaten der γ H2AX_I-Foci entlang der Trajektorie vorgenommen und der orthogonale Abstand der γ H2AX-Foci sowie der Zellmittelpunkte zur

Regressionsgerade (approximierten Trajektorie des Ions) berechnet. Bei der Berechnung wurde der Abstand in Z-Richtung zwischen den Bildebenen aufgrund einer Diskrepanz zwischen den Brechungsindices, einem sogenannten *refractive index mismatch*, um den Faktor 0,9474 korrigiert. Dieser entsteht durch eine Differenz der Brechungsindices bei dem Übergang des Lichtes zwischen der Öllinse (Brechungsindex 1,52) und dem verwendeten *Mounting Medium* (Brechungsindex 1,44).

Messung des Zellkerndurchmessers sowie des Durchmessers und der Intensität von Foci

Für die Analyse des Focus- und des Zellkerndurchmessers, sowie der Focusintensität, wurde jeweils die mittlere Z-Ebene des γ H2AX-Focus- oder des SYTO16- bzw. DAPI-Fluoreszenzsignals manuell bestimmt. Da nicht jede Zelle oder jeder Focus perfekt rund ist, wurde für die Analyse der Durchmesser jeweils der Mittelwert aus der Messung der kürzesten und der längsten Strecke durch die Zelle bestimmt (dabei lag zwischen den beiden Messstrecken ein rechter Winkel vor). Der Durchmesser der Foci bzw. der Zellen wurde mit dem Programm ImageJ bzw. LAS AF lite vermessen. Für die Messung der Intensität wurde das Focus-Fluoreszenzsignal manuell umrandet und die mittlere Intensität des Signals mit dem Programm ImageJ bestimmt. Über einen *Line-Plot* wurde stichprobenartig überprüft, dass das Fluoreszenz-Signal nicht gesättigt war und die manuelle Umrandung des Focus zur Messung der mittleren Signalintensität möglichst bei der Halbwertshöhe des Fluoreszenzsignals gesetzt wurde.

3.2.12. Immunfluoreszenzmikroskopie und Auswertung von Gewebeschnitten

Quantifizierung von γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci als DSB-Marker

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung von Lungen-, Nieren-, Leber-, Knochen-, Herzgewebe erfolgte direkt am Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss) bei 1000-facher Vergrößerung. Unabhängig von der Bestrahlungsart oder Dosis wurden in den murinen Geweben jeweils nur Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzykluses ausgewählt. Es wurden die Zellen des Bronchialepithels der Lunge, die Tubuluszellen der Niere, die Hepatozyten der Leber, die Zellen der Knochenhaut sowie die längsgeschnittenen Zellkerne der gestreiften Herzmuskelfasern im Herzgewebe ausgewertet. Die Zellkerne wurden in den Geweben anhand des DAPI-Signals identifiziert. Anschließend wurden die 53BP1- oder γ H2AX-Foci in min. 1500 Zellen aus zwei oder mehr gefärbten Gewebeschnitten pro Maus und Zeitpunkt ausgezählt. Die Quantifizierung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, verblindet.

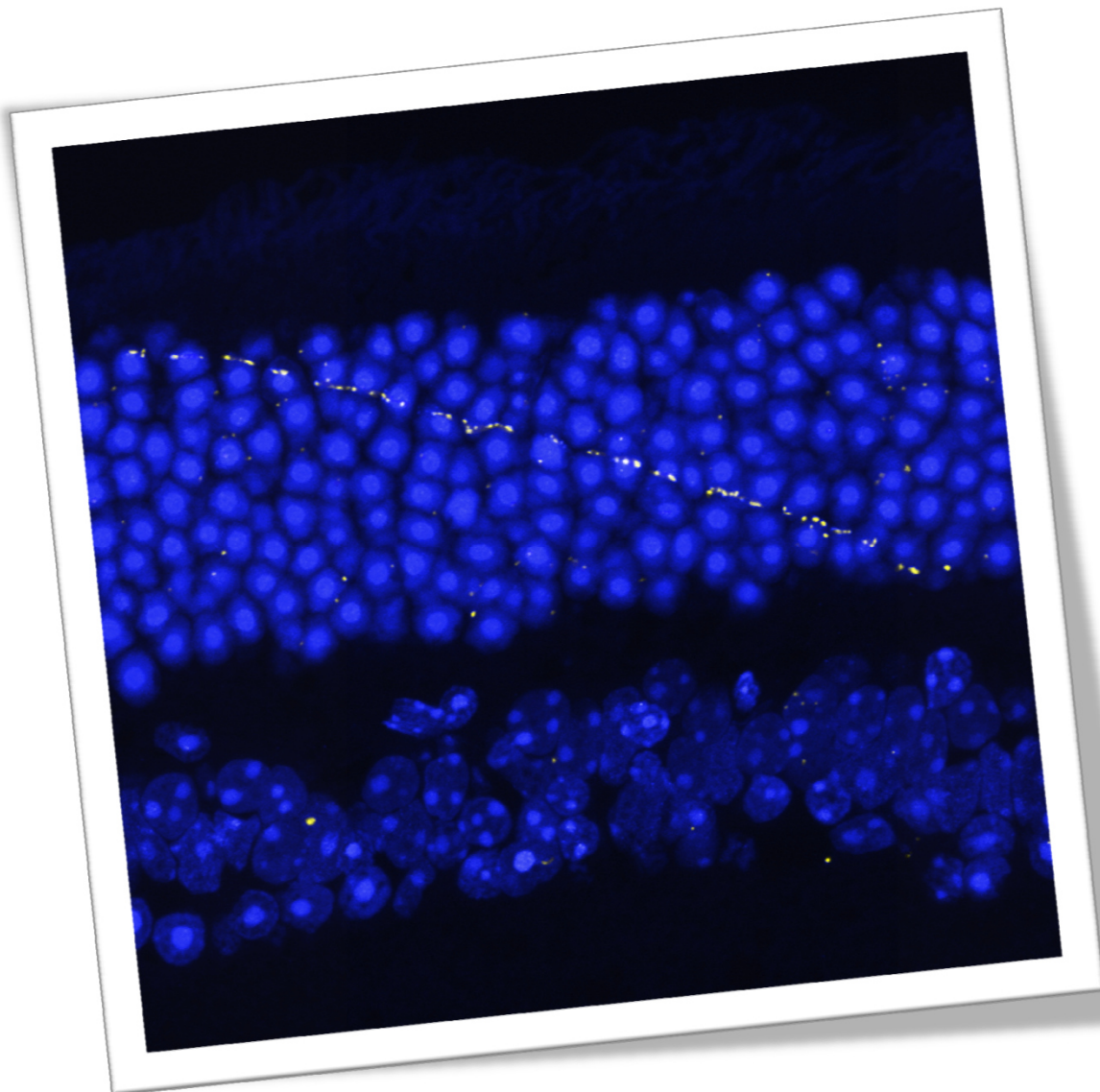
Messung des Fläche und der Intensität von Foci

Für die Messung der Fläche und der mittleren Signalintensität von 53BP1-Foci im Bronchialepithel wurden Stapelaufnahmen am Konfokalmikroskop angefertigt (für Details zu den Aufnahmebedingungen siehe Abschnitt 3.2.6). Aufgrund des geplanten Vergleiches der mittleren Signalintensität und der Fläche eines Focus nach Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlen oder Radon wurde die Laserintensität bzw. der Gain anhand der 53BP1-Tracks in Zellen des Bronchialepithels von Radon-exponierten Mäusen eingestellt, da diese Foci erfahrungsgemäß die höchste Signalintensität aufweisen. Diese Einstellungen wurden dann für die folgenden Aufnahmen von Foci in unbestrahlten und in Röntgen-bestrahlten Zellen beibehalten. Für jede Bedingung wurden zehn repräsentative Bereiche für die Bildaufnahme ausgewählt. Die Aufnahmen erfolgten mit 2,5x Zoom und einer resultierenden Auflösung $0,1 \times 0,1 \times 0,21 \mu\text{m}^3$.

In den Stapelaufnahmen wurde das Focus-Fluoreszenzsignal in einer mittleren, signalintensiven Z-Ebene manuell umrandet und die mittlere Anzahl der Pixel sowie die Signalintensität mit dem Programm ImageJ bestimmt. Über einen *Line-Plot* wurde stichprobenartig überprüft, dass das Fluoreszenz-Signal des Focus nicht in der Sättigung war und die manuelle Umrandung möglichst bei der Halbwertshöhe des Fluoreszenzsignals gesetzt wurde. Pro Maus wurden jeweils 50-100 Foci aus mehreren Bildaufnahmen vermessen.

4. Biodosimetrie:

**Direkte Messung der dreidimensionalen
Schadensverteilung nach der Exposition mit
Schwerionen in der Mausretina**



Schwere Ionen sind ein Teil der natürlich auftretenden Strahlung, z.B. von kosmischer Strahlung, sie werden aber auch zunehmend in der Tumorthherapie eingesetzt (150, 151). Bei Bestrahlung von biologischem Gewebe hinterlassen sie eine Bahnstruktur von initialen Ionisationsereignissen, die zu Schädigungen der Zelle führen. Dabei wird im Zentrum der Bahnstruktur bzw. entlang der Ionenspur eine hohe Dosis deponiert, während im umliegenden Gewebe nur eine geringe Dosis durch δ -Elektronen deponiert wird (152, 153). Die Aufklärung des so entstehenden dreidimensionalen Schadensmusters um die Ionenspur herum ist zum Verständnis der Strahlenwirksamkeit von Schwerionen unerlässlich. Bisher wurde diese Bahnstruktur jedoch lediglich mit physikalischen Messungen untersucht oder durch Modelle simuliert, die nicht durch entsprechende biologische Analysen verifiziert werden konnten (153-156). Daher war es das Ziel dieses Teilprojektes, die Dosisdeposition innerhalb der Bahnstruktur von Ionen erstmals in einem Modellorgan zu quantifizieren. Dabei macht man sich zunutze, dass die durch die Bestrahlung mit Schwerionen in lebenden Zellen entstehenden DNA-Schäden zur biodosimetrischen Bewertung der Dosisdeposition herangezogen werden können.

Physikalische Berechnungen für die geplante Bestrahlung mit Schwerionen zeigten, dass bereits wenige Mikrometer von der Ionenspur entfernt eine Dosis im Milli-Gray-Bereich vorliegt (siehe Kapitel 4.1 und 8.2). Für die geplante, dreidimensionale Biodosimetrie bedeutete dies, dass ein sehr sensibles Nachweisverfahren für DNA-DSBs, wie der γ H2AX-Foci-Assay, benötigt wird (128). Der Nachweis von DSBs ist allerdings auf den Zellkern einer Zelle begrenzt. Daher ist ein Modellorgan mit einer hohen Zellkerndichte von besonderer Bedeutung für die Biodosimetrie, um einen möglichst lückenlosen Nachweis der DSBs und somit des Ionen-induzierten Schadensmusters über mehrere Zellen hinweg zu gewährleisten (Abb. 8). Eine anschließende, abstandsabhängige Quantifizierung der DNA-Schäden erlaubt sowohl die Bewertung der Dosisdeposition als auch die Analyse der Bahnstruktur der Ionen.

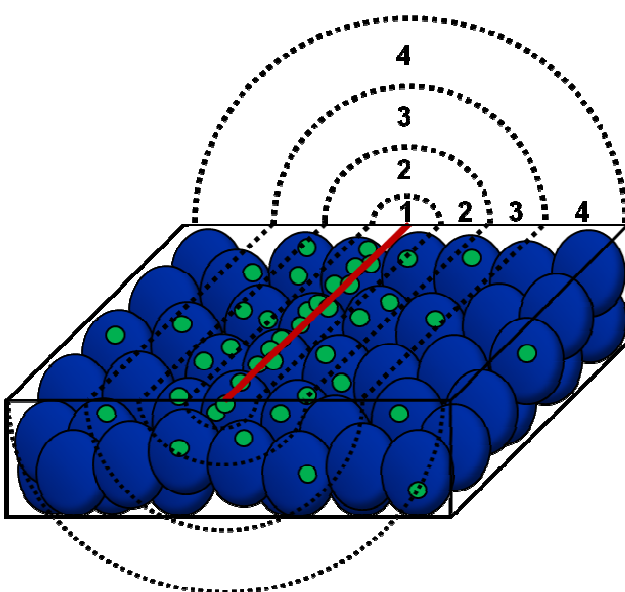


Abb. 8: Schematische Darstellung des erwarteten Schadensmusters von Schwerionen sowie der geplanten Biodosimetrie. Bei der Bestrahlung von Zellen im Gewebe mit hoch-energetischen Schwerionen wird entlang der Ionenspur (rote Linie) eine hohe Dosis deponiert, während im umliegenden Gewebe nur eine geringe Dosis durch δ -Elektronen deponiert wird. Das Auftreten von DSBs in den Zellkernen (blaue Kugeln), die über γ H2AX-Foci (grüne Punkte) nachgewiesen werden, korreliert mit der deponierten Dosis. Im Rahmen der Biodosimetrie werden die Abstände aller γ H2AX-Foci (und Zellen) zur Ionenspur berechnet. Diese werden den entsprechenden Kategorien (gestrichelte Linien und Zahlen 1-4) zugeordnet und dadurch abhängig vom Abstand quantifiziert. Somit kann aus der Analyse des Schadensmusters auf die Bahnstruktur geschlossen werden. (Frei modifiziert nach dem DLR-Projektantrag; 50WB1227)

4.1. Ergebnisse

4.1.1. Die murine Retina als Modellorgan für die Biodosimetrie nach Bestrahlung mit Schwerionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die murine Retina als Modellorgan für die Untersuchung von niedrigen Strahlendosen (Milli-Gray-Bereich) im Zuge der Biodosimetrie etabliert. Die Retina besteht zu 97 % aus Stäbchen und zu 3 % aus Zapfen und zeichnet sich durch eine dichte Anordnung der Photorezeptorzellkerne aus (157). Die Immunfluoreszenzfärbung des Kernmembranmarkers Lamin B in der Retina bestätigte, dass die Photorezeptoren über einen geringen Anteil an Zytoplasma verfügen sowie nur einen geringen intrazellulären Abstand aufweisen (Abb. 9A). Anschließende Messungen der DAPI-Intensität in der Photorezeptorschicht zeigten, dass ca. 70 % (SD 4) der analysierten Gewebeausschnitte mit DNA bzw. mit Zellkernen bedeckt waren, was die Sensitivität des γ H2AX-Foci-Assays bei der Quantifizierung der DSBs nach der Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen erhöht. Die Zellkerne der überwiegend vorliegenden Stäbchenzellen von Photorezeptoren (zukünftig Photorezeptoren genannt) besitzen eine einzigartige Chromatinstruktur mit einem zentralen heterochromatischen Chromocenter, welches bereits in der DAPI-Färbung sichtbar wird und von fakultativ-heterochromatischer sowie euchromatischer DNA umgeben ist (Abb. 9B; (148, 149)). Diese spezialisierte Chromatinanordnung der Photorezeptoren ist typisch für nachtaktive Tiere und ermöglicht ihnen vermutlich auch bei "schlechten" Lichtverhältnissen gut sehen zu können (149).

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Fixierung des Gewebes oder die erforderlichen De- und Rehydrierungsprozesse bei der Herstellung bzw. Färbung von Gewebeschnitten (für die Protokolle zur Fixierung und Färbung siehe Methoden, Kapitel 3.2.10) die Ausdehnung des Gewebes verändert. Diese Schritte sind für die spätere Analyse der DNA-Schäden mit dem γ H2AX-Foci-Assay nach der Bestrahlung unabdingbar. Allerdings würde eine Veränderung der Ausdehnung von lebendem im Vergleich zu fixiertem Gewebe die geplante abstandsabhängige Quantifizierung der Foci für die Analyse des Schadensmusters von Ionen entscheidend beeinflussen und müsste bei der Abstandsberechnung entsprechend berücksichtigt werden. In einem zusätzlichen Kontrollexperiment wurden deshalb mögliche Veränderungen der Ausdehnung des Gewebes durch die erforderlichen De- und Rehydrierungsprozesse anhand des Zellkerndurchmessers überprüft. Dazu wurden die Retina-Explantate (bestehend aus dem Glaskörper und umgebender Retina) in Kulturmedium mit dem Lebend-DNA-Farbstoff SYTO16 inkubiert und Bildaufnahmen von lebenden sowie fixierten Photorezeptoren angefertigt. Zum Vergleich wurden ebenfalls Bildaufnahmen von DAPI-gefärbten Photorezeptoren aus Gewebeschnitten angefertigt. Anschließend wurde der Zellkerndurchmesser von lebenden und fixierten Photorezeptoren anhand der Färbung mit SYTO16 sowie in Gewebeschnitten mittels der DAPI-Färbung bestimmt (Abb. 9C). Der Zellkerndurchmesser der Photorezeptoren von ca. 4,7 μ m

blieb über die Fixierung bzw. über die De- und Rehydrierung hinweg unverändert (Abb. 9D). Dementsprechend wurde ein möglicher Effekt der De- und Rehydrierung auf die Ausdehnung des Gewebes und damit ein Einfluss auf die geplante Biodosimetrie ausgeschlossen.

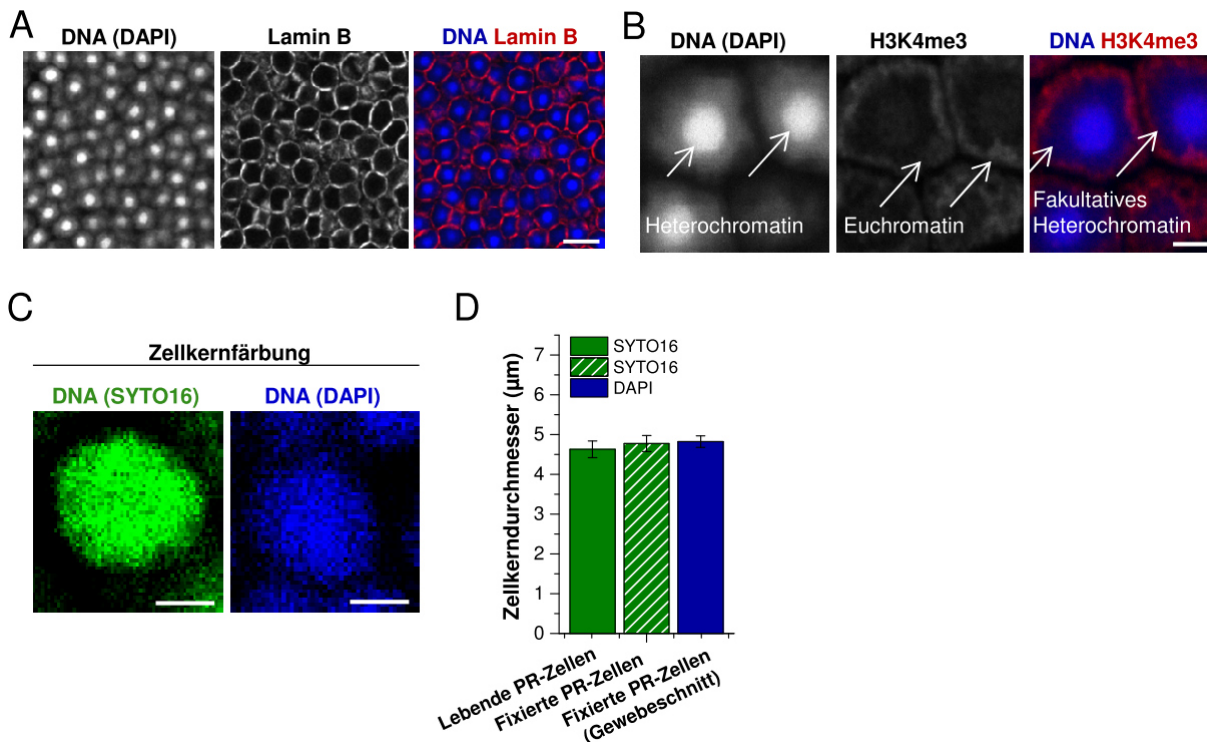


Abb. 9: Die Photorezeptorzellkerne in der murinen Retina sind dicht gepackt und zeigen eine einzigartige Chromatinstruktur. (A) Repräsentative Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung des Intermediärfilamentes Lamin B von Photorezeptoren der Maus. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 10 µm. (B) Repräsentative Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung des Euchromatinmarkers H3K4me3 von Photorezeptorzellen der Maus. Die verschiedenen Chromatinregionen sind mit weißen Pfeilen markiert. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 2 µm. (C+D) Der Zellkerndurchmesser von Photorezeptoren bleibt durch den Aufarbeitungsprozess unverändert. Retina-Explantate wurden mit dem DNA-Lebendzellfarbstoff SYTO16 inkubiert und für mikroskopische Aufnahmen kleblattförmig aufgeschnitten. Anschließend wurden die Retina-Explantate fixiert und weitere Aufnahmen angefertigt. Zum Vergleich wurden die DAPI-gefärbten Zellkerne der Photorezeptoren aus Paraffingewebeschnitten vermessen. (C) Repräsentative Aufnahmen der Photorezeptoren nach der Inkubation mit SYTO16 sowie nach der DAPI-Färbung in fixierten Gewebeschnitten. Der Maßstabsbalken entspricht 2 µm. (D) Analyse des Zellkerndurchmessers von Photorezeptorzellen (PR-Zellen). Der Durchmesser wurde in lebenden und fixierten Photorezeptoren in der mittleren Z-Ebene anhand des Fluoreszenzsignals bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Zellkerndurchmessers von zwei Retinae und deren Standardabweichung. Pro Retina wurden 50 Zellkerne vermessen. (Frei modifiziert nach Mirsch *et al.* (143))

Aufbauend auf der Morphologie der Retina wurde ihre Eignung für die geplante Biodosimetrie aus strahlenbiologischer Sicht überprüft und die Induktion von DSBs nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlen mittels des γ H2AX-Foci-Assays charakterisiert. Für eine verlässliche Analyse von niedrigen Strahlendosen ist eine konstante bzw. reproduzierbare, niedrige Anzahl an spontan auftretenden DNA-Schäden unerlässlich. Die Photorezeptorzellen waren zum untersuchten Zeitpunkt bereits in einem post-replikativen, ausdifferenzierten Zustand (158), sodass Zellzykluseffekte auf die Quantifizierung der DSBs ausgeschlossen und die γ H2AX-Foci in allen Zellen ausgezählt wurden. Die Quantifizierung von spontan auftretenden DSBs in unbestrahlten Photorezeptoren aus Retina-Explantaten zeigte ein sehr niedriges Schadenslevel von 0,09 γ H2AX-Foci pro Zelle (SD 0,02; Abb. 10A+B). Anschließend

wurden Retina-Explantate (*ex vivo*) mit Dosen zwischen 5-50 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt, 15 min nach der Bestrahlung fixiert und die γ H2AX-Foci quantifiziert. Die Anzahl der γ H2AX-Foci nach Bestrahlung nahm linear mit der Dosis zu, wobei im Mittel 11,8 Foci pro Zelle und Gy (SE 0,4) induziert wurden (Abb. 10C). Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen einer anderen Studie überein, die 9-10 DSBs pro Photorezeptorzelle nach der Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlen detektierte (148). Die beobachtete Induktionsrate ist im Vergleich zur Induktionsrate von 20 DSBs pro Zelle pro Gy in kultivierten G1-Phase Zellen viel niedriger, jedoch nicht im Vergleich zur Induktionsrate anderer Organe der Maus (137, 148, 159). Folglich handelt es sich nicht um ein spezielles Phänomen bei der Strahlenantwort der murinen Retina.

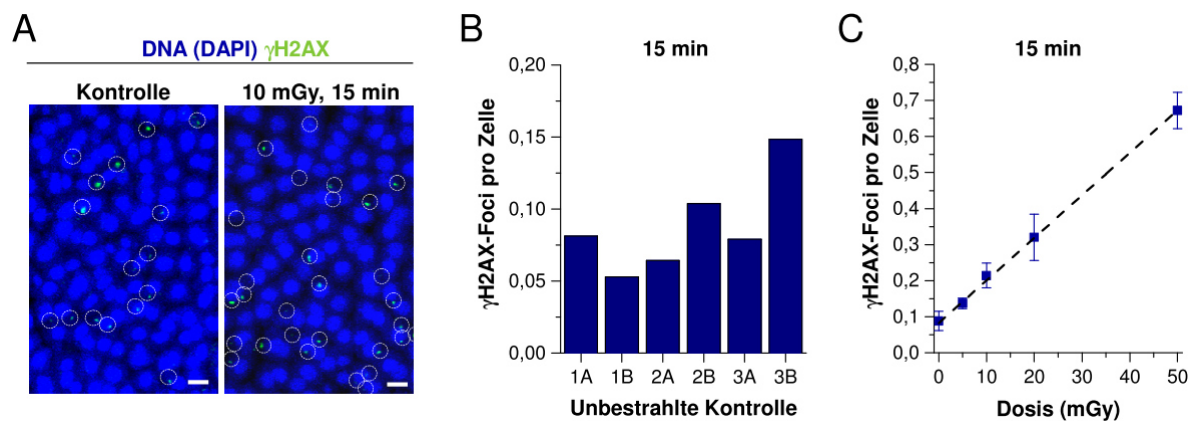


Abb. 10: Lineare Induktion von γ H2AX-Foci in Photorezeptorzellen nach niedrigen Dosen Röntgenstrahlung. Retina-Explantate wurden *ex vivo* mit 5, 10, 20, 50 mGy Röntgenstrahlung bestrahlt, 15 min nach der Bestrahlung fixiert und die Gewebeschnitte gegen γ H2AX gefärbt. Unbestrahlte Retina-Explantate dienten als Kontrolle. (A) Repräsentative Aufnahme (Maximumintensitätsprojektion) der Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX in unbestrahlten und bestrahlten Photorezeptorzellen der Maus. Die γ H2AX-Foci wurden zur besseren Sichtbarkeit weiß eingekreist. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. (B) Quantifizierung der spontan auftretenden γ H2AX-Foci. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzelmessungen (aus je 2 Färbungen) von drei Retinae, wobei pro Retina die γ H2AX-Foci in min. 1500 Zellen ausgezählt wurden. (C) Quantifizierung und Regressionsanalyse der γ H2AX-Foci nach Bestrahlung. Dargestellt ist der Mittelwert von drei Experimenten und deren Standardabweichung. Für jeden Zeitpunkt wurden pro Retina die γ H2AX-Foci in min. 1500 Zellen ausgezählt. Die gestrichelte Gerade der Regressionsanalyse wird durch $f(x)=0,0118x+0,09$ ($R^2=0,994$) beschrieben. (Frei modifiziert nach Mirsch *et al.* (143))

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass die Photorezeptoren in der Retina der Maus durch die dichte Anordnung der Zellkerne, dem sehr niedrigen Level an spontan auftretenden DSBs, sowie der über einen weiten Dosisbereich linearen Schadensantwort ein ideales Modellgewebe für die Analyse des Schadensmusters bzw. der zugrundeliegenden Bahnstruktur von Schwerionen darstellt.

4.1.2. Biodosimetrie nach Bestrahlung mit Schwerionen

Nachweis des Schadensmusters nach Bestrahlung mit Titan-Ionen

Mit der Retina als Modellorgan sollte das Schadensmuster von Schwerionen nachgewiesen werden. Dabei wurde neben der Morphologie der Photorezeptorschicht auch die relativ einfache, formgegebene Bestrahlungsgeometrie der Retina ausgenutzt, um Gewebeschnitte nahezu parallel zur Bestrahlungsrichtung anzufertigen. Die Orientierung der Retina bei der Bestrahlung und der Anfertigung von Gewebeschnitten ist im Methodenteil schematisch dargestellt (siehe Kapitel 3.2.7, Abb. 7). Dies sollte es ermöglichen das Schadensmuster der Ionen über viele Zellkerne hinweg zu beobachten, was bisher in Studien mit kultivierten Zellen nicht möglich war (116).

Zum Nachweis des Schadensmusters von einzelnen Schwerionen wurden Retina-Explantate mit sehr niedrigen Fluenzen Titan-Ionen ($7,5 \times 10^3$ und $7,5 \times 10^4$ Ionen/cm²) bestrahlt und 15 min nach der Bestrahlung fixiert. Unbestrahlte Retina-Explantate wurden entsprechend behandelt und dienten als Kontrolle. Die Synergie aus der Bestrahlungsgeometrie, der dichten Anordnung der Photorezeptorzellkerne sowie der Sensitivität des γ H2AX-Assays ermöglichte es die Ionenspuren in Form von kettenartigen Strukturen aus relativ großen und intensiv-leuchtenden γ H2AX-Foci über mehrere Zellkerne hinweg (teilweise über eine Länge von $>30 \mu\text{m}$) zu beobachten (Abb. 11A). Bei beiden Fluenzen lag die Anzahl der Ionenspuren pro Blickfeld ($100 \times 100 \times 12 \mu\text{m}^3$) unter eins, sodass diese Strukturen nur selten beobachtet wurden. Dass es sich bei den kettenartigen γ H2AX-Foci-Strukturen um Ionenspuren handelte, wurde durch deren Fluenz-abhängige Zunahme in Experimenten mit höheren Fluenzen ($7,5 \times 10^5$ und $7,5 \times 10^6$ Titan-Ionen/cm²) bestätigt.

Neben den einzeln vorliegenden Ionenspuren konnten nach der Bestrahlung mit Titan-Ionen auch kleine, weniger intensiv-leuchtende γ H2AX-Foci beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob es sich dabei lediglich um spontan aufgetretene Schäden handelte oder um Schäden, die durch δ -Elektronen induziert wurden, wurden die von den Ionenspuren räumlich getrennten γ H2AX-Foci in Photorezeptoren von bestrahlten Retinae und die γ H2AX-Foci von unbestrahlten Retinae quantifiziert. Aufgrund der hohen, maximalen Reichweite der δ -Elektronen von Titan-Ionen (0.85 GeV/u, 129 keV/ μm) von bis zu 4,8 mm (für Formeln und Berechnungen siehe Material und Methoden) und um die γ H2AX-Foci von Ionenspuren sicher auszuschließen, wurden für die Analyse der bestrahlten Retinae die γ H2AX-Foci nur in Blickfeldern ohne sichtbare Ionenspur quantifiziert. Diese Quantifizierung zeigte, dass bestrahlte Retinae ($7,5 \times 10^3$ bzw. $7,5 \times 10^4$ Titan-Ionen/cm²) mit 0,23 bzw. 0,31 γ H2AX-Foci pro Zelle (jeweils SD 0,1) signifikant mehr γ H2AX-Foci aufwiesen als unbestrahlte Retinae mit 0,13 Foci pro Zelle (SD 0,05) (Abb. 11B). Dies deutet daraufhin, dass tatsächlich 50-60 % der beobachteten, kleineren Foci in den Ionen-bestrahlten Retinae auf die Dosisdeposition von δ -Elektronen aus

zahlreichen, überlagernden Bahnstrukturen zurückzuführen waren. Infolgedessen zeigten die Retinae, die mit höheren Fluenzen (7.5×10^4 Ionen/cm²) bestrahlt wurden, auch eine konsistent erhöhte mittlere Anzahl der Foci pro Zelle gegenüber den Retinae, die mit der niedrigen Fluenz (7.5×10^3 Ionen/cm²) bestrahlt wurden. Die bei der Quantifizierung beobachtete, breite Streuung der mittleren Anzahl an γ H2AX-Foci spiegelte die zu erwartende, lokale Variabilität der Dosisdeposition bzw. der sogenannten Hintergrunddosis durch überlagernde Bahnstrukturen wieder. Sobald sich eine Ionenspur in relativer räumlicher Nähe zu untersuchten Zellen befindet, ist ein lokal begrenzter Anstieg der Dosisdeposition durch δ -Elektronen zu erwarten. Bei der genaueren Analyse der Fluenzabhängigkeit der Hintergrunddosis fiel auf, dass die beobachtete, residuale Anzahl der Foci pro Zelle nicht proportional zur applizierten Anzahl der Ionen (Fluenz) anstieg. Dieses Ergebnis war jedoch konsistent mit dem Ergebnis einer entsprechenden Modellierung der Hintergrunddosis, die von T. Friedrich durchgeführt wurde. Auch hier wurde im Gegensatz zum erwarteten Faktor von 10 nur eine knappe Verdopplung der Foci pro Zelle festgestellt (143).

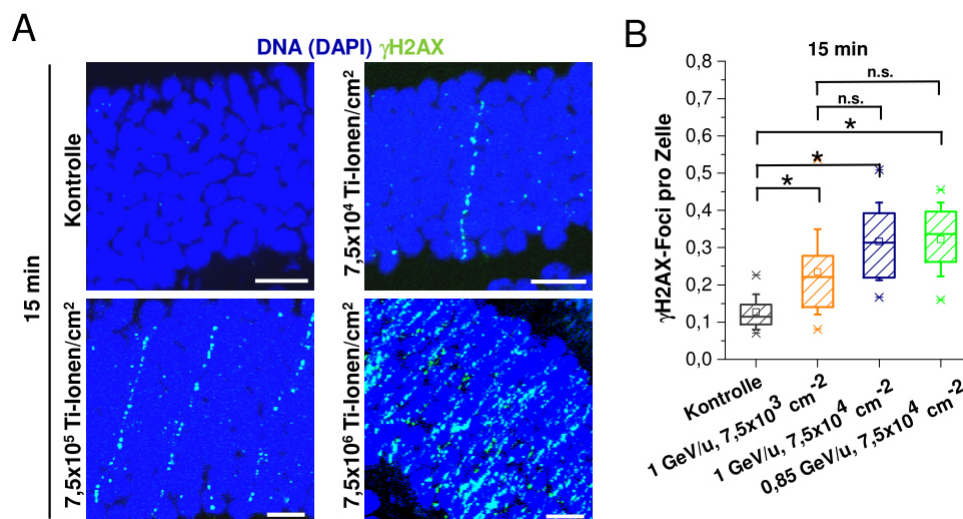


Abb. 11: Photorezeptorzellen ermöglichen den Nachweis von Bahnsuren über γ H2AX-Foci nach Bestrahlung mit Titan-Ionen. Retina-Explantate wurden ex vivo mit verschiedenen Fluenzen Titan (Ti)-Ionen (0,85 GeV/u, 129 keV/ μ m) bestrahlt und 15 min nach der Bestrahlung fixiert. Gewebeschnitte wurden parallel zur Bestrahlungsrichtung angefertigt (schematisch dargestellt in Material und Methoden, Abb.7) und gegen γ H2AX gefärbt. (A) Repräsentative Aufnahmen (Maximumintensitätsprojektion) einer Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX in den Photorezeptorzellen. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 10 μ m. (B) Quantifizierung der γ H2AX-Foci abseits der Ionenspur. Dargestellt ist die Verteilung der gemittelten Anzahl der Foci pro Zelle in Boxplots (25-75 % der Daten) sowie deren Standardabweichung zum Mittelwert (Whisker). γ H2AX-Foci wurden in 4000 Zellen aus Bildern ohne sichtbare Ionenspur aus einer Retina (0,85 GeV/u) oder zwei Retinae (1 GeV/u) erfasst. Die "x" unter und über der Box umfassen 98 % der Daten. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließenden Bonferroni überprüft (*: $p < 0,05$). (Frei modifiziert nach Mirsch *et al.* (143))

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Retina als Modellorgan erstmals den Nachweis von Ionenspuren in Form einer Kette aus großen, hellen γ H2AX-Foci über zahlreiche Zellkerne hinweg ermöglichte. Dies wird die Präzision und Aussagekraft der folgenden abstandsabhängigen Quantifizierung der Foci (Biodosimetrie) entscheidend steigern. Darüber hinaus wurden auch γ H2AX-Foci abseits der Ionenspuren beobachtet, die durch δ -Elektronen

induziert wurden. Hier wurde die Dosisaddition von überlappenden Bahnspuren in Form einer Hintergrunddosis abseits der Ionenspuren nachgewiesen, was sich in der signifikant erhöhten Anzahl der Foci pro Zelle gegenüber dem Kontrollwert sowie in der Differenz zwischen den Fluenzen selbst zeigte.

Methodisches Vorgehen und Festlegung der Analysegrenzen für die abstandsabhängige Analyse der γ H2AX-Foci

Für eine möglichst genaue Analyse der Dosisdeposition von einzelnen Schwerionen wurden für einzeln vorliegende Ionenspuren jeweils hochauflösende Stapelaufnahmen angefertigt. In diesen wurde eine dreidimensionale, abstandsabhängige Analyse der γ H2AX-Foci innerhalb und außerhalb der Ionenspur durchgeführt (vgl. Abb. 8). Dabei machte man sich zunutze, dass die DSB-abhängige Modifikation des H2AX (γ H2AX) nur im Bereich von ca. 2 Megabasenpaaren um den Bruch auftritt und so eine relativ genaue Positionsbestimmung des DSBs erlaubt (71). Die Koordinaten aller γ H2AX-Foci wurden anhand des Mittelpunktes ihres Fluoreszenzsignals in den Stapelaufnahmen erfasst, wobei zwischen γ H2AX_I-Foci, die im Inneren der Bahnstruktur die Ionenspur markieren (rot gekennzeichnet in Abb. 12A sowie dreidimensional dargestellt in Abb. 12B) und γ H2AX_O-Foci im äußeren Bereich der Bahnstruktur differenziert wurde. Mit den Koordinaten der γ H2AX_I-Foci wurde eine dreidimensionale Regressionsanalyse mittels einer Hauptachsentransformation durchgeführt und so die Flugbahn des Ions rekonstruiert (für detaillierte Informationen siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.11). Anschließend wurden die Abstände aller Foci sowie aller Zellen zur Regressionsgerade berechnet, die sich innerhalb eines Radius von maximal 10 μ m zur Regressionsgerade befanden.

Für die Festlegung des maximalen Abstandes von 10 μ m zur Regressionsgerade war die Sensitivität des γ H2AX-Foci-Assays entscheidend. Dieser Assay ist eine sehr sensitive Methode zur Messung von DSBs. Sinkt die Dosis jedoch unter 1-2 mGy, ist auch diese Methoden nicht mehr sensitiv genug um DSBs nachzuweisen (126, 137). Um einen Anhaltspunkt zu finden, bei welchem Abstand zur Ionenspur diese Dosis erreicht wird, wurden physikalische Berechnungen zur Bahnstruktur der Titan-Ionen (0,85 GeV, 129 keV/ μ m) vorgenommen (für Formeln und Berechnungen siehe Anhang, Kapitel 8.2). Die Berechnung der Dosisdeposition für eine einzelne Bahnspur zeigte, dass die Dosis in deren Zentrum (wenige nm) mehrere hundert Gray betrug, während die von δ -Elektronen deponierte Dosis mit zunehmendem Abstand zum Zentrum quadratisch abfiel (Abb. 12C; durch die doppelt-logarithmische Auftragung als Gerade mit der Steigung -2 dargestellt). Im Abstand von 1 μ m zum Bahnspurzentrum betrug die Dosis ca. 200 mGy und sank durch den quadratischen Abfall ab einem Abstand von 10 μ m unter 2 mGy.

In den folgenden Untersuchungen wurden daher nur Zellen und Foci ausgewertet, die maximal 10 μm von der Regressionsgeraden entfernt waren.

Im Rahmen der Biodosimetrie wurde ein Vergleich zwischen der physikalisch deponierten Dosis (in der Einheit "Gray") und des experimentellen Ergebnisses (in der Einheit "Foci pro Zelle") angestrebt. Die notwendige Umrechnung setzte eine lineare Strahlenantwort voraus, wie sie nach der Exposition mit Röntgenstrahlen vorlag (vgl. Abb. 10C). Im Gegensatz zu durch Röntgenstrahlen induzierten DSBs können innerhalb der Ionenspur geclusterte DSBs auftreten. Dies bedeutet, dass mehrere DSBs innerhalb eines γH2AX_I -Focus vorliegen können und daher keine lineare Strahlenantwort zu erwarten ist (52, 114, 119, 120, 160, 161). Um dies zu überprüfen, wurde eine Messung des Durchmessers sowie der mittleren Intensität durchgeführt, die bestätigte, dass γH2AX_I -Foci signifikant größer (0,5 μm vs. 0,3 μm (SD 0,16 bzw. 0,10)) und heller (mittlerer Grauwert von 150 vs. 130 (jeweils SD 36)) sind als γH2AX_O -Foci bzw. Röntgenstrahlen-induzierte γH2AX -Foci. Daraus wurde in Übereinstimmung mit der Literatur geschlossen, dass es sich bei γH2AX_I -Foci um komplexe oder geclusterte DSBs handelte (Abb. 12D, Abb. 12E, (114, 120, 161)). γH2AX_O -Foci, hingegen, zeigten einen vergleichbaren Focusdurchmesser wie Foci, die durch 10 mGy Röntgenstrahlen (0,3 μm (SD 0,15)) induziert wurden. Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da die hauptsächliche Schadensinduktion von Röntgenstrahlen auf der indirekten Strahlenwirkung beruht, also ebenfalls über Elektronen vermittelt wird. Diese vergleichbare Größe bzw. Komplexität von γH2AX_O -Foci und Foci nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen erlaubte zur Dosisberechnung im äußeren Bereich der Bahnspur (für γH2AX_O -Foci) die Anwendung einer Kalibriergeraden, welche auf Messungen der linearen Strahlenantwort auf Röntgenstrahlen beruht. Für eine valide Dosisberechnung wurde daher experimentell eine Grenze gesucht, durch welche eine separate Quantifizierung der γH2AX_I -Foci (komplexe DSBs) und der γH2AX_O -Foci (einfache DSBs) vorgenommen werden konnte. Die Berechnung der Abstände von γH2AX_I -Foci zur Regressionsgeraden zeigte, dass ca. 75 % dieser Foci einen geringeren Abstand als 1 μm zur Regressionsgeraden besaßen bzw. ca. 99 % dieser Foci einen geringeren Abstand als 2 μm (Abb. 12F). Der Abstand von 2 μm zur Regressionsgeraden wurde für die folgende Biodosimetrie als minimaler Abstand verwendet, um die γH2AX_O -Foci separat zu quantifizieren und damit die durch δ -Elektronen deponierte Dosis zu berechnen. Daher wurden die ersten biodosimetrischen Analysen einzelner Ionenspuren in den zwei Kategorien von 0-2 μm und 2-10 μm um die Ionenspur durchgeführt.

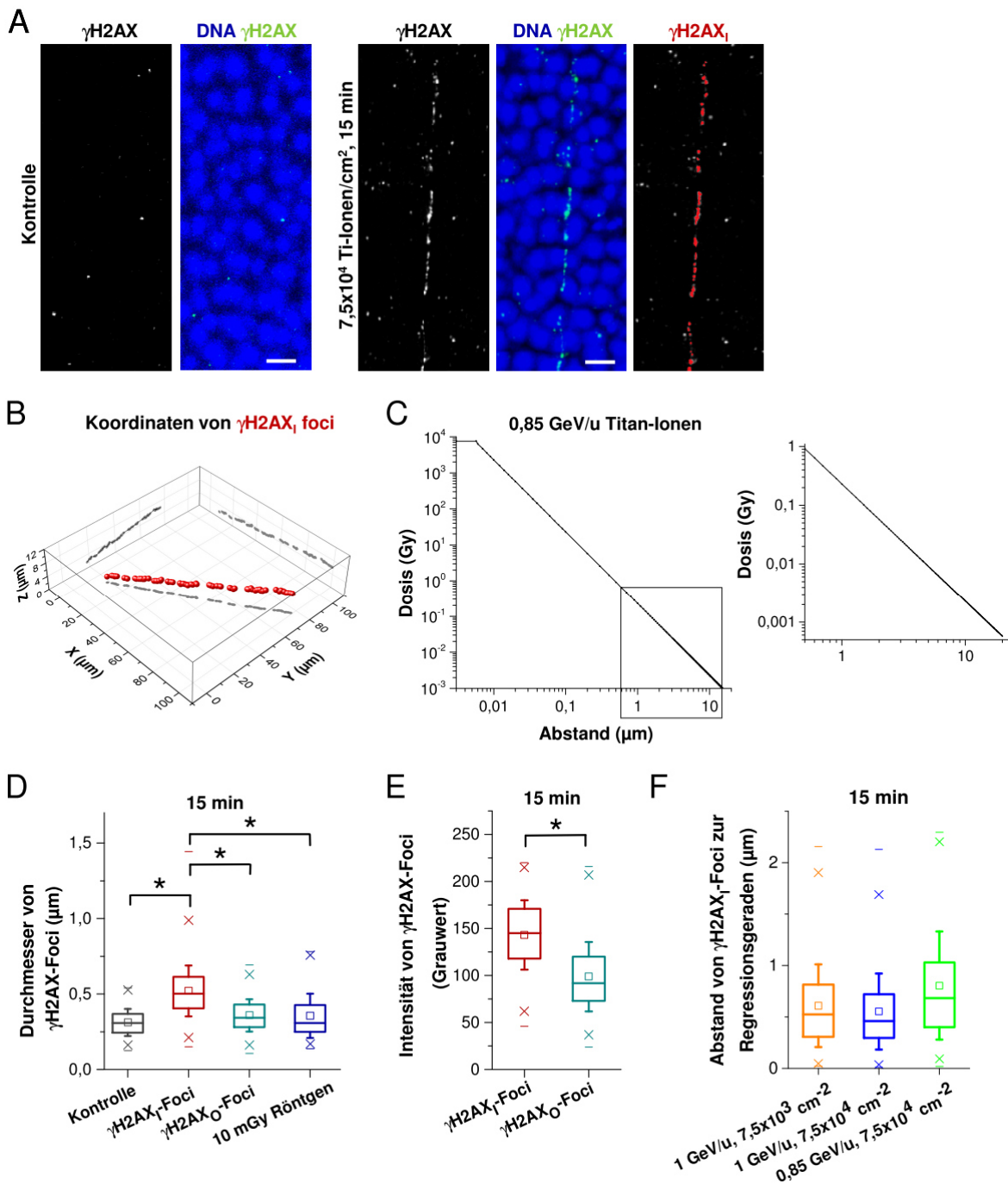


Abb. 12: γ H2AX-Foci im Inneren der Bahnspur sind größer und heller als Foci im äußeren Bereich. Retina-Explantate wurden ex vivo mit $7,5 \times 10^3$ oder $7,5 \times 10^4$ Titan-Ionen/cm² (0,85-1 GeV/u, 114-129 keV/ μ m) bestrahlt, 15 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen γ H2AX gefärbt. Unbestrahlte Retina-Explantate dienen als Kontrolle. (A) Repräsentative Aufnahmen (Maximumintensitätsprojektion) einer Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX in den Photorezeptorzellen. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 5 μ m. (Rechtes Bild) γ H2AX-Foci entlang der Ionenspur (γ H2AX_i-Foci) im Inneren der Bahnspur wurden manuell ausgewählt und sind zur besseren Sichtbarkeit rot eingefärbt. (B) Exemplarische dreidimensionale Darstellung der γ H2AX_i-Foci-Koordinaten. Die Skalierung entspricht den Bildabmessungen von $100 \times 100 \times 12 \mu\text{m}^3$. (C) Berechnung der Dosisdeposition von Titan-Ionen. Der dargestellte Kurvenverlauf zeigt den physikalischen Dosisabfall von Titan-Ionen (0,85 GeV/u, 129 keV/ μ m) mit $1/r^2$; die entsprechende Formel wurde dem LEM (*local effect model*) entnommen und die Dosis für verschiedene Abstände zur Ionenspur berechnet (162). (D+E) Analyse des Durchmessers und der mittleren Intensität von γ H2AX_i-Foci und γ H2AX_O-Foci im äußeren Bereich der Bahnspur (γ H2AX_O-Foci). Dargestellt ist die Verteilung der Foci-Durchmesser (D) bzw. der mittleren Signalintensität (E) in Boxplots (25-75 % der Daten) von Messungen aus 4 Retinae (1 GeV/u Titan-Ionen, $7,5 \times 10^3$ und $7,5 \times 10^4$ Ionen/cm²) sowie deren Standardabweichung (Whisker). Die "x" unter und über der Box umfassen 98 % der Daten. Zum Vergleich wurden auch die Durchmesser von Foci aus je 3 unbestrahlten bzw. mit 10 mGy Röntgenstrahlen bestrahlten Retinae bestimmt. Pro Ionenbestrahlter Retina wurde der Durchmesser und die mittlere Signalintensität in 200 Foci (in je 100 γ H2AX_i- und γ H2AX_O-Foci)

bestimmt, pro unbestrahlter oder Röntgen-bestrahlter Retina wurde der Durchmesser von 30-40 γ H2AX-Foci bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließenden Bonferroni überprüft (*: $p < 0,05$). (F) Abstandsanalyse von γ H2AX-Foci. Dargestellt ist die Verteilung der Abstände von γ H2AX-Foci zur berechneten Regressionsgeraden in Boxplots (25-75 % der Daten) sowie deren Standardabweichung (Whisker). Es wurden die Abstände von 300-500 Foci von 10-15 Ionenspuren aus einer Retina (0,85 GeV/u) oder zwei Retinae (1 GeV/u) berechnet. Die "x" unter und über der Box umfassen 98 % der Daten. (Frei modifiziert nach Mirsch *et al.* (143))

Radiale Abstandsanalyse von γ H2AX-Foci nach Bestrahlung mit Titan-Ionen

Für die Biodosimetrie wurden alle Foci und Zellen anhand ihrer Abstände zur Ionenspur (Regressionsgerade) in die Kategorien 0-2 μm oder 2-10 μm zugeordnet. Die Zuordnung von Zellen (mittlerer Durchmesser von ca. 4,7 μm ; vgl. Abb. 9) in die jeweilige Kategorie anhand ihres Mittelpunktes implizierte, dass Zellen, deren Mittelpunkt nicht zwischen 0-2 μm lag, nicht in dieser Kategorie berücksichtigt wurden, obwohl möglicherweise ein Teil ihres Zellkerns in diese Kategorie fiel. Umgekehrt trugen aber auch Zellen, deren Mittelpunkt zwischen 0-2 μm lag, mit einem Teil ihres Zellkernvolumens zur Kategorie 2-10 μm bei. Da die erste Kategorie (0-2 μm) jedoch im Bezug auf den Zellkerndurchmesser sehr schmal ist, könnte dies zu einer leichten Überschätzung der Anzahl der Foci pro Zelle in der Kategorie 0-2 μm führen.

Um die Dosisdeposition von einzelnen Bahnspuren zu untersuchen bzw. die Einflüsse anderer Bahnspuren durch die Hintergrunddosis auf die analysierte Bahnspur zu minimieren, wurde nach der Quantifizierung der Foci innerhalb der Kategorien jeweils die mittlere Anzahl der Foci pro Zelle aus Bildern ohne sichtbare Ionenspur (0,2-0,3 Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Fluenz, vgl. Abb. 11B) abgezogen. Dies ermöglichte auch den Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit der physikalisch berechneten Dosisdeposition durch einzelne Titan-Ionen (0,85 GeV/u, 129 keV/ μm). Dazu wurde die Formel, die die Dosisdeposition in Abhängigkeit des Abstandes zum Bahnspurzentrum beschreibt, über das entsprechende Volumen im Intervall 2-10 μm integriert und so eine Dosis von ca. 8 mGy berechnet (für Formeln und Berechnungen siehe Material und Methoden). Die entsprechende Quantifizierung der Foci zeigte, dass in einem Abstand von weniger als 2 μm ca. 5,4 (SD 0,61) γ H2AX-Foci pro Zelle vorlagen, während im Abstand von 2-10 μm 0,12 (SD 0,03) γ H2AX-Foci pro Zelle erfasst wurden (Abb. 13A). Über die Kalibriergerade (vgl. Abb. 10C) wurden die detektierten 0,12 γ H2AX-Foci pro Zelle in eine Dosis von ca. 10 mGy umgerechnet, was gut mit der physikalisch zu erwartenden Dosis von ca. 8 mGy korrelierte. Diese Analyse zeigte, dass das angewendete Verfahren zur Biodosimetrie prinzipiell funktionierte und die untersuchten Bereiche feiner unterteilt werden konnten. Um in einem späteren Schritt auch Effekte von überlappenden Bahnstrukturen in der Nähe von Ionenspuren zu analysieren, wurde die Biodosimetrie bereits für die folgende Analyse auf Foci und Zellen mit einem Abstand von bis zu 20 μm zur Ionenspur ausgedehnt.

Für die feinere Analyse der Dosisdeposition einzelner Ionen wurden die γ H2AX-Foci und Zellen anhand ihres Abstandes zur Ionenspur in insgesamt 10 aufeinanderfolgenden, 2 μ m breiten Kategorien eingeordnet. Anschließend wurde jeweils die mittlere Anzahl der Foci pro Zelle aus Bildern ohne sichtbare Ionenspur (0,2-0,3 Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Fluenz, vgl. Abb. 11B) abgezogen. Als Referenz wurde auch hier die physikalisch zu erwartende Dosis in den Volumina dieser Kategorien für die Bestrahlung mit Titan-Ionen (0,85 GeV/u, 129 keV/ μ m) berechnet. Die Quantifizierung der Foci in den Kategorien zeigte für alle drei Bestrahlungsbedingungen einen Abfall der mittleren Anzahl der Foci pro Zelle in den ersten 4 Kategorien (bis zu einem Abstand von 8 μ m; Abb. 13B). Der sehr ähnliche Kurvenverlauf der drei analysierten Bestrahlungsbedingungen spricht für die Reproduzierbarkeit der Analysemethode bzw. der Daten. In der Kategorie mit einem Abstand zwischen 0-2 μ m war die mittlere Anzahl der Foci pro Zelle bzw. die daraus resultierende Dosis niedriger als die physikalisch berechnete Dosis, was wahrscheinlich auf das Vorliegen von komplexen DSBs zurückzuführen ist. In den folgenden Kategorien mit einem Abstand zwischen 2-8 μ m korrelierte die Anzahl der Foci pro Zelle bzw. die daraus resultierende Dosis mit der physikalisch berechneten Dosis und fiel mit zunehmendem Abstand ab. Über einen Abstand von 8 μ m hinaus begrenzten große Schwankungen die Aussagekraft der Analyse, wobei diese Schwankungen auf die sehr geringe Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zelle in diesem Bereich sowie auf lokale Variationen in der Hintergrunddosis zurückzuführen sind. Daher war eine verlässliche Aussage über eine Korrelation mit der physikalisch berechneten Dosis auf drei Kategorien begrenzt. Dennoch zeigt diese Analyse, dass über die Positionsbestimmung der γ H2AX-Foci und Zellen die abstandsabhängige Quantifizierung der Schäden gelang, womit ein Abfall der mittleren Anzahl der Foci pro Zelle bzw. der deponierten Dosis mit zunehmendem Abstand zur Ionenspur nachgewiesen wurde. Die sehr gute Übereinstimmung mit der physikalisch berechneten Dosis deutete auf das Vorliegen eines quadratischen Abfalls der Dosis mit zunehmendem Abstand zur Ionenspur hin.

Um den angedeuteten, quadratischen Abfall der Dosisdeposition in der Retina direkt nachzuweisen, wurde in Zusammenarbeit mit T. Friedrich, M. Scholz und F. Tommasino aus der Arbeitsgruppe "Biologische Modellierung" (GSI) eine logarithmische Kategorisierung aller Foci und Zellen (aus Abb. 13B) vorgenommen. Dazu wurden 36 logarithmische Kategorien innerhalb von 20 μ m definiert, die nahe an der Ionenspur sehr schmal (nur wenige nm) sind und mit zunehmendem Abstand zur Ionenspur breiter werden. Durch diese Kategorisierung wird der Dosisabfall innerhalb der ersten μ m durch die kleineren Kategorien besser aufgelöst und gleichzeitig die statistische Aussagekraft in den Kategorien mit großem Abstand zur Ionenspur, welche nur sehr geringe Focizahlen aufweisen, durch breitere Kategorien gesteigert. Um starken Schwankungen vorzubeugen, die aus der sehr geringen Anzahl an Zellkoordinaten nahe an der Ionenspur resultieren würden, wurde von F. Tommasino und T. Friedrich ein Algorithmus entwickelt, der das analysierte Volumen der Zellschicht im Gewebe aus kleinen

Rechtecken (sogenannten Voxeln) der Größe $0.8 \times 0.8 \times 0.645 \mu\text{m}^3$ rekonstruiert (143, 163). Dabei setzte sich das Volumen einer Zelle aus ca. 233 Voxeln zusammen.

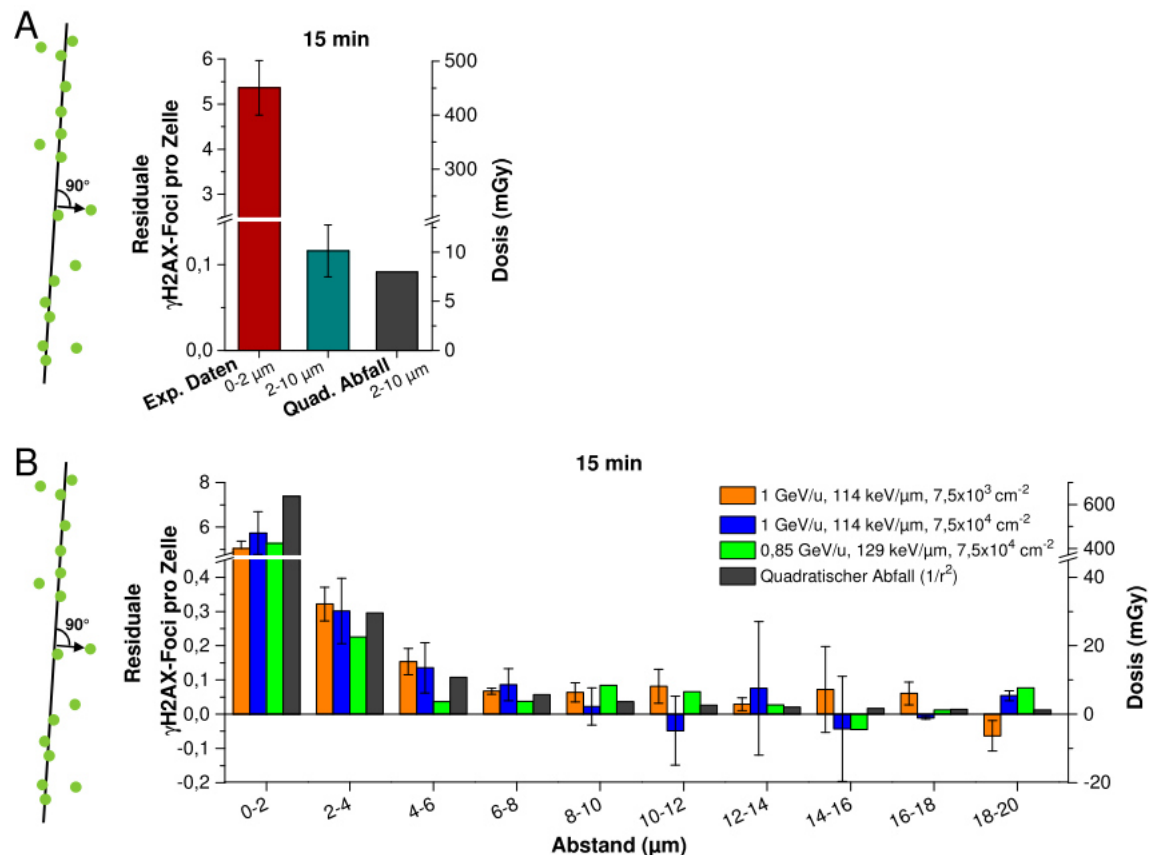


Abb. 13: Abstandsabhängige Quantifizierung der $\gamma\text{H2AX-Foci}$ nach der Bestrahlung mit Titan-Ionen korreliert mit der berechneten, physikalischen Dosisdeposition. Retina-Explantate wurden ex vivo mit $7,5 \times 10^3$ oder $7,5 \times 10^4$ Titan-Ionen/ cm^2 ($0,85\text{-}1\text{GeV/u}$, $114\text{-}129 \text{ keV}/\mu\text{m}$) bestrahlt, 15 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen γH2AX gefärbt. In hochaufgelösten Stapelaufnahmen wurden die XYZ-Koordinaten der $\gamma\text{H2AX-Foci}$ und Zellen manuell bestimmt und deren Abstand zur Regressionsgeraden (Approximation der Ionenspur) berechnet. Anschließend wurden Foci und Zellen entsprechend ihres Abstandes zur Regressionsgeraden in Kategorien eingeteilt. Um die Dosisdeposition in einzelnen Bahnschleifen zu untersuchen und Einflüsse anderer Bahnschleifen zu minimieren, wurde jeweils der Mittelwert der Foci pro Zelle aus Bildern ohne sichtbare Ionenspur abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert (abzüglich $0,2\text{-}0,3$ Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Fluenz) von $10\text{-}15$ Ionenspuren aus fünf Retinae (B) bzw. je zwei Retinae (C) und deren Standardabweichung. Pro Bestrahlungsbedingung wurden $\gamma\text{H2AX-Foci}$ in ca. 100 [0-2 μm], 1000 [2-10 μm] oder 2500 [0-20 μm] Zellen erfasst. Die dargestellten Dosen des physikalisch berechneten, quadratischen Abfalls der Dosis von Titan-Ionen ($0,85 \text{ GeV/u}$, $129 \text{ keV}/\mu\text{m}$) mit $1/r^2$ beruhen auf der Integration der in diesem Abstand vorliegenden Dosen über das betrachtete Volumen der Kategorie (162). Die berechnete Dosis wurde über die experimentell erstellte Kalibriergerade (vgl. Abb. 10C) in Foci pro Zelle umgerechnet. (Frei modifiziert nach Mirsch *et al.* (143))

Zur Quantifizierung wurden die $\gamma\text{H2AX-Foci}$ und Voxel anhand ihres Abstandes den logarithmischen Kategorien zugeordnet und jeweils die mittlere Anzahl der $\gamma\text{H2AX-Foci}$ pro Voxel bestimmt. Für die grafische Auftragung wurde neben der X-Achse auch die Y-Achse logarithmisch dargestellt um den physikalisch zu erwartenden Abfall mit $1/r^2$ als Gerade darzustellen. Für die drei durchgeführten Experimente wurde bis zu einem Abstand von $0,4 \mu\text{m}$ zur Ionenspur ein Plateau und damit keine Veränderung der Anzahl der Foci pro Voxel beobachtet (Abb. 14A). Zwischen $0,4 \mu\text{m}$ und $4 \mu\text{m}$ fiel die Anzahl der Foci pro Voxel mit zunehmendem Abstand ab, dabei war der Kurvenverlauf etwas steiler als der erwartete, quadratische Abfall. Bei Abständen über $4 \mu\text{m}$ wurde ein zweites Plateau beobachtet, welches

mit ca. 0,001 Foci pro Voxel über den 0,0005 Foci pro Voxel ($SD\ 2 \times 10^{-4}$) von unbestrahlten Retinae lag (Abb. 14B). Während der Abfall der Foci pro Voxel zwischen 0,4 und 4 μm sehr gut mit den Theoriewerten korrelierte, zeigten die Plateaus unter 0,4 μm sowie über 4 μm experimentelle Begrenzungen der Analysemethode auf. Unter 0,4 μm begrenzte die Fokusgröße von 0,5 μm (vgl. Abb. 12D) sowie leichte *movement*-Prozesse der DSBs deren genaue Positionsbestimmung (164, 165). Dies könnte zu einer Abweichung des quadratischen Abfalls unter 0,4 μm geführt und ebenfalls zu einem etwas steileren Abfall zwischen 0,4-4 μm beigetragen haben. Über einen Abstand von 4 μm hinaus begrenzte die Hintergrunddosis, die auf die additive Dosisdeposition von überlappenden Bahnstrukturen zurückzuführen ist, die Analyse des quadratischen Dosisabfalls.

Zur genaueren Analyse der Hintergrunddosis nahe an der Ionenspur wurden die Kategorien zwischen 8,27 und 20 μm zu einem Datensatz zusammengefasst, um die Schwankungen zwischen den Kategorien zu reduzieren. Konsistent mit der ersten Analyse der Hintergrunddosis wurde für alle Bestrahlungsbedingungen eine höhere mittlere Anzahl von γH2AX -Foci pro Voxel nachgewiesen als in unbestrahlten Photorezeptoren (Abb. 14B; vgl. Abb. 11B). Darüber hinaus wurde die Fluenzabhängigkeit bzw. eine tendenziell höhere Hintergrunddosis für eines der beiden Experimente mit einer hohen Fluenz (0,85 GeV/u) nachgewiesen. Unterschiede zur ersten Analyse sowie die fehlende statistische Signifikanz resultieren wahrscheinlich aus der hohen lokalen Variabilität der Hintergrunddosis (nahe an der Ionenspur) sowie der Focus-Auszählung in viel weniger Zellen im Vergleich zur ersten Analyse, bei welcher die Foci unabhängig von ihrem Abstand in Bildausschnitten ohne Ionenspur erfasst wurden.

Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass die Retina aufgrund ihrer Morphologie aus strahlenbiologischer Sicht bestens als Modellorgan für die Biodosimetrie geeignet ist. Über die positions- bzw. abstandsabhängige Quantifizierung der γH2AX -Foci wurde eindrucksvoll die radiale Dosisdeposition einzelner Ionen in einer sub- μm -Auflösung nachgewiesen, was den quadratischen Abfall ($1/r^2$) der Dosisdeposition von δ -Elektronen bestätigte. Dieser wurde bisher ausschließlich in physikalischen Messverfahren oder Simulationen bestimmt und wurde in dieser Arbeit erstmals in einem biologischen Modellorgan verifiziert. Darüber hinaus konnte die Dosisaddition von überlappenden Bahnspuren durch die detektierte Hintergrunddosis nachgewiesen werden, was sich in der signifikant erhöhten Anzahl der Foci pro Voxel gegenüber dem Kontrollwert sowie in der Differenz zwischen den Fluenzen selbst zeigte.

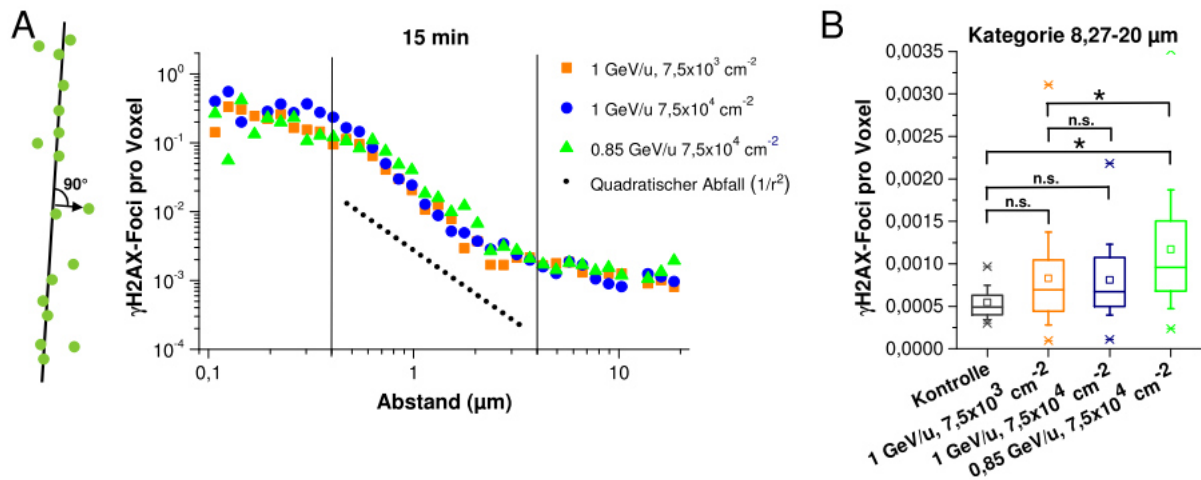


Abb. 14: Anzahl der γ H2AX-Foci pro Voxel fällt mit zunehmendem Radius nahezu quadratisch ab. Retina-Explantate wurden ex vivo mit 7.5×10^3 oder 7.5×10^4 Titan-Ionen/cm² bestrahlt (0,85-1 GeV/u, 114-129 keV/ μ m), 15 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen γ H2AX gefärbt. In hochaufgelösten Stapelaufnahmen wurden die XYZ-Koordinaten der γ H2AX-Foci und Zellen manuell bestimmt und deren Abstand zur Regressionsgeraden (Approximation der Ionenspur) berechnet. Der analysierte Gewebebereich wurde von F. Tommasino und T. Friedrich über die Zellkoordinaten mit Voxeln rekonstruiert, wobei eine Zelle aus 233,4 Voxeln aufgebaut wurde (143, 163). (A) Quantifizierung der γ H2AX-Foci pro Voxel in Abhängigkeit von deren Abstand zur Ionenspur. Foci und Zellen wurden entsprechend ihres Abstandes zur Regressionsgeraden den insgesamt 36 logarithmischen Kategorien zugeordnet. Dargestellt ist der Mittelwert von 10-15 Ionenspuren aus einer Retina (0,85 GeV/u) oder zwei Retinae (1 GeV/u). Pro Bestrahlungsbedingung wurden γ H2AX-Foci in ca. 2500 Zellen bzw. $5,8 \times 10^4$ Voxeln erfasst. Die gestrichelte Linie repräsentiert den physikalisch erwarteten, quadratischen Abfall, die zur besseren Visualisierung der Daten nach unten versetzt dargestellt ist. (B) Quantifizierung der Hintergrunddosis in den Kategorien zwischen 8,27 μ m und 20 μ m (aus A). Dargestellt ist die Verteilung der gemittelten Anzahl der Foci pro Voxel in Boxplots (25-75 % der Daten) sowie deren Standardabweichung (Whisker). γ H2AX-Foci wurden in ca. 1500 Zellen bzw. $3,5 \times 10^4$ Voxeln [8,27-20 μ m] von 10-15 Ionenspuren aus einer Retina (0,85 GeV/u) oder zwei Retinae (1 GeV/u) erfasst. Die "x" unter und über der Box umfassen 98 % der Daten. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließenden Bonferroni überprüft (*: $p < 0,05$, n.s.: nicht signifikant). (Frei modifiziert nach Mirsch *et al.* (143))

4.2. Diskussion

Schwere Ionen sind ein Teil der natürlich auftretenden Strahlung, z.B. von kosmischer Strahlung, werden aber auch aufgrund ihrer hohen Strahlenwirksamkeit im Vergleich zu Röntgenstrahlen zunehmend in der Tumorthherapie eingesetzt. Zum Verständnis ihrer hohen Strahlenwirksamkeit ist es unerlässlich deren Bahnstruktur und das daraus resultierende dreidimensionale Schadensmuster im Gewebe zu erforschen. In diesem Teilprojekt der vorliegenden Arbeit konnten erstmals umfangreiche biologische Ergebnisse für den Vergleich mit den bisher ausschließlich physikalischen Dosimetrieverfahren gewonnen werden (153-156). Im Gegensatz zu bisherigen zweidimensionalen Analysen der Ionenspur in kultivierten Zellen wurde in dieser Arbeit in einer dreidimensionalen Analyse die gesamte Bahnstruktur der Ionen untersucht (114, 120, 160, 161, 166). Dabei erwies sich die Retina der Maus als einzigartiges Modellorgan, welches durch die hohe Zellkerndichte nicht nur die Sensitivität des γ H2AX-Foci-Assays steigerte, sondern auch den Nachweis der Bahnstrukturen einzelner Ionen über zahlreiche Zellen (zum Teil über $> 30 \mu\text{m}$) hinweg ermöglichte (Abb. 12). Erste Analysen der Bahnstruktur mit dem γ H2AX-Foci-Assay zeigten, dass jede Exposition mit Schwerionen als eine dreidimensionale Schadensstruktur, bestehend aus einer hohen Dosisdeposition entlang der Ionenspur (ca. 0,5 Gy pro Zelle) sowie einer sehr niedrigen Dosisdeposition von wenigen Milli-Gray im äußeren Bereich um die Ionenspur, betrachtet werden muss (Abb. 13). Durch die hohe Genauigkeit mit der die experimentellen Daten mittels des γ H2AX-Foci-Assays erhoben wurden, konnte in der Biodosimetrie ein Abfall der Dosis im sub- μm -Bereich mit zunehmendem Abstand zur Ionenspur bestätigt werden (Abb. 14). Darüber hinaus wurden erste biologische Daten erhoben, die die Existenz einer Hintergrunddosis aufzeigten, welche aus der Dosisaddition zahlreicher, voneinander unabhängiger Bahnstrukturen resultiert (Abb. 11, 14).

Jedoch wurden auch Limitierungen des γ H2AX-Foci-Assays für dessen Anwendung in der Biodosimetrie identifiziert, die aus Unsicherheiten bei der Bestimmung der genauen Position des DSBs im Focussignal, der Größe des Focus-Signales selbst, sowie aus *Movement*-Prozessen der DSBs resultierten. Die Bestimmung der genauen Position des DSBs im Focussignal ist für komplexe oder geclusterte DSBs entlang der Ionenspur aufgrund der Focusgröße (0,5 μm) mit größeren Unsicherheiten behaftet, als für "einfache" DSBs mit einer Focusgröße von 0,3 μm (Abb. 12). Komplexe bzw. geclustert vorliegende DSBs sind typisch für γ H2AX-Foci entlang der Ionenspur und wurden in der durchgeführten Analyse sowie bereits in anderen Studien als große und intensiv leuchtende γ H2AX-Foci (Abb. 12) beobachtet (52, 114, 119, 120, 160, 161). Nakajima et al. gelang es durch hochauflösende Mikroskopie und anschließender Dekonvolution der aufgenommenen Bilder, mehrere sub-Foci-Strukturen in einem einzelnen Focussignal in kultivierten Zellen sichtbar zu machen (120). Allerdings war dies erst 8 h nach Bestrahlung mit Schwerionen möglich, wo die Focus-Signale im Vergleich

zum hier untersuchten Zeitpunkt (direkt nach der Bestrahlung) typischerweise größer sind. Durch das beständige Fortschreiten der Mikroskopietechnik wird die Auflösung von sub-Foci-Strukturen sicher auch Gegenstand zukünftiger Studien sein (167, 168). Das sogenannte *Movement* ist ein schneller Prozess, der bereits innerhalb von 20-30 min nach Bestrahlung abgeschlossen ist und den "Transport" von Brüchen, die im Heterochromatin entstanden sind, an dessen Peripherie beschreibt (164, 165). Das *Movement* von DSBs konnte z.T. bei den γ H2AX_I-Foci entlang der Ionenspur beobachtet werden, wenn ein *Chromocenter* (heterochromatische DNA) innerhalb der beobachteten Ionenspur lag und daher vermutlich direkt vom Ion getroffen wurde. An dieser Stelle wurde eine seitliche Verschiebung bzw. eine halbkreisförmige Abweichung von der sonst relativ linearen Anordnung der γ H2AX_I-Foci beobachtet. Dass dieser Prozess keinen großen Einfluss auf die vorgenommene Analyse hat, zeigten die nur geringfügigen, räumlichen Abweichungen der γ H2AX_I-Foci zur Regressionsgeraden (Abb. 12F).

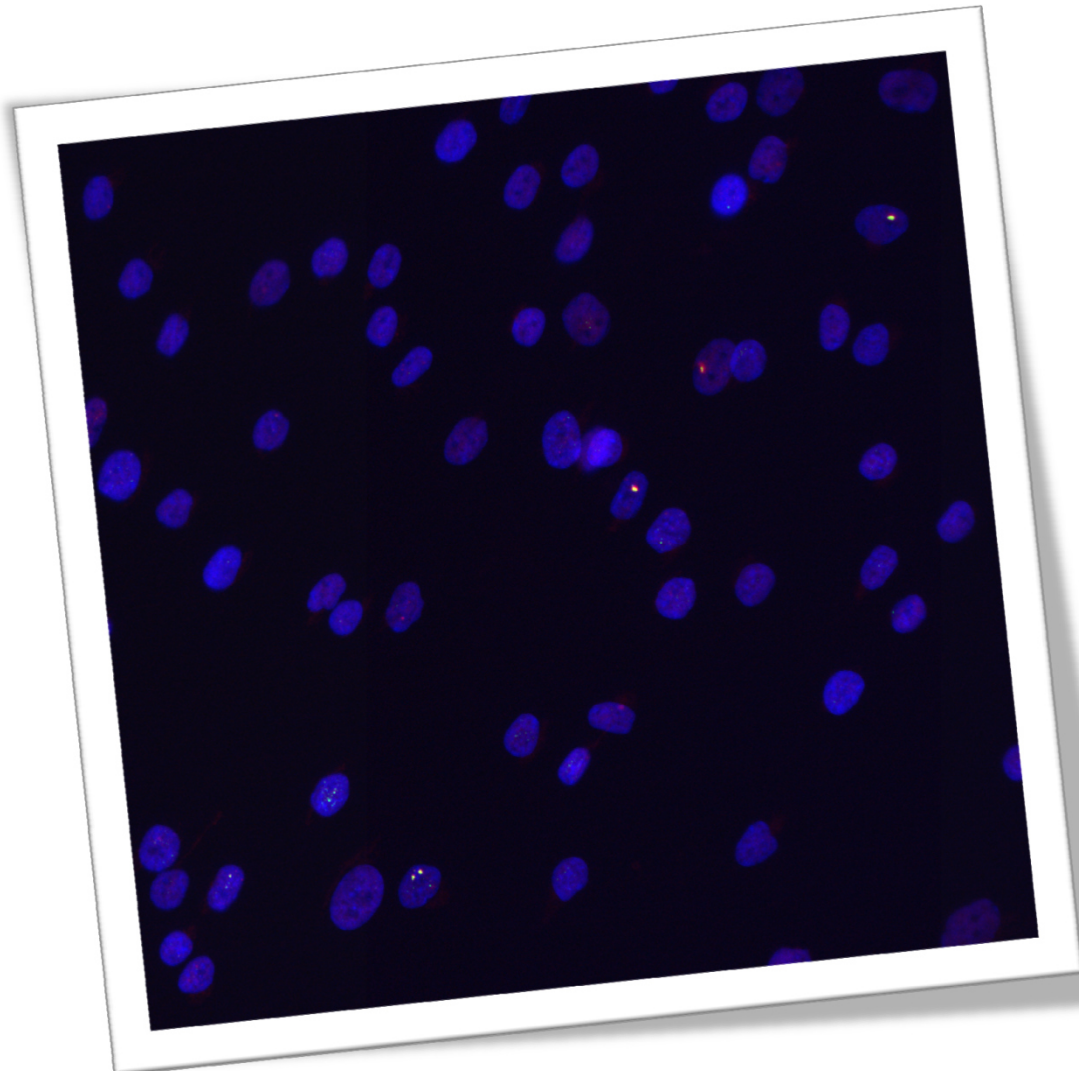
In der gemeinsamen Publikation mit der Arbeitsgruppe "Biologische Modellierung" von M. Scholz wurden die hier vorgestellten experimentellen Daten (Abb. 14) mit einer von T. Friedrich vorgenommenen, unabhängigen Modellierung der Bestrahlungsbedingungen mit dem LEM verglichen (143, 162, 169, 170). Das LEM wurde von M. Scholz und G. Kraft entwickelt, um die biologischen Effekte einer Bestrahlung mit Schwerionen anhand von biologischen Studien mit konventioneller Röntgenstrahlung mittels Überlebenskurven vorherzusagen (171). Dabei wird zugrunde gelegt, dass unabhängig von der Strahlenqualität eine äquivalente, lokale Dosis zum gleichen biologischen Effekt führt. Aus diesem Grund wurde für die Modellierung lediglich die experimentell bestimmte Induktionsrate von DSBs pro Zelle und Gray in der Retina (Abb. 10) sowie die experimentellen Limitierungen in der Positionsbestimmung der DSBs mittels des γ H2AX-Foci-Assays berücksichtigt. Für die Bestimmung der lokalen Dosis bei einer Bestrahlung mit Schwerionen wird im LEM das amorphe Bahnstrukturmodell zugrunde gelegt (162, 169, 170). Es beschreibt die Energiedeposition als Funktion des radialen Abstandes zur Trajektorie des Ions. Lediglich im Zentrum der Bahnstruktur wird eine konstante Energiedeposition angenommen, um die Diffusion erzeugter Radikale zu berücksichtigen. Die Modellierung der lokalen Dosisdeposition stimmte sehr gut mit den experimentellen Daten überein und zeigte ebenfalls einen etwas steileren Abfall der Foci pro Voxel als den physikalisch erwarteten, quadratischen Abfall (143). Eine weiterführende Analyse der experimentellen Daten durch T. Friedrich zur longitudinalen Verteilung der γ H2AX-Foci entlang der Ionenspur bestätigte, dass diese einer Poisson-Verteilung entsprechen, eine Annahme, die viele mathematische Modelle für die Dosisberechnungen voraussetzen (143). Die longitudinale Schadensverteilung wurde bereits in der Studie von Costes *et al.* mit einer zweidimensionalen Foci-Analyse von Ionenspuren (ca. 10 μ m lang) in kultivierten Zellen untersucht (166). Darüber hinaus ermöglichte die hier durchgeführte dreidimensionale Biodosimetrie von Ionenspuren über mehrere Zellen

hinweg (z.T. $>30 \mu\text{m}$), sowie die Ausdehnung der longitudinalen Analyse auf alle Foci, die in einem Radius von $2 \mu\text{m}$ zur Ionenspur vorlagen, eine detailliertere und aussagekräftigere Analyse zur longitudinalen Schadensverteilung.

Die im Rahmen dieses Teilprojektes vorgestellten Ergebnisse validieren daher nicht nur die Verwendung des γH2AX -Foci-Assays in der Biodosimetrie, sondern bestätigen die auf physikalischen Messungen beruhenden Annahmen über die räumliche Schadensverteilung von Schwerionen im Gewebe. Gleichzeitig unterstützen sie durch die gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorgenommenen LEM-basierten Modellierung die weiteren Grundannahmen des LEMs, welches von Physikern der GSI entwickelt wurde und zur Vorhersage der Strahlenwirksamkeit sowie für die Bestrahlungsplanung der Tumorthherapie an den Ionenstrahl-Therapiezentren in Heidelberg, Marburg, Pavia und Shanghai eingesetzt wird (162, 169, 170, 172). Das genaue Verständnis der biologischen Wirkung von Ionenstrahlen ist nicht nur von großer Bedeutung für Anwendungen in der Strahlentherapie, sondern auch für die Risikoabschätzung im Strahlenschutz, etwa für Astronauten bei Langzeitmissionen im Weltall. Im Kontext der anhaltenden Diskussion über die Effekte von niedrigen Strahlendosen zeigt diese Arbeit, dass eine Dosisdeposition fernab von Ionenspuren zu nicht zu vernachlässigenden Effekten führt (13, 37, 43).

5. *LowDose*-Effekt:

Kritische Rolle des intrazellulären oxidativen Stresslevels auf die DSB-Reparatur nach niedrigen Strahlendosen



Das Risiko einer Exposition mit niedrigen Strahlendosen wird u.a. in der Medizin intensiv diskutiert. Dabei geht es zum Beispiel um die Fragen, ob wiederholte CT-Untersuchungen oder CT-Untersuchungen speziell im Kindesalter das Risiko einer Krebsentstehung erhöhen (31-36). Die anhaltenden, kontroversen Diskussionen spiegeln die allgemeine Unsicherheit wider und zeigen die gesellschaftliche Relevanz von Studien im Niedrigdosisbereich auf (13, 37, 38, 43). Die derzeitige Risikoabschätzung und Festlegung der Grenzwerte für umweltbedingte, berufliche sowie medizinische Strahlenexpositionen basiert auf dem *linear-no-threshold* (LNT)-Modell (13, 173-175). Dieses setzt voraus, dass keine noch so geringe Strahlenexposition ungefährlich ist (*no threshold*) und dass das Risiko zur Krebsentstehung proportional zur Dosis der Strahlenexposition ist. Diese lineare Dosis-Wirkungsbeziehung wird dabei von Studienergebnissen mit relativ hoher Strahlenexposition (beispielsweise der Atombombenüberlebenden von Hiroshima und Nagasaki, Japan) auf niedrige Strahlendosen extrapoliert, da epidemiologische Studien im Niedrigdosisbereich (unter 100 mSv) aufgrund der statistisch benötigten Kohortengröße, den Einflüssen durch unterschiedliche Lebensweisen der untersuchten Kohorte und der natürlichen Variabilität der Schadensantwort des Organismus schwer durchzuführen sind (13, 176). Hier können molekulare Studien in kultivierten Zellen sowie in Modellorganismen helfen, um die Strahlenantwort nach Exposition mit verschiedenen Dosen zu charakterisieren und diese zu vergleichen.

Für die Induktion von DSBs, den gefährlichsten DNA-Schäden für die genetische Integrität der Zelle, wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dessen Auftreten und der applizierten Dosis festgestellt (126, 137, 138). Die anschließende Reparatur der DSBs war jedoch *in vitro* und *in vivo* stark beeinträchtigt, wenn nur wenige Milli-Gray Röntgenstrahlen appliziert wurden (126, 137). Erste Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus wurden in der Studie von Grudzenski *et al.* beschrieben, in welcher die DSB-Reparatur nach Bestrahlung mit 10 mGy durch eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid stimuliert werden konnte, während in unbehandelten Zellen viele DSBs unrepariert verblieben (137). Im Rahmen dieses Teilprojektes sollte diese Beobachtung zum sogenannten *LowDose*-Effekt zunächst in kultivierten Zellen reproduziert werden. Die Wiederholung von Schlüsselerperimenten dienen gleichzeitig dazu, in Kooperation mit N. Lengert (AG Drossel, TU Darmstadt), ein Computerprogramm zur zeiteffizienteren und objektiven Quantifizierung von Foci zu entwickeln. Anschließend sollten die Ergebnisse über einen konträren Ansatz mit dem Antioxidans und Radikalfänger N-Acetylcystein in kultivierten Zellen validiert sowie deren physiologische Relevanz im Mausmodell bestätigt werden.

5.1. Ergebnisse

5.1.1. Humane Fibroblasten zur Untersuchung von niedrigen Strahlendosen

Für die Untersuchung von niedrigen Strahlendosen in kultivierten Zellen sollte zunächst die humane Fibroblasten-Zelllinie HOMS F1 etabliert werden. Eine verlässliche Quantifizierung von geringen Zahlen strahleninduzierter DSBs setzt, neben der Verwendung eines sensitiven Assays zum Nachweis der DSBs, eine niedrige Anzahl von spontan auftretenden DSBs voraus. Um dies zu gewährleisten, sollten nur Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzykluses untersucht werden, die erfahrungsgemäß ein sehr niedriges Hintergrundniveau von DSBs aufweisen (126, 137). Zellen in der S-Phase haben dagegen ein hohes Hintergrundniveau, was auf den Kollaps von Replikationsgabeln sowie die DSB-Induktion durch andere DNA-Schäden in der zu replizierenden DNA zurückzuführen ist (58-60). DSBs, die bei der Replikation der DNA auftreten, werden teilweise auch erst in den nachfolgenden Zellzyklusphasen repariert. Dadurch können in Zellen der S- und G₂-Phase einzelne strahleninduzierte DSBs nicht mehr detektiert werden, weshalb diese bei der Quantifizierung der DSBs ausgeschlossen werden sollten.

Um den Anteil der G₀/G₁-Phase-Zellen in der Zellpopulation zu erhöhen und gleichzeitig den Anteil der proliferierenden Zellen zu reduzieren, wurden die Zellen für zwei Wochen bis zur Konfluenz kultiviert. Konfluente Zellkulturen haben die gesamte, ihnen zur Verfügung stehende Wachstumsfläche ausgenutzt und das Wachstum aufgrund des Kontaktes zu anderen Zellen eingestellt (Kontaktinhibition). Diese Zellen befinden sich in der G₀/G₁-Phase, einer Art Ruhezustand im Zellzyklus. Experimentell kann die Anreicherung von Zellen in der G₀/G₁-Phase durch eine zweiwöchige Kultivierung über die Analyse der Zellzyklusverteilung nachgewiesen werden. Dazu wurden konfluente HOMS F1-Zellen sowie zum direkten Vergleich exponentiell wachsende HOMS F1-Zellen für 3 h mit 5 µM Thymidinanalogon EdU inkubiert. EdU wird während der S-Phase in die DNA eingebaut und ermöglicht die Identifikation der S-Phase-Zellen anhand ihres EdU-Signals (Abb. 15A). Um zwischen Zellen in der G₁- oder G₂-Phase zu unterscheiden, wurde der DNA-Gehalt der Zellen anhand der DAPI-Signalintensität erfasst. Durch die grafische Auftragung der DAPI-Signalintensität gegen die EdU-Signalintensität der Zellen können die Zellzyklusphasen der einzelnen Zellen bestimmt und so die Zellen entsprechend ihrer Zellzyklusphase separiert werden. Für exponentiell wachsende Zellkulturen zeigt diese Auftragung die typische hufeisenförmige Verteilung der Zellpopulation (Abb.15B; (104)).

Die Analyse der Zellzyklusverteilung zeigte, dass der Anteil der HOMS F1-Zellen in der S-Phase von 14,4 % (SE 3,3) und Zellen in der G₂-Phase von 12,3 % (SE 1,9) ausgehend von einer exponentiell wachsenden Zellkultur durch die zweiwöchige Kultivierung auf insgesamt 3,9 % (SE 0,01) S- und G₂-Phase-Zellen sank (Abb. 15B,C). Gleichzeitig stieg der Anteil der Zellen in der G₁-Phase von 73,3 % (SE 4,8) auf 96,1 % (SE 0,04) an. Dieser Anteil konnte auch durch eine längere Kultivierung der Zellen nicht weiter gesteigert werden, weshalb größere Zellkerne

bei den folgenden Experimenten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen manuell ausgeschlossen wurden.

Zur Quantifizierung der spontan auftretenden DSBs in konfluenten HOMSf1-Zellen wurde der sensitive Foci-Assay eingesetzt, welcher den spezifischen Nachweis von DSBs auf Einzelzellenebene erlaubt. Das Vorliegen eines DSBs wurde über die Kolo-kalisation der beiden etablierten DSB-Marker γ H2AX und 53BP1 definiert, wobei die Focus-Signale der beiden Marker in G1-Phase-Zellen kolo-kalisieren (71, 121, 122). Die Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX und 53BP1 zeigte, dass konfluente HOMSf1-Zellen nur eine geringe Anzahl an spontan auftretenden DSBs aufwiesen (Abb. 15D). Die Anzahl der kolo-kalisierenden Foci variierte zwischen 0,13 und 0,25 γ H2AX-53BP1-Foci pro Zelle und betrug im Mittel 0,19 Foci pro Zelle (SE 0,02; Abb. 15E). Zusammengefasst zeigten diese Experimente, dass konfluente HOMSf1-Zellen für Studien mit niedrigen Strahlendosen geeignet sind.

Neben der Wahl eines geeigneten Zellsystems besitzt auch die Dosimetrie für die Bestrahlung an der Röntgenröhre einen hohen Stellenwert für die geplanten Studien. Da die Zellen für die mikroskopische Auswertung in Zellkulturplatten mit einem Glasboden oder auf Deckgläsern kultiviert werden, wurde der sogenannte Deckglaseffekt für die geplanten Parameter der Bestrahlung (Energie der Strahlung, Abstand zur Strahlenquelle, Aluminium-Filterung) experimentell bestimmt. Der Deckglaseffekt beschreibt die Erhöhung der applizierten Dosis für Zellen, die auf einer Glasoberfläche wachsen, im Vergleich zu Zellen, die auf einer Plastikoberfläche wachsen. Er beruht auf der starken Interaktion der Röntgenstrahlung über den Photoeffekt mit den Silicium-Atomen im Glas (11, 139). Für die Bestimmung des Deckglaseffektes wurden konfluente HOMSf-Zellen mit 100 mGy oder 300 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt, die entweder in einem Zellkulturgefäß mit Plastik- oder Glasboden wuchsen. Die Zellen wurden 15 min nach der Bestrahlung fixiert, gegen γ H2AX und 53BP1 gefärbt und die kolo-kalisierenden Foci in den Zellen verblindet ausgezählt (Abb. 15F). Die Auszählung der Foci zeigte, dass auf einer Glasoberfläche wachsenden Zellen etwa 3x mehr Foci ausbildeten (7,2 Foci pro Zelle (SE 0,32) nach 100 mGy bzw. 18,4 Foci pro Zelle (SE 0,5) nach 300 mGy) als auf einer Plastikoberfläche wachsende Zellen (2,3 Foci pro Zelle (SE 0,29) nach 100 mGy bzw. 5,7 Foci pro Zelle (SE 0,18) nach 300 mGy; Abb. 15G). Daher wurde für alle folgenden Bestrahlungen von Zellen in Zellkulturplatten mit Glasboden oder auf Deckgläsern jeweils ein Drittel der Dosis appliziert. Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmte Deckglaseffektor lag höher, als der in Studie von Kegel *et al.* beschriebene Faktor 2 (139). Diese Diskrepanz kann auf die unterschiedliche Energie der Röntgenstrahlen (90 kV vs. 120 kV von Kegel *et al.*) zurückgeführt werden, da die Häufigkeit des Photoeffektes gegenüber dem Comptoneffekt mit abnehmender Energie der Strahlung zunimmt. Ebenso kann die unterschiedliche Filterung der Röntgenstrahlen (2 mm Aluminium vor dem Strahlenaustrittsfenster plus eine 2 mm Aluminium-

platte vs. 9 mm plus 1 mm Aluminium in der Studie von Kegel *et al.*) das Energiespektrum der Photonen verändern und so den Deckglasfaktor beeinflussen (11).

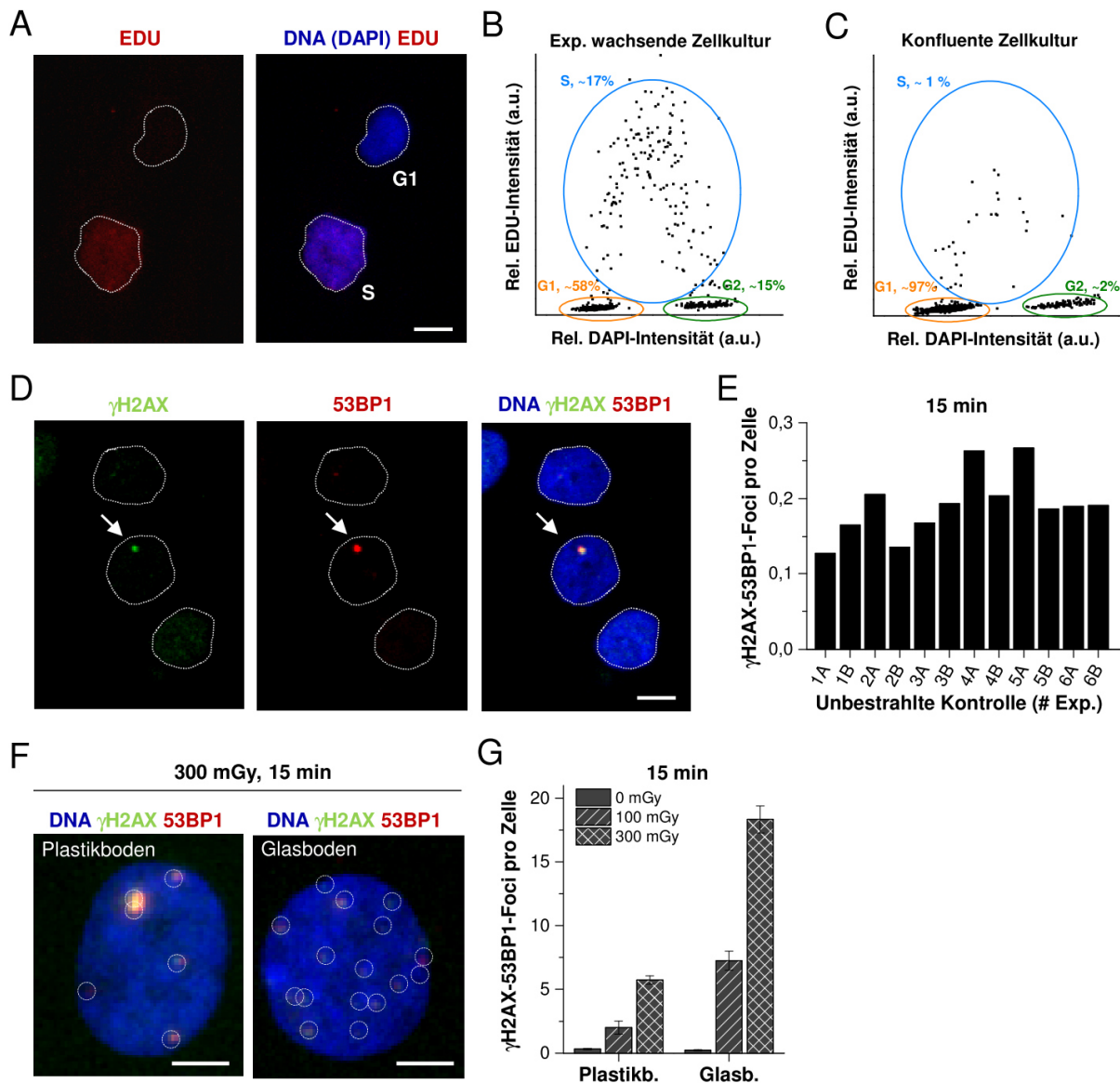


Abb. 15: Konfluente HOMS1-Zellen verfügen über eine geringe Anzahl spontan auftretender DSBs. (A-C) Analyse der Zellzyklusverteilung von HOMS1-Zellen. Exponentiell wachsende sowie konfluente HOMS1-Zellen wurden mit EdU inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, in die DNA eingebautes EdU nachgewiesen und die DNA mit DAPI angefärbt. (A) Repräsentative Aufnahme der Färbung von EdU in HOMS1-Zellen. Die Zellen wurden zur besseren Sichtbarkeit weiß umrandet. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (B+C) Repräsentative Zellzyklusverteilung einer exponentiell wachsenden (B) bzw. einer konfluente Zellkultur (C) von HOMS1-Zellen. Für die Auswertung wurde die DAPI- und die EdU-Signalintensität von 1000 (B) bzw. 4000 (C) Zellen am Mikroskop erfasst. Jeder Punkt in der Zellzyklusverteilung entspricht einer Zelle. (D+E) Analyse der spontan auftretenden DSBs in HOMS1-Zellen. Konfluente HOMS1-Zellen wurden fixiert, gegen γ H2AX sowie 53BP1 gefärbt und die DNA mit DAPI angefärbt. (D) Repräsentative Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX und 53BP1 in konfluente HOMS1-Zellen. Die Zellen wurden zur besseren Sichtbarkeit weiß umrandet und der Focus mit einem weißen Pfeil markiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (E) Quantifizierung der spontan auftretenden γ H2AX-53BP1-Foci. Dargestellt sind die einzelnen Ergebnisse der Auszählungen der Foci in min. 500 Zellen aus 6 Experimenten (mit Duplikat). (F+G) Die Bestrahlung von Zellen auf einer Glasoberfläche erfordert einen Dosiskorrekturfaktor. Konfluente HOMS1-Zellen, die auf einer Glas- oder einer Plastikoberfläche wuchsen, wurden mit 100 oder 300 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt, 15 min später fixiert und gegen γ H2AX sowie 53BP1 gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. (F) Repräsentative Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX und 53BP1 in konfluente HOMS1-Zellen nach Bestrahlung. Die Foci wurden zur besseren Sichtbarkeit weiß eingekreist. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. (G) Quantifizierung der γ H2AX-53BP1-Foci nach Bestrahlung. Dargestellt ist der Mittelwert sowie die Standardfehler von 3-4 Experimenten (mit Duplikat), wobei die Foci in min. 250 Zellen (<1 Focus pro Zelle), 100 Zellen (<10 Foci pro Zelle) oder 40 Zellen (\geq 10 Foci pro Zelle) verblindet ausgezählt wurden.

5.1.2. Doppelstrangbrüche verbleiben nach Bestrahlung von HOMSF1 mit niedrigen Strahlendosen unrepariert

Im nächsten Schritt wurde die Induktion sowie die Reparatur von DSBs nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen untersucht, um zu überprüfen, ob die Zelllinie HOMSF1 für die Untersuchung des *LowDose*-Effektes geeignet ist. Dazu wurden konfluente HOMSF1 mit Dosen zwischen 5 mGy und 900 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt. Die Zellen wurden 15 min und 24 h nach der Bestrahlung fixiert und gegen γ H2AX sowie 53BP1 gefärbt (Abb. 16A, 17A). Die Quantifizierung der kolokalisierenden γ H2AX-53BP1-Foci erfolgte verblindet.

Die Analyse der DSB-Induktion erfolgte 15 min nach Bestrahlung und zeigte, dass die Zellen bereits nach einer Bestrahlung mit 5 mGy eine signifikant höhere, mittlere Anzahl an Foci pro Zelle im Vergleich zu den spontan auftretenden Foci in unbestrahlten Zellen aufwiesen (Abb. 16B). Ebenso verhielt es sich mit den Zellen, die mit höheren Dosen (≥ 12 mGy) bestrahlt wurden. Hier war die mittlere Anzahl an Foci in den bestrahlten Zellen stets signifikant höher als die mittlere Anzahl an Foci in Zellen, die mit der nächst niedrigeren Dosis bestrahlt wurden. Die Induktion der Foci korrelierte linear mit der Dosis über den gesamten Dosisbereich von 5 bis 900 mGy, wobei im Mittel 20 Foci pro Zelle und Gy (SE $0,7 \times 10^{-4}$) induziert wurden. Diese Ergebnisse zur Focus-Ausbildung nach Bestrahlung sowie zur Induktionsrate von 20 Foci pro Zelle und Gy stimmen gut mit den Ergebnissen früherer Studien überein (126, 137).

Die Quantifizierung der Foci nach einer Reparaturzeit von 24 h zeigte, dass unabhängig von der Bestrahlungsdosis in bestrahlten Zellen im Mittel signifikant mehr Foci detektiert wurden als in unbestrahlten Zellen. Nach der Bestrahlung der Zellen mit 5 bis 100 mGy betrug die mittlere Anzahl der residualen Foci zwischen 0,05-0,08 Foci pro Zelle (Abb. 17B). Lediglich nach Bestrahlung mit 900 mGy verblieben 0,5-0,8 Foci pro Zelle unrepariert, wobei hier wahrscheinlich die zur Verfügung gestellte Reparaturzeit nicht ausreichend war, um ausgehend von den 18 strahleninduzierten Foci pro Zelle einen mit niedrigeren Dosen (≤ 100 mGy) vergleichbaren Wert zu erreichen. Betrachtet man die residualen Foci im Verhältnis zum entsprechenden Induktionswert, persistierten mit abnehmender Dosis zunehmend mehr Foci (Abb. 17C). Die halblogarithmische Auftragung verdeutlicht, dass der Anteil der persistierenden Foci zwischen 5 mGy und 25 mGy zunächst exponentiell abnahm (in der halblogarithmischen Auftragung als linearer Abfall dargestellt) und mit zunehmender Dosis zwischen 25 mGy und 100 mGy immer langsamer abnahm. So persistierten bei einer Bestrahlungsdosis von 5 mGy ~ 55 % (SE 17,01), von 12 mGy ~ 30 % (SE 7,64), von 25 mGy ~ 11 % (SE 1,29) und von 50 mGy ~ 7 % (SE 0,7) der induzierten Foci, während bei 100 bis 900 mGy lediglich ~ 4 % (SE 0,65 bzw. 0,58) der induzierten Foci persistierten bzw. der DSBs unrepariert verblieben. Wie in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, handelt es sich dabei nicht einfach um einen verzögerten Reparaturprozess nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen, sondern diese

Brüche persistierten über einen Zeitraum von mindestens drei Tagen und gefährden daher die genetische Integrität der Zelle (126, 137).

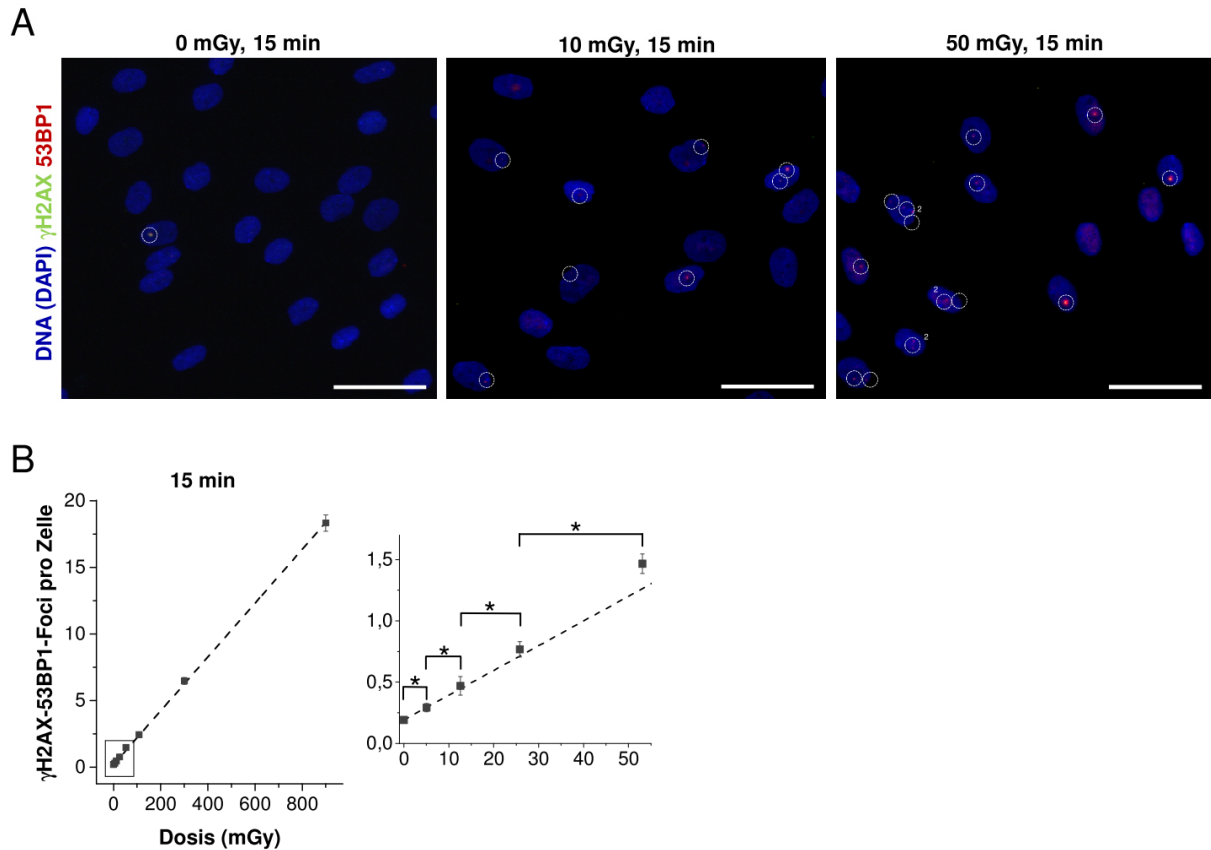


Abb. 16: Lineare Induktion von Foci in HOMS F1-Zellen nach niedrigen Dosen Röntgenstrahlung. Konfluente HOMS F1-Zellen wurden mit 5, 12, 25, 50, 100, 300 oder 900 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt und 15 min später fixiert. Anschließend wurden die Zellen gegen γ H2AX und 53BP1 gefärbt sowie die DNA mit DAPI angefärbt. (A) Repräsentative Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX und 53BP1 in konfluenten HOMS F1-Zellen nach Bestrahlung. Die Foci wurden zur besseren Sichtbarkeit weiß eingekreist. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. (B) Quantifizierung und Regressionsanalyse der Induktion von γ H2AX-53BP1-Foci nach Bestrahlung. Dargestellt ist der Mittelwert von 3-6 Experimenten (mit Duplikat) sowie deren Standardfehler. Pro Zählung wurden die kolocalisierenden Foci in min. 250 Zellen (<1 Focus pro Zelle), 100 Zellen (<10 Foci pro Zelle) oder 40 Zellen (≥ 10 Foci pro Zelle) verblindet ausgezählt. Die gestrichelte Regressionsgerade wird durch $f(x)=0,0205x+0,205$ ($R^2=0,999$) beschrieben. Die statistische Signifikanz wurde mit einem einseitigem Zweistichproben-t-Test überprüft (*; $p<0,05$).

Zusammengefasst validierten der in HOMS F1-Zellen beobachtete *LowDose*-Effekt mit der deutlich verschlechterten Reparatureffizienz bei niedrigen Dosen Röntgenstrahlen (5 bis 25 mGy) sowie die unabhängig von der Bestrahlungsdosis (5 bis 100 mGy) detektierte, mittlere Anzahl von 0,05-0,08 residualer Foci pro Zelle die Ergebnisse früherer Studien mit einer weiteren Zelllinie. Da die untersuchten Dosen tagtäglich in der Diagnostik bei bildgebenden Verfahren mit Röntgenstrahlen wie beispielsweise der Computertomographie appliziert werden, zeigten diese Ergebnisse erneut die Relevanz von Studien im Niedrigdosisbereich auf (siehe auch Kapitel 2.1.3, (13, 30)). Bei der Interpretation der vorgestellten Ergebnisse stellte sich die allerdings die Frage, warum eine Zelle mit einem DSB diesen reparieren kann (wenn mit > 50 mGy bestrahlt wurde und alle Zellen einen oder mehrere strahleninduzierte DSBs aufweisen) und eine andere Zelle dagegen nicht (wenn mit ≤ 12 mGy bestrahlt wurde und nur

wenige Zellen einen strahleninduzierten DSB aufweisen). Diese Frage soll in den folgenden Kapiteln näher untersucht werden.

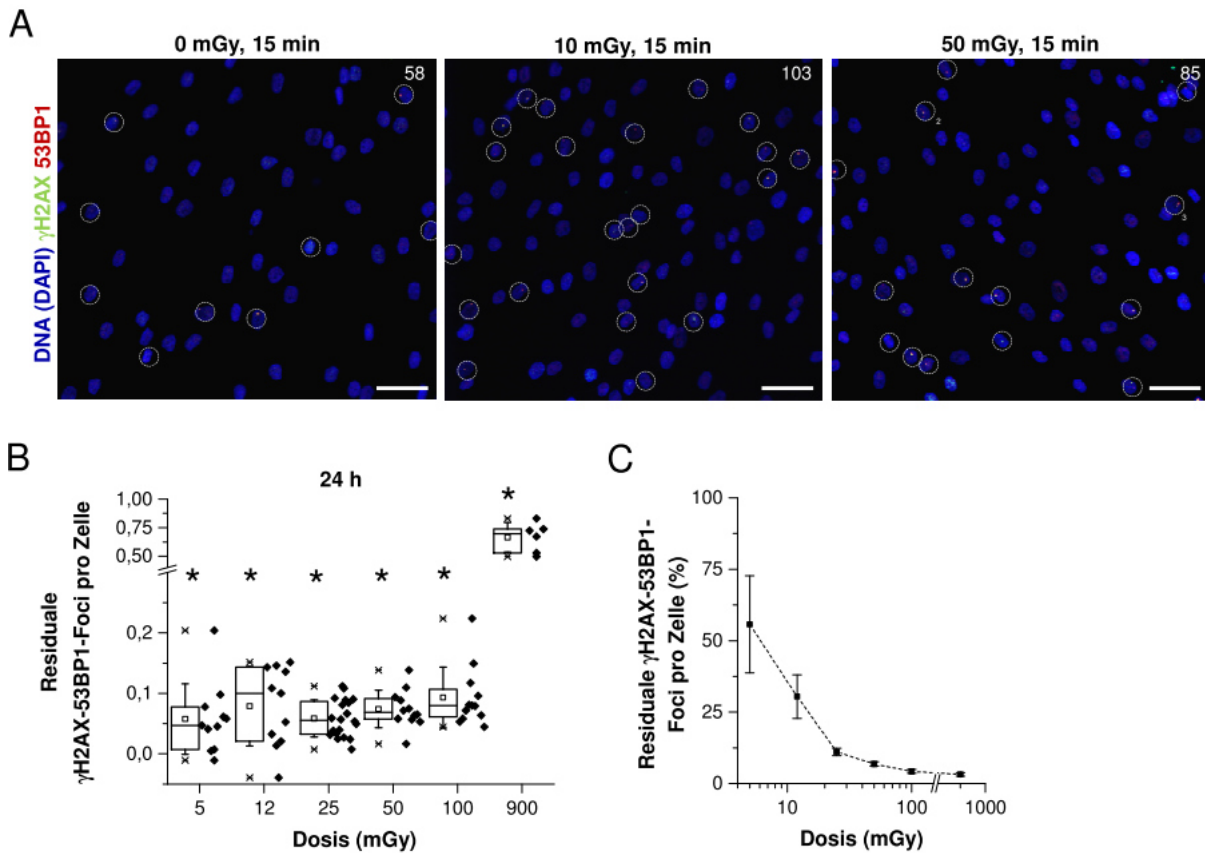


Abb. 17: HOMS1-Zellen zeigen bei niedrigen Strahlendosen eine verminderte Reparatureffizienz. Konfluente HOMS1 wurden mit 5, 12, 25, 50, 100 oder 900 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt und 24 h später fixiert. Anschließend wurden die Zellen gegen γ H2AX und 53BP1 gefärbt sowie die DNA mit DAPI angefärbt. (A) Repräsentative Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX und 53BP1 in konfluenten HOMS1-Zellen nach Bestrahlung mit 10 oder 50 mGy Röntgenstrahlen. Zellen mit einem γ H2AX-53BP1-Focus wurden zur besseren Sichtbarkeit weiß eingekreist. Die Anzahl dieser Zellen im Bildausschnitt ist im jeweiligen Bild oben rechts angegeben und der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. (B) Quantifizierung der Reparatur von γ H2AX-53BP1-Foci nach Bestrahlung. Dargestellt ist die Verteilung der mittleren Anzahl der Foci pro Zelle (abzüglich der jeweiligen Kontrolle im Experiment; 0,1-0,3 Foci pro Zelle) in Boxplots (25-75 % der Daten) von 3-9 Experimenten (mit Duplikat) sowie deren Standardabweichung (Whisker). Pro Zählung wurden kolokalisierende Foci in min. 500 Zellen verblindet ausgezählt. Die "x" unter und über der Box umfassen 98 % der Daten. Die statistische Signifikanz wurde mit einem einseitigen Einstichproben-t-Test (H_0 -Hypothese: Mittelwerte ≤ 0) überprüft (*; $p < 0,05$). (C) Normierung der residualen γ H2AX-53BP1-Foci (aus B) auf die Induktion von 20 DSBs (Foci) pro Zelle und Gy (aus Abb. 16B). Dargestellt ist der Mittelwert von 3-9 Experimenten sowie deren Standardfehler.

5.1.3. Kritische Rolle des oxidativen Stresses bei der DSB-Reparatur

Zur Beantwortung der Frage wie eine Zelle entscheidet, ob ein vorliegender DSB nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen repariert wird oder unrepariert verbleibt, wurden verschiedene Faktoren in Betracht gezogen. Ein naheliegender Einfluss durch eine veränderte Struktur oder Komplexität des DSBs selbst konnte ausgeschlossen werden, da die Bestrahlungsparameter (Energie der Photonen, Filterung der Strahlung, Abstand der Zellen zur Strahlenquelle) für alle Bestrahlungen identisch war. Bei der Betrachtung des gesamten Schadensspektrums, welches durch eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlen entsteht, fiel jedoch auf, dass Einzelstrangbrüche

sowie Basenschäden ca. zwanzigmal häufiger auftreten als ein DSB. Dies macht die Induktion eines DSBs zu einem sehr seltenen Ereignis (49, 128). Dieser Effekt kann darauf zurückgeführt werden, dass die meisten der Elektron-vermittelten Ionisationen von Molekülen sowie resultierende ROS nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen isoliert vorliegen und daher nicht zur Ausbildung eines DSBs führen (siehe auch Kapitel 2.2.1). Deshalb könnte die Anzahl der Einzelstrangbrüche sowie der Basenschäden bzw. der zugrunde liegende oxidative Stress durch ROS ausschlaggebend für die Reparatur eines DSBs sein.

Stimulation der DSB-Reparatur in bestrahlten HOMSF1-Zellen durch eine Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid

Um diese Hypothese zu testen, wurde das Agens H_2O_2 gewählt, welches aufgrund seiner starken oxidativen Eigenschaften zu den ROS gezählt wird. Wie bei der strahleninduzierten Radiolyse von Wasser, entsteht bei der Reduktion von H_2O_2 das hoch reaktive Hydroxylradikal, welches andere Moleküle schädigt und über die Generierung neuer Radikale eine Kettenreaktion auslösen kann. In geringen Konzentrationen (μM -Bereich) kann H_2O_2 zur selektiven Erzeugung von Einzelstrangbrüchen und Basenschäden eingesetzt werden (51, 128). Wenn das oxidative Stresslevel tatsächlich mitentscheidend für die DSB-Reparatur ist, sollte die Behandlung der Zellen mit H_2O_2 zu einer Stimulation der DSB-Reparatur führen.

Konfluente HOMSF1-Zellen wurden vor der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen für 30 min bei 4°C mit $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 in eiskaltem PBS behandelt und anschließend für 15 min bei 37°C in frischem, vorgewärmten Medium kultiviert. Als Behandlungskontrolle wurden Zellen genauso behandelt, aber lediglich mit eiskaltem PBS inkubiert (*Mock*). Durch die niedrige Konzentration von H_2O_2 entstehen in der Zelle überwiegend Basenschäden und Einzelstrangbrüche, dennoch können durch zwei, auf gegenüberliegenden DNA-Strängen induzierten Einzelstrangbrüchen (≤ 10 bp voneinander entfernt) auch DSBs entstehen (36). Um auszuschließen, dass die zur Behandlung gewählte H_2O_2 -Konzentration selbst DSBs erzeugt, wurden die Zellen direkt nach der Behandlung fixiert und gegen γH2AX sowie 53BP1 gefärbt. Die Quantifizierung der Foci zeigte, dass durch alleinige Behandlung der Zellen keine DSBs induziert wurden (Abb. 18A,B). In nicht-behandelten (NT) Zellen, *mock*-behandelten Zellen und in mit $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 behandelten Zellen wurden im Mittel $\sim 0,19$ Foci pro Zelle (SD 0,04 für (NT); 0,02 (*Mock*); 0,04 ($10\ \mu\text{M}$ H_2O_2)) detektiert. Dass die durch H_2O_2 generierten Radikale in den Zellkern gelangen und prinzipiell DSBs erzeugen können, zeigten Experimente bei denen Zellen mit $150\ \mu\text{M}$ H_2O_2 behandelt wurden. Bei dieser Konzentration wurde ca. 1 Focus pro Zelle (SD 0,13) erzeugt (Abb. 18A,B). In der Studie von Grudzinski *et al.* wurde zusätzlich überprüft, ob die Behandlung der Zellen mit $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 die Induktion der Foci nach Bestrahlung über den Sauerstoffeffekt verstärkt, was jedoch nicht der Fall war (137). Für die Untersuchung der Reparaturreffizienz lag damit bei

allen Versuchsbedingungen (bzw. Behandlungen der Zellen) eine vergleichbare Anzahl von spontan auftretenden DSBs sowie eine vergleichbare DSB-Induktion vor.

Die Analyse zur stimulierenden Wirkung von H_2O_2 auf die DSB-Reparatur wurde mit einer Dosis von 12 mGy durchgeführt, da bei dieser Dosis die Reparatureffizienz deutlich beeinträchtigt war (vgl. Abb. 18C). Die Behandlung von HOMS1-Zellen mit 10 μM H_2O_2 erfolgte wie oben beschrieben, wobei die Zellen nach der Inkubation mit frischem Medium mit 12 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt wurden. Nach einer Reparaturzeit von 24 h wurden die Zellen fixiert und gegen $\gamma H2AX$ und 53BP1 gefärbt. Dabei zeigten bestrahlte, nicht- und *mock*-behandelten Zellen im Mittel signifikant mehr Foci als die entsprechenden, unbestrahlten Zellen. Nach der Bestrahlung der Zellen betrug die mittlere Anzahl der residualen Foci ca. 0,05 Foci pro Zelle (SE 0,1), d.h. dass ca. 20 % (SE 7) der induzierten Foci persistierten. Zellen, die vor der Bestrahlung mit 10 μM H_2O_2 behandelt wurden, zeigten dagegen keinen statistisch signifikanten Unterschied zu unbestrahlten Zellen und wiesen im Mittel nur 0,01 residuale Foci pro Zelle (SE 0,2) auf. Dabei fiel auf, dass in einzelnen Experimenten sogar eine geringere, mittlere Anzahl an Foci pro Zelle detektiert wurde als in unbestrahlten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass durch die H_2O_2 -Behandlung mit anschließender Bestrahlung zum Teil auch spontan auftretende DSBs repariert wurden. Im Bezug auf die Foci-Induktion persistierten in H_2O_2 -vorbehandelten Zellen lediglich 4 % (SE 9) der induzierten Foci, was der mittleren Reparatureffizienz nach Bestrahlung mit höheren Dosen entspricht (vgl. Abb. 17D). Im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen zeigten die mit H_2O_2 vorbehandelten Zellen somit eine signifikant verbesserte DSB-Reparatur (Abb. 18C). Diese Experimente zeigten, dass der durch H_2O_2 verursachte oxidative Stress tatsächlich in der Lage war, die DSB-Reparatur nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen zu stimulieren.

Die vorgestellten Ergebnisse stimmen sehr gut mit denen der vorangegangenen Studie von Grudzenski *et al.* überein und validieren diese (137). Zusätzlich wurden in dieser Studie H_2O_2 -vorbehandelte und unbehandelte, humane Fibroblasten mit 200 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt. In diesem Experiment wurde kein Unterschied in der DSB-Reparatureffizienz zwischen vorbehandelten und unbehandelten Zellen festgestellt. Daraus kann geschlossen werden, dass nach der Bestrahlung mit 200 mGy, im Gegensatz zur Bestrahlung der Zellen mit 10 mGy oder 25 mGy, der strahleninduzierte, oxidative Stress zur Stimulation der DSB-Reparatur ausreichte. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass ein bestimmtes oxidatives Stresslevel in der Zelle wichtig für die effiziente DSB-Reparatur (bei niedrigen Strahlendosen) ist. Weitere Experimente mit mehreren Bestrahlungsdosen könnten zeigen, bis zu welcher Dosis eine Aktivierung der DSB-Reparatur möglich ist. bzw. ab welcher Dosis der strahleninduzierte, oxidative Stress zur Stimulation der DSB-Reparatur ausreichte. In den folgenden Untersuchungen sollte diese Hypothese zunächst mit einem konträren Ansatz überprüft werden.

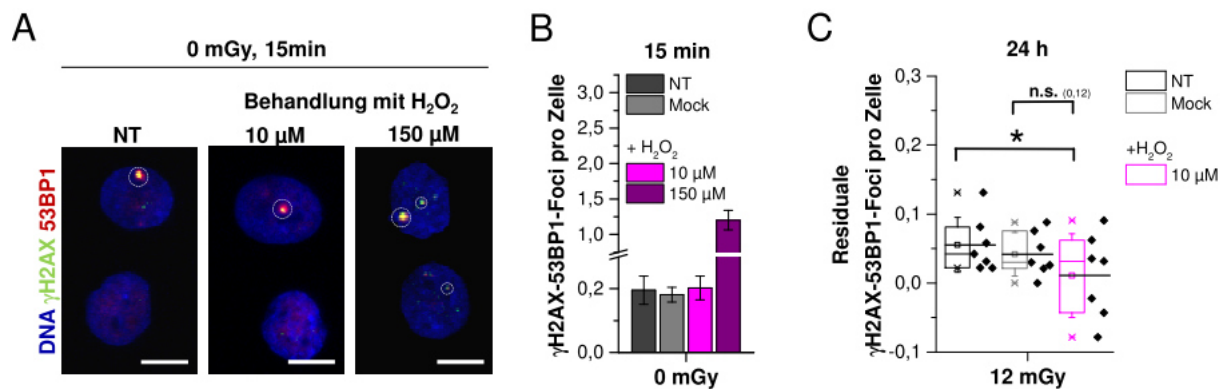


Abb. 18: H₂O₂ stimuliert die DSB-Reparatur nach Bestrahlung. Konfluente HOMS F1-Zellen wurden für 30 min bei 4 °C mit 10 μM oder 150 μM H₂O₂ behandelt, für 15 min bei 37 °C mit frischem Medium kultiviert. Die Zellen wurden entweder nach 15 min fixiert (A+B) oder mit 12 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt und nach 24 h fixiert (C). Als Kontrolle wurden Zellen entsprechend behandelt, aber lediglich mit eiskaltem PBS inkubiert (*Mock*) oder verblieben ohne Mediumswechsel (NT). Anschließend wurden die Zellen gegen γH2AX und 53BP1 gefärbt sowie die DNA mit DAPI angefärbt. (A) Repräsentative Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung von γH2AX und 53BP1 in H₂O₂-behandelten HOMS F1-Zellen. Die Foci wurden zur besseren Sichtbarkeit weiß eingekreist. Große Foci (große Kreise) repräsentieren spontan auftretende DSBs, während die kleinen Foci (kleine Kreise) durch H₂O₂ induzierte DSBs kennzeichnen. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm. (B) Quantifizierung der durch H₂O₂ induzierten DSBs in HOMS F1-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten (mit Duplikat) sowie deren Standardabweichung. Pro Zählung wurden die kolocalisierenden Foci in min. 300 Zellen verblindet ausgezählt. (C) Quantifizierung der Reparatur von γH2AX-53BP1-Foci nach Bestrahlung mit 12 mGy. Dargestellt ist die Verteilung der mittleren Anzahl der Foci pro Zelle (abzüglich der jeweiligen Kontrolle im Experiment; 0,2-0,3 Foci pro Zelle) in Boxplots (25-75 % der Daten) von 4 Experimenten (mit Duplikat) sowie deren Standardabweichung (Whisker). Die "x" unter und über der Box umfassen 98 % der Daten. Die statistische Signifikanz wurde mit einem einseitigen Zweistichproben-t-Test überprüft (*; p<0,05, n.s.: nicht signifikant).

Beeinträchtigung der DSB-Reparatur in bestrahlten HOMS F1-Zellen durch eine Vorbehandlung mit N-Acetylcystein

Wenn das ROS induzierte, oxidative Stresslevel kritisch für die analysierte DSB-Reparatur-effizienz ist, sollte die Behandlung der Zellen mit einem Antioxidans bzw. Radikalfänger zu einer verschlechterten Reparatureffizienz nach Bestrahlung führen. Daher wurde im nächsten Schritt die DSB-Reparatureffizienz von Zellen in Gegenwart des Antioxidans und Radikalfängers NAC untersucht. Als potenter Radikalfänger kann NAC die bei der Bestrahlung entstehenden Radikale abfangen und könnte bei einer ausreichenden Konzentration auch die Anzahl der induzierten DSBs reduzieren (144, 177-179). Für die geplanten Reparaturstudien mit NAC sollte jedoch für alle Versuche bzw. Versuchsbedingungen eine vergleichbare DSB-Induktion gewährleistet werden. Deshalb wurde bei der Ermittlung einer geeigneten NAC-Konzentration nicht nur der Einfluss von NAC auf die spontan auftretenden DSBs untersucht, sondern auch die Induktion von DSBs durch die Bestrahlung in Gegenwart von NAC. Experimentell wurden konfluente HOMS F1 für 1 h (bei 37 °C) mit 1 mM, 10 mM, 50 mM NAC in frischem Medium behandelt, mit 120 mGy bestrahlt und 15 min nach der Bestrahlung fixiert. Als Behandlungskontrolle dienten Zellen, bei denen lediglich das Medium ausgetauscht wurde (*Mock*). Anschließend wurden die Zellen gegen γH2AX und 53BP1 gefärbt und die Foci in unbestrahlten sowie in bestrahlten Zellen verblindet ausgezählt.

Die Quantifizierung der Foci zeigte, dass die einstündige Inkubation mit verschiedenen NAC-Konzentrationen keinen Effekt auf die spontan auftretenden DSBs hatte (Abb. 19A). Durch die Bestrahlung mit 120 mGy wurden in unbehandelten Zellen 2,6 Foci pro Zelle (SE 0,16) induziert (Abb. 19A). Die Vorbehandlung der Zellen mit 1 mM NAC zeigte keinen Effekt auf die DSB-Induktion (2,6 Foci pro Zelle (SE 0,20), während eine Vorbehandlung mit 10 mM NAC eine geringfügige Reduktion der Induktion auf 2,3 Foci pro Zelle (SE 0,16) bewirkte. Dass bei der Bestrahlung generierte Radikale in der Zelle bzw. im Zellkern durch NAC abgefangen werden können, zeigte die Behandlung mit 50 mM NAC, die zur signifikanten Reduktion der Induktion auf 2 Foci pro Zelle (SE 0,20) führte. Um den Induktionswert nicht zu stark zu beeinflussen, wurden für die Reparaturstudien die Konzentrationen 1 mM und 10 mM NAC ausgewählt, wobei bei der Behandlung mit 10 mM NAC durch den leichten Effekt auf die Induktion ebenfalls sicher gestellt war, dass NAC in der Zelle bzw. im Zellkern vorlag.

Im nächsten Schritt überprüft, ob die Langzeitbehandlung der Zellen mit 1 mM bzw. 10 mM NAC über die Reparaturzeit von 24 h ebenfalls keinen Effekt auf die Anzahl der spontan auftretenden DSBs zeigte. Dazu wurden konfluente HOMSF1 über insgesamt 25 h (1 h Vorbehandlung und 24 h Reparaturzeit) mit NAC inkubiert und anschließend fixiert. Die Quantifizierung der γ H2AX-53BP1-Foci bestätigte, dass die Langzeitbehandlung mit 1 mM oder 10 mM NAC keinen Einfluss auf die spontan auftretenden DSBs hatte (Abb. 19B). Im Mittel wurden $\sim 0,17$ Foci pro Zelle (SE je 0,01) detektiert.

Für die Reparaturstudien wurden konfluente, mit 1 mM oder 10 mM NAC vorbehandelte HOMSF1-Zellen mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlen von 5 mGy bis 100 mGy bestrahlt, nach 24 h fixiert und gegen γ H2AX und 53BP1 gefärbt. Die Quantifizierung der Foci zeigte, dass in *mock*- oder NAC-behandelten Zellen nach Bestrahlung im Mittel signifikant mehr Foci detektiert wurden als in unbestrahlten Zellen. Nach der Bestrahlung betrug die mittlere Anzahl der residualen Foci in den *mock*-behandelten Zellen zwischen 0,02 bis 0,08 Foci pro Zelle bzw. in NAC-behandelten Zellen zwischen 0,07-0,09 Foci pro Zelle (Abb. 19C). Der direkte Vergleich der mittleren Anzahl der residualen Foci in NAC- und *mock*-behandelten Zellen zeigte, dass die NAC-Behandlung bei den niedrigsten Strahlendosen 5 mGy und 12 mGy sowie bei der höchsten Strahlendosis von 100 mGy keinen Effekt auf die Reparaturreffizienz hatte. Bei geringeren Dosen (5-12 mGy) war die Reparaturreffizienz in unbehandelten Zellen bereits deutlich verschlechtert (vgl. Abb. 17C), sodass eine weitere Verschlechterung der Reparaturreffizienz durch NAC wohl nicht mehr möglich war. Bei der höheren Dosis von 100 mGy trat der gegenteilige Effekt auf. Hier ist der Strahlenschaden trotz der NAC-Behandlung wahrscheinlich groß genug um die Reparatur selbst effizient anzuregen. Im mittleren Dosisbereich von 25 mGy und 50 mGy, in dem die Reparaturreffizienz in unbehandelten Zellen leicht beeinträchtigt war (vgl. Abb. 17C), wurde eine erhöhte, mittlere Anzahl der residualen Foci in NAC-behandelten Zellen festgestellt. Dabei zeigten die mit 1 mM vorbehandelten Zellen eine höhere ($p \sim 0,1$) bzw.

die mit 10 mM vorbehandelten Zellen eine signifikant höhere mittlere Anzahl der persistierenden Foci pro Zelle als die *mock*-behandelten Zellen. Betrachtet man nun die Anzahl der residualen Foci im Verhältnis zum entsprechenden Induktionswert, persistierten nach der Bestrahlung mit 25 mGy in den mit 1 mM bzw. 10 mM NAC behandelten Zellen 14 % bzw. 16 % der induzierten Foci (SE 1,3 bzw. 2,8) während in den *mock*-behandelten Zellen 9 % der Foci (SE 2,8) persistierten (Abb. 19D). Nach Bestrahlung mit 50 mGy persistierten aufgrund der höheren Bestrahlungsdosis und der damit stärkeren, strahleninduzierten Aktivierung der DSB-Reparaturprozesse insgesamt weniger Foci in den Zellen. In *mock*-behandelten Zellen persistierten 3 % der Foci (SE 1,8), wobei in den mit 1 mM bzw. 10 mM behandelten Zellen 6 % (SE 1,3) bzw. 8 % (SE 1,9) der induzierten Foci persistierten und damit mehr DSBs unrepariert verblieben.

Zusammengefasst zeigte dieses Experiment für den mittleren Dosisbereich (25-50 mGy), dass die Behandlung mit NAC und die damit verbundene Reduktion des oxidativen Stresses in der Zelle einen negativen Effekt auf die DSB-Reparatureffizienz hatte. Mit diesem Ergebnis wurde die Hypothese, dass das oxidative Stresslevel entscheidend für die effiziente DSB-Reparatur im Niedrigdosisbereich ist, über einen konträren experimentellen Ansatz bestätigt. Darüber hinaus wurde für NAC im Bezug auf die DSB-Reparatureffizienz ein Dosis-modifizierender Einfluss festgestellt. denn die Reparetureffizienz von Zellen, die mit 10 mM NAC behandelt und mit 50 mGy bestrahlt wurden, entsprach der Reparetureffizienz von unbehandelten Zellen, die lediglich mit 25 mGy bestrahlt wurden.

Im Rahmen der zweiten Reparaturstudie mit NAC wurde untersucht, ob der für die NAC-Behandlung vorgenommene Mediumswechsel und die damit verbundene Versorgung der Zellen mit neuen Nährstoffen den Effekt von NAC auf die DSB-Reparatur beeinflusst. Diese zweite Studie wurde aufgrund der beobachteten, höheren Reparetureffizienz von *mock*-behandelten Zellen (mit Mediumswechsel; vgl. Abb. 19D) im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen (ohne Mediumswechsel; Abb. 17C) durchgeführt. Das Experiment wurde analog zur ersten Reparaturstudie durchgeführt, wobei diesmal dem Kulturmedium der Zellen, sogenanntem konditioniertem Medium, lediglich 10 mM NAC zugegeben wurde. Daher dienten Zellen, die nicht behandelt (NT) wurden, als Kontrolle. Die Quantifizierung der Foci nach Bestrahlung zeigte, dass in den nicht- oder NAC-behandelten Zellen im Mittel signifikant mehr Foci detektiert wurden als in den entsprechenden, unbestrahlten Zellen. Nach der Bestrahlung der Zellen betrug die mittlere Anzahl der residualen Foci unabhängig von der Bestrahlungsdosis zwischen 0,05-0,1 Foci pro Zelle in unbehandelten Zellen bzw. zwischen 0,06-0,1 Foci pro Zelle in NAC-behandelten Zellen (Abb. 19E). Der direkte Vergleich der mittleren Anzahl der residualen Foci in NAC- und unbehandelten Zellen zeigte, wie schon in der ersten Versuchsreihe, für 25 mGy und 50 mGy eine höhere mittlere Anzahl an residualen Foci ($p \sim 0,07$) in den NAC-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Im Verhältnis

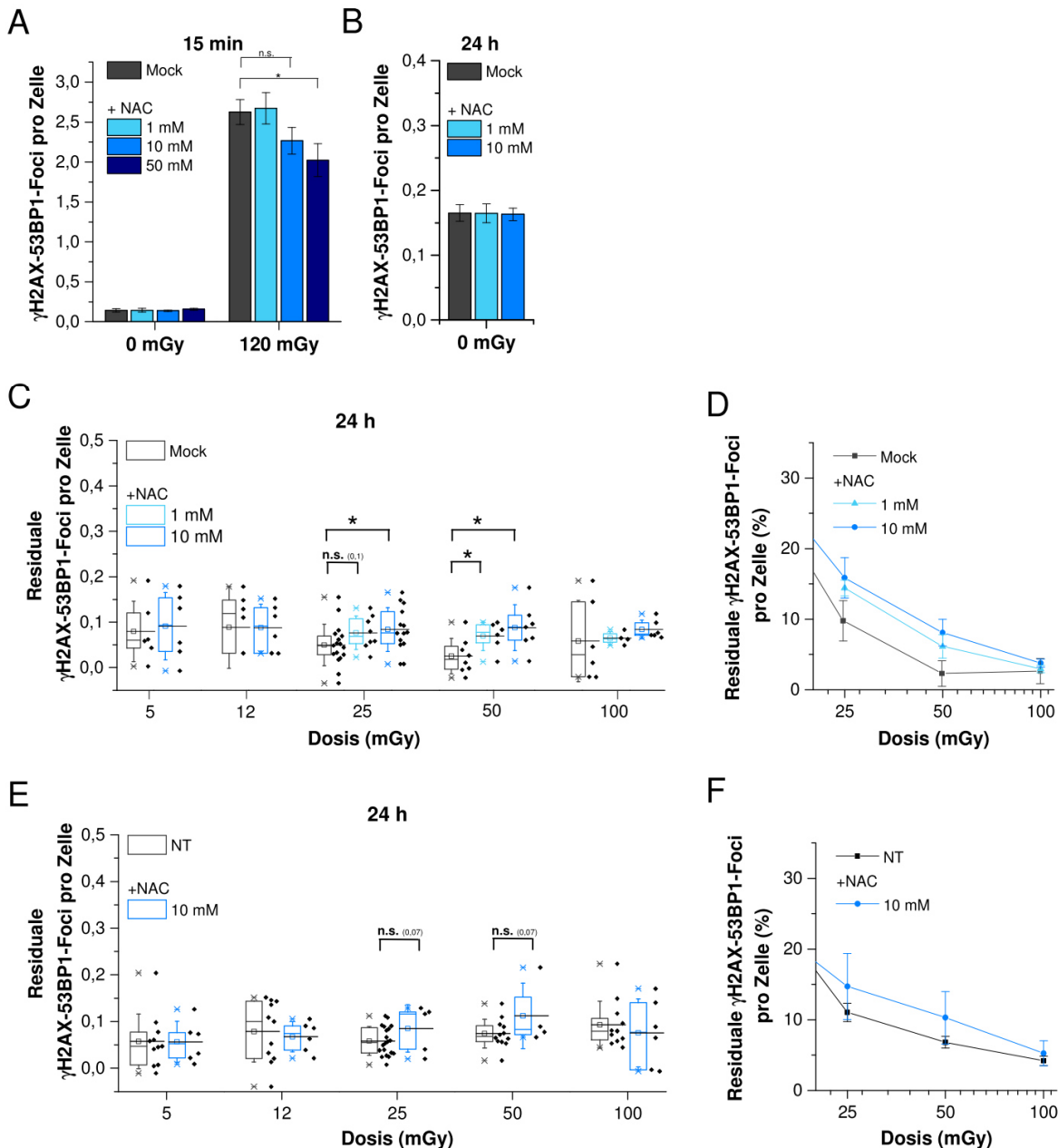


Abb. 19: N-Acetylcystein (NAC) verschlechtert die DSB-Reparatureffizienz nach Bestrahlung. Konfluente HOMS1-Zellen wurden für 1 h (37 °C) mit NAC behandelt, welches entweder in frischem Medium angesetzt wurde (A-D) oder dem Zellkulturmedium zugesetzt wurde (E+F). Die Zellen verblieben unbestrahlt oder wurden mit verschiedenen Dosen (5-120 mGy) bestrahlt und nach 15 min (A) oder nach 24 h fixiert (B-F). Als Kontrolle wurden Zellen genauso behandelt, aber lediglich mit neuem Medium versorgt (*Mock*; A-D) oder verblieben ohne Mediumswechsel (NT; für E+F). Anschließend wurden die Zellen gegen γ H2AX und 53BP1 sowie mit DAPI angefärbt. (A) Quantifizierung von γ H2AX-53BP1-Foci nach einstündiger Behandlung mit NAC. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 Experimenten (mit Duplikat) sowie deren Standardfehler. Pro Zählung wurden die Foci in min. 100 Zellen verblindet ausgezählt. (B) Quantifizierung der γ H2AX-53BP1-Foci nach 25-stündiger Behandlungszeit mit NAC. Dargestellt sind die Mittelwerte von 9 Experimenten (mit Duplikat) sowie deren Standardfehler. Pro Zählung wurden die kolokalisierenden Foci in min. 500 Zellen verblindet ausgezählt. (C+E) Quantifizierung der γ H2AX-53BP1-Foci in NAC-behandelten HOMS1-Zellen nach Bestrahlung. Dargestellt ist die Verteilung der mittleren Anzahl der Foci pro Zelle (abzüglich der jeweiligen Kontrolle im Experiment; 0,1-0,3 Foci pro Zelle) in Boxplots (25-75 % der Daten) von 3-9 Experimenten (mit Duplikat) sowie deren Standardabweichung (Whisker). Die "x" unter und über der Box umfassen 98 % der Daten. Pro Zählung wurden die Foci in min. 500 Zellen verblindet ausgezählt. (D+F) Normierung der residualen γ H2AX-53BP1-Foci auf die Induktion von 20 Foci pro Zelle und Gy (aus Abb. 16B). Dargestellt ist der Mittelwert von 3-9 Experimenten sowie deren Standardfehler. (A+C+E) Die statistische Signifikanz wurde mit einem einseitigem Zweistichproben-t-Test überprüft (*; $p < 0,05$; n.s.: nicht signifikant). (E+F) Die dargestellten Mittelwerte der NT entsprechen den in Abb. 17 gezeigten Daten.

zum entsprechenden Induktionswert persistierten nach der Bestrahlung mit 25 mGy in den mit 10 mM NAC behandelten Zellen 15 % (SE 5) der induzierten Foci, während in den nicht-behandelten Zellen 11 % (SE 1,29) der Foci persistierten (Abb. 19F). Nach Bestrahlung mit 50 mGy persistierten aufgrund der höheren Bestrahlungsdosis weniger Foci in den nicht-behandelten Zellen (7 % (SE 0,7)), wobei in den mit 10 mM NAC behandelten Zellen 10 % (SE 4) der induzierten Foci persistierten bzw. DSBs unrepariert verblieben. Für niedrigere (5 und 12 mGy) oder höhere (100 mGy) Bestrahlungsdosen wurde, ebenfalls in Übereinstimmung mit der ersten Versuchsreihe, kein Unterschied zwischen NAC-behandelten oder nicht-behandelten Zellen festgestellt. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe bestätigt damit die Resultate aus der ersten Versuchsreihe und zeigte für den mittleren Dosisbereich, dass die beobachtete eingeschränkte DSB-Reparatureffizienz sowie der Dosis-modifizierende Effekt für beide Strahlendosen tatsächlich auf NAC zurückzuführen ist. Die Versorgung der Zellen mit neuen Nährstoffen durch den vorgenommenen Mediumswechsel hatte keinen Einfluss auf diesen Effekt.

Zusammengefasst zeigen diese DSB-Reparaturstudien, dass das oxidative Stresslevel entscheidend für die effiziente Reparatur nach Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen ist. Experimentell wurde diese Hypothese mit zwei konträren Ansätzen untersucht und validiert. Bei einer Dosis von 12 mGy, bei der im Mittel ca. 30 % der induzierten DSBs unrepariert verbleiben, wurde H_2O_2 eingesetzt, um den während der Bestrahlung induzierten, oxidativen Stress zusätzlich zu erhöhen. Dadurch waren H_2O_2 -vorbehandelte Zellen in der Lage, fast alle induzierten DSBs zu reparieren, während in unbehandelten Zellen viele DSBs persistierten (Abb. 18). Die Reparatureffizienz von H_2O_2 -vorbehandelten Zellen entsprach der nach Bestrahlung von unbehandelten Zellen mit einer hohen Dosis (>100 mGy). Bei einer Dosis von 25 mGy bzw. 50 mGy, bei der im Mittel zwischen 7-11 % der induzierten DSBs unrepariert verblieben, wurde NAC als Antioxidans und Radikalfänger eingesetzt, um so den endogenen sowie den durch die Bestrahlung induzierten oxidativen Stress zu reduzieren. Tatsächlich verblieben in mit NAC vorbehandelten Zellen mehr DSBs unrepariert als in unbehandelten Zellen (Abb. 19). Die Reparatureffizienz entsprach der nach Bestrahlung mit einer niedrigen Dosis (< 25 mGy). Daher hat die Modulation des oxidativen Stresses durch die Behandlung mit H_2O_2 oder NAC bei der Bestrahlung im Niedrigdosisbereich einen Dosis-modifizierenden Effekt.

5.1.4. *In vivo*-Relevanz des *LowDose*-Effektes und dessen Abhängigkeit vom oxidativen Stress

Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass der *LowDose*-Effekt auch in Zellen der Organe von Mäusen beobachtet werden kann (137). Die Rolle des oxidativen Stresses bei der DSB-Reparatur nach niedrigen Strahlendosen wurde jedoch noch nicht im Modellorganismus Maus untersucht. Die Übertragung dieser Problemstellung auf den Modellorganismus wird zeigen, ob die in der Zellkultur erhaltenen Ergebnisse auch für den lebenden Organismus relevant sind oder ob diese lediglich ein Artefakt der Zellkultivierung sind. Für eine mit der H₂O₂-Behandlung in der Zellkultur vergleichbare Bedingung sollte die DSB-Reparatur in der Lunge untersucht werden. Die Lunge steht natürlicherweise in direktem Kontakt zum Luftsauerstoff, besitzt einen höheren Sauerstoffpartialdruck als andere Organe und ist daher wahrscheinlich auch einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt. Analog zur durchgeführten NAC-Behandlung in der Zellkultur wurden die Mäuse direkt mit NAC behandelt, da es aufgrund seiner medizinischen Anwendung gut charakterisiert ist und eine sehr gute Verträglichkeit besitzt (180-184). NAC ist ein kommerziell erhältliches, schleimlösendes Mittel bei Atemwegserkrankungen (Hustenlöser) und wird in der klinischen Anwendung als Antidot bei einer Paracetamolvergiftung der Leber eingesetzt (182, 185-187). Kritisch diskutiert wird dessen schützende Wirkung bei der Behandlung von Infektionskrankheiten sowie zur Prophylaxe von Nierenschäden durch Kontrastmittel, welches häufig bei der Diagnostik mit Röntgenstrahlen eingesetzt wird (188-191).

Angelehnt an andere tierexperimentelle Studien mit NAC wurden die Mäuse über 14 Tage mit 40 mM NAC im Trinkwasser behandelt, was ungefähr einer Aufnahme ~1 g NAC pro Kilogramm des Körpergewichtes am Tag entspricht (144, 145, 177). Eine Kontrollgruppe von Mäusen erhielt über den gleichen Zeitraum normales Trinkwasser. Für die Reparaturstudien wurden die Mäuse mit 10 mGy Röntgenstrahlung bestrahlt und 15 min sowie 24 h nach der Bestrahlung zur Organentnahme getötet. Eine unbestrahlte Gruppe von NAC-behandelten Mäusen bzw. von Mäusen aus der Kontrollgruppe wurde entsprechend behandelt und diente der Analyse der spontan auftretenden DSBs im jeweiligen Gewebe. Die Gewebeschnitte von der Leber wurden gegen γ H2AX bzw. die Gewebeschnitte der Lunge und Niere gegen 53BP1 gefärbt. Die resultierenden Foci wurden in den Hepatozyten der Leber, den Tubuluszellen der Niere und den Bronchialepithelzellen der Lunge verblindet ausgezählt (Abb. 20A). Zunächst wurde die Quantifizierung der Foci in Organen von Mäusen der Kontrollgruppe vorgenommen, um die Eignung der Lunge als Äquivalent zur H₂O₂-Behandlung in der Zellkultur zu untersuchen.

Die Quantifizierung der γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci in den Organen von unbestrahlten Mäusen der Kontrollgruppe zeigte ca. 0,04 Foci pro Zelle (SE 0,003 bzw. 0,001) der Leber und Lunge sowie ca. 0,06 Foci pro Zelle (SE 0,003) der Niere. Die niedrige Anzahl und die geringe Variation der mittleren Anzahl an Foci pro Zelle zwischen den Mäusen bestätigte, dass die Maus ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung niedriger Strahlendosen ist (Abb.

20B). Durch die Bestrahlung mit 10 mGy wurden in allen analysierten Organen von Mäusen der Kontrollgruppe ca. 0,06 Foci pro Zelle (SE 0,001 (Leber); 0,005 (Niere); 0,005 (Lunge)) induziert (Abb. 20C). Dies zeigt, dass der direkte Kontakt zum Luftsauerstoff in der Lunge die DSB-Induktion nicht beeinflusste. Generell war die Induktion mit 0,06 Foci pro Zelle im Gewebe niedriger als bei einer vergleichbaren Dosis in kultivierten Zellen (ca. 0,2 Foci pro Zelle, vgl. Abb. 16B). Diese Beobachtung wurde auch bei anderen Studien im Mausmodell gemacht, weshalb diese nicht mit einer Bestrahlung im Niedrigdosisbereich assoziiert bzw. auf eine fehlerhafte Dosimetrie zurückzuführen ist (137, 159). Über eine Reparaturzeit von 24 h sank die mittlere Anzahl der strahleninduzierten Foci in den Zellen der Leber bzw. der Niere auf 0,04 (SE 0,01 bzw. 0,004) Foci pro Zelle und in den Zellen der Lunge auf 0,02 (SE 0,002) Foci pro Zelle ab (Abb. 20C). Prozentual zum Induktionswert persistierten in Leber und Niere 60 % der induzierten Foci, während in der Lunge nur 30 % der induzierten Foci persistierten und damit signifikant weniger DSBs unrepariert verblieben. Die verbesserte DSB-Reparatureffizienz in der Lunge legte nahe, dass die Lungenzellen tatsächlich die H₂O₂-Behandlung in der Zellkultur widerspiegeln können. In beiden Systemen führte der höhere oxidative Stress nicht zu einer Erhöhung der DSB-Induktion, stimulierte aber die DSB-Reparaturprozesse (vgl. Abb. 17).

Analog zu den Zellkulturexperimenten mit NAC wurde zunächst der Einfluss einer NAC-Behandlung der Mäuse auf die Anzahl der spontan auftretenden γ H2AX- oder 53BP1-Foci überprüft. Die Quantifizierung der Foci in Zellen der Leber, Niere und Lunge von NAC-behandelten, unbestrahlten Mäusen zeigten keinen Unterschied zu Mäusen aus der Kontrollgruppe (Abb. 20B). Nach Bestrahlung mit 10 mGy Röntgenstrahlung ergab die Quantifizierung der Foci in den Organen der NAC-behandelten Mäuse, dass in allen analysierten Organen ca. 0,05 Foci pro Zelle (SE 0,008 (Leber); 0,005 (Niere); 0,006 (Lunge)) induziert wurden (Abb. 20C). Dieser Induktionswert war deutlich geringer ($p < 0,25$ (Leber), $p < 0,05$ (Niere, Lunge)) als die DSB-Induktion von mit 10 mGy bestrahlten Mäusen der Kontrollgruppe, was darauf hindeutete, dass NAC in die Zellen im Organismus aufgenommen wurde bzw. dessen Stoffwechsel beeinflusste. Diese Schlussfolgerung wird durch entsprechende Studien zur Verteilung von radioaktiv markiertem NAC in der Ratte oder Maus gestützt, die eine Anreicherung der radioaktiven Substanz in Leber, Niere und Lunge nachwiesen (192, 193). Über eine Reparaturzeit von 24 h verblieben in allen untersuchten Organen der NAC-behandelten Mäuse tendenziell etwas weniger Foci pro Zelle (0,028-0,030 Foci pro Zelle; SE 0,004 (Leber); 0,008 (Niere); 0,003 (Lunge)), als in der Kontrollgruppe (0,04 Foci pro Zelle). Durch die ebenfalls niedrigere Induktion persistierten in allen analysierten Organen ca. 60 % der Foci, was der Reparetureffizienz von Niere und Leber der bestrahlten Mäuse der Kontrollgruppe entsprach. Demnach wurden in Leber und Niere kein Effekt von NAC auf die Reparetureffizienz festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen in der Lunge von NAC-behandelten Mäusen eine signifikant verschlechterte DSB-Reparetureffizienz im Vergleich

zu der von nicht-behandelten Mäusen. Auch wenn die DSB-Reparatureffizienz durch die NAC-Behandlung nur in der Lunge beeinträchtigt wurde, zeigt dieses Experiment, dass die in der Zellkultur beobachtete, eingeschränkte DSB-Reparatureffizienz der NAC-Behandlung im Mausmodell reproduziert werden konnte.

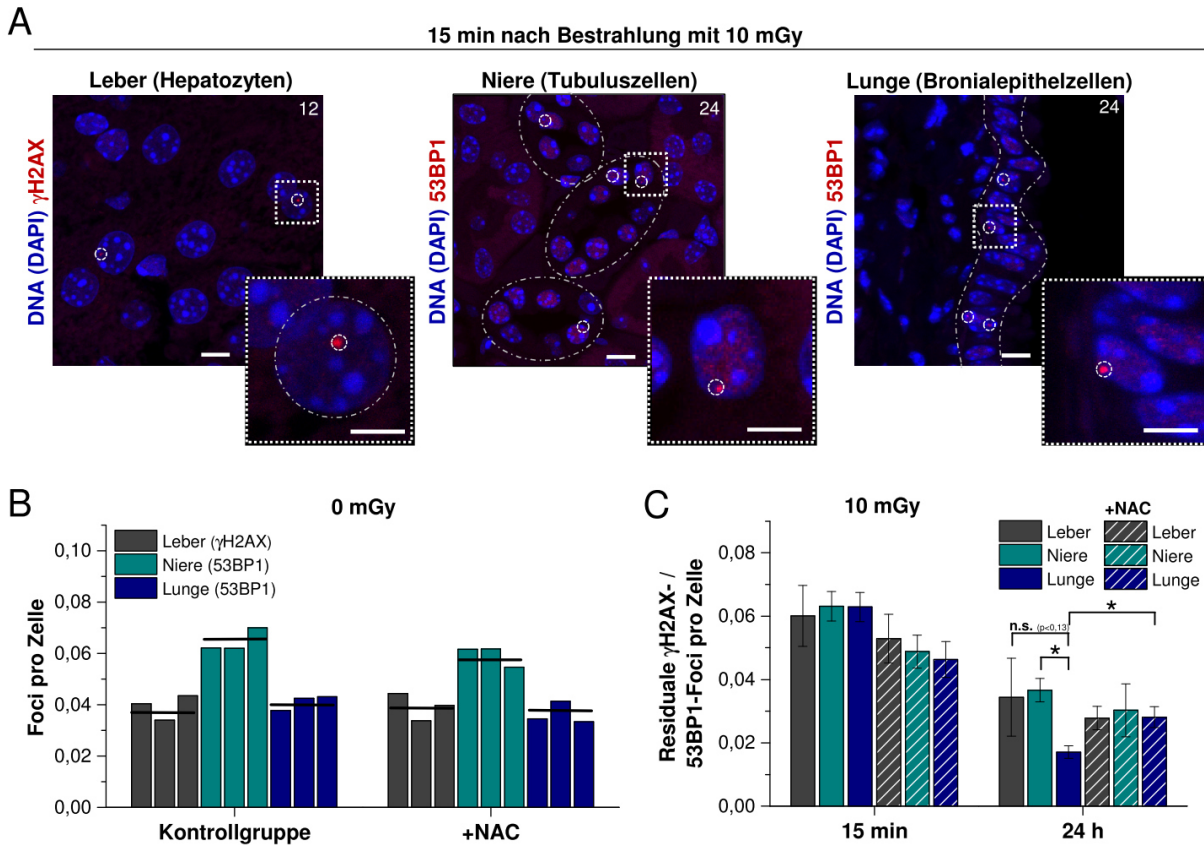


Abb. 20: Die DSB-Reparatur ist nach Bestrahlung in Leber und Niere stark eingeschränkt und wird in der Lunge durch den vorliegenden oxidativen Stresslevel beeinflusst. Adulte C57BL/6 Mäuse wurden über 14 Tage mit NAC-haltigem Trinkwasser behandelt, mit 10 mGy Röntgenstrahlung (120 kV) bestrahlt und nach 15 min bzw. nach 24 h Reparaturzeit zur Organentnahme getötet. Eine Kontrollgruppe wurde entsprechend behandelt, erhielt aber normales Trinkwasser. Die Gewebeschnitte wurden gegen γ H2AX und 53BP1 gefärbt sowie die DNA mit DAPI angefärbt. (A) Repräsentative Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung (Maximumintensitätsprojektion) von γ H2AX-Foci in der Leber sowie von 53BP1-Foci in der Niere und der Lunge. Zellkerne, in denen die Foci ausgezählt werden, sind zur besseren Sichtbarkeit grau umrandet. Die Anzahl dieser Zellen im Bildausschnitt ist im jeweiligen Bild oben rechts angegeben. Die Foci sind zur besseren Sichtbarkeit weiß eingekreist. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 10 μ m bzw. 5 μ m in der vergrößerten Darstellung. (B) Quantifizierung der Foci in unbestrahlten Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Auszählungen der jeweils 3 unbestrahlten Mäuse aus der Kontrollgruppe sowie aus der NAC-behandelten Gruppe (+NAC), wobei der eingezeichnete Strich den Mittelwert der 3 Mäuse repräsentiert. (C) Quantifizierung der Foci nach Bestrahlung. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 Mäusen (abzüglich der spontan auftretenden Foci (aus B)) sowie der Standardfehler. Da keiner bestrahlten Maus eine Kontrollmaus zugewiesen wurde, wurde der dargestellte Fehler über die Fehlerfortpflanzung nach Gauß berechnet. Dadurch spiegeln die Fehlerbalken nicht nur die Verteilung der Mittelwerte der bestrahlten Mäuse wider, sondern berücksichtigen auch die Verteilung der Mittelwerte von unbestrahlten Mäusen. Die statistische Signifikanz wurde über die 95 %-Confidenzintervalle überprüft (*; $p < 0,05$). (B+C) Pro Maus bzw. Organ wurden Foci in min. 1500 Zellen aus unterschiedlichen Färbungen verblindet ausgezählt. Die Daten von Lunge und Niere der Kontrollgruppe wurden im Rahmen der Masterarbeit erhoben, deren stichprobenartig durchgeführte, erneute Auswertung im Rahmen dieser Arbeit als interne Kontrolle bei der Analyse der Organe von NAC-behandelten Mäuse diente (194).

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse aus den Reparaturstudien im Modellorganismus Maus, dass der *LowDose*-Effekt sowie der Einfluss des oxidativen Stresslevels auf die DSB-Reparatur keine Artefakte der Zellkultur darstellen, sondern eine hohe, physiologische Relevanz

besitzen. So verblieben übereinstimmend mit der Zellkultur in Niere und Leber bei dieser niedrigen Strahlendosis von 10 mGy eine hohe Anzahl von DSBs unrepariert. Die Absolutwerte der residualen Foci waren in der Zellkultur bzw. im Maussystem ähnlich, jedoch resultierte aus der niedrigeren DSB-Induktion im Gewebe (0,06 DSBs pro Zelle bei 10 mGy) ein wesentlich höherer prozentualer Anteil persistierender Foci als in der Zellkultur (0,2 DSBs pro Zelle bei 10 mGy). In der Lunge, in der wahrscheinlich natürlicherweise der oxidative Stress höher ist als in anderen Organen, wurde analog zu den H₂O₂-behandelten Zellen eine deutlich verbesserte DSB-Reparatureffizienz festgestellt. Diese wurde durch die Behandlung der Mäuse mit NAC soweit verschlechtert, dass vergleichbar zur Reparatureffizienz von Niere und Leber nun ebenfalls 60 % der induzierten DSBs unrepariert verblieben. Die verschlechterte DSB-Reparatureffizienz ist wahrscheinlich auf die Stärkung des antioxidativen Systems durch NAC und der damit verbundenen Senkung des endogenen sowie strahleninduzierten oxidativen Stresses in den Zellen zurückzuführen (195). In Leber und Niere wurde kein Effekt von NAC auf die Reparatureffizienz festgestellt, hier war vermutlich eine weitere Verschlechterung der Reparatureffizienz nicht möglich. Dieser Effekt wurde bereits in den Reparaturstudien mit kultivierten Zellen beobachtet, in denen die unbehandelten sowie die mit NAC behandelten Zellen eine vergleichbar schlechte Reparatureffizienz zeigten (vgl. Abb. 19). Ob die DSB-Reparatureffizienz von Leber und Niere ebenfalls von einem bestimmten oxidativen Stresslevel abhängt, wird in bereits geplanten Tierexperimenten mit einer Bestrahlung im mittleren Dosisbereich (25-50 mGy) untersucht werden. Dieses Experiment und die entsprechende Auswertung konnte leider aus zeitlichen Gründen nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.

5.1.5. Untersuchung der DSB-Reparatur von Zellen nach der Bestrahlung mit einer niedrigeren Fluenz von Nickel-Ionen

Neben dem intrazellulären Stresslevel der einzelnen Zelle, dessen Untersuchung im vorangehenden Teil dargestellt ist, könnte auch die Kommunikation zwischen den Zellen über den Gesamtzustand der Zellpopulation die DSB-Reparatureffizienz einzelner Zellen beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurden Mäuse mit hochenergetischen Schwerionen bestrahlt. Durch die besondere Art der Energiedeposition von Schwerionen erhalten wenige Zellen entlang der Ionenspur eine hohe Dosis, während Zellen im umliegenden Gewebe nur eine geringe Dosis im Milli-Gray-Bereich erhalten (vgl. Kapitel 4.2 Biodosimetrie). So konnte untersucht werden, ob wenige Zellen, die eine hohe Dosis erhalten, die DSB-Reparaturprozesse in umliegenden Zellen stimulieren, die lediglich eine geringe Dosis im Milli-Gray-Bereich erhielten und für die eine schlechte DSB-Reparatureffizienz festgestellt wurde.

Für die Reparaturstudien wurden Mäuse mit einer sehr niedrigen Fluenz Nickel-Ionen (1 GeV/u, 175 keV/μm, $7,5 \times 10^3$ Ionen pro cm^2) bestrahlt, welche einer Dosis von ca. 2 mGy entsprach (für Formeln und Berechnungen siehe Anhang, Kapitel 8.2). Die Mäuse wurden 15 min sowie 24 h nach der Bestrahlung zur Organentnahme getötet. Eine unbestrahlte Kontrollgruppe wurde entsprechend behandelt und diente der Analyse der spontan auftretenden DSBs im jeweiligen Gewebe. Zellen in Gewebeschnitten von Niere und Lunge wurden gegen 53BP1 gefärbt und die resultierenden Foci in den Tubuluszellen der Niere oder den Bronchialepithelzellen der Lunge verblindet ausgezählt.

Die Quantifizierung der spontan auftretenden 53BP1-Foci in unbestrahlten Mäusen zeigte 0,04-0,06 Foci pro Zelle aus Niere bzw. aus der Lunge. Nach Bestrahlung mit Nickel-Ionen konnte bei der gewählten Fluenz nur relativ selten eine eindeutig erkennbare, kurze Ionenspur beobachtet werden (Abb. 21A). Daher wurde in dieser Analyse die Gesamtschädigung des Organs erfasst ohne zwischen Zellen, die eine Ionenspur zeigten, und den umliegenden Zellen zu differenzieren. Die Quantifizierung der Foci nach Bestrahlung mit Nickel-Ionen zeigte, dass in Niere und Lunge ca. 0,03 53BP1-Foci pro Zelle (SD 0,005 bzw. 0,01) induziert wurden (Abb. 21B). Die vergleichbare Focus-Induktion in der Lunge und der Niere zeigte die Homogenität des Bestrahlungsfeldes am Schwerionen-Beschleuniger SIS (GSI). Dennoch wurden pro Milli-Gray mehr Foci pro Zelle ausgebildet als bei einer vergleichbaren Bestrahlung mit Röntgenstrahlung; ein Effekt, der wahrscheinlich auf die unterschiedliche Art der Energiedeposition von Röntgenstrahlen und Schwerionen zurückzuführen ist. Erstaunlicherweise zeigten die Zellen der Lunge und Niere nach der Reparaturzeit von 24 h ebenfalls eine vergleichbare Anzahl residualer Foci. Dies war aufgrund der Experimente mit Röntgenstrahlen nicht zu erwarten (vgl. Abb. 20C). Darüber hinaus sank die mittlere Anzahl der residualen Foci in Niere und Lunge von 0,01 Foci pro Zelle (SD 0,002 bzw. 0,005) unter die residuale Anzahl der Foci pro Zelle, die nach einer Bestrahlung mit 10 mGy Röntgenstrahlen beobachtet wurde (0,02 Foci pro Zelle in der Lunge bzw. 0,04 Foci pro Zelle in der Niere). Prozentual zum Induktionswert persistierten nach der Reparaturzeit von 24 h in beiden Organen ca. 30 % der induzierten Foci. Damit blieb die Reparatureffizienz der Lunge nach Bestrahlung mit Nickel-Ionen im Vergleich zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlen unverändert. Dies legt nahe, dass das allgemein vorliegende Stresslevel der Zellen in der Lunge für eine effektive DSB-Reparatur ausreichend ist, weshalb kein Effekt der Ionen auf die Reparatureffizienz detektiert wurde. Im Gegensatz dazu stimulierte die räumlich stark begrenzte Energiedeposition durch die Bestrahlung mit Nickel-Ionen die Reparatureffizienz der Zellen in der Niere, in der nach der Bestrahlung mit 10 mGy Röntgenstrahlen 60 % der induzierten Foci persistierten. Da nur wenige Zellen von einem Ion durchdrungen wurden, könnte die beobachtete verbesserte Reparatureffizienz auf einen gegenseitigen Einfluss der Zellen bei der DSB-Reparatur hindeuten.

Dieses Ergebnis war im Kontext mit der in der Literatur beschriebenen schwierigeren bzw. zeitintensiveren Reparatur von komplexen DSBs, wie sie typischerweise durch die Bestrahlung mit Ionen induziert werden, unerwartet (51, 113-120). Dennoch könnten vergleichsweise, strukturell einfache, spontan auftretende DSBs sowie durch δ -Elektronen induzierte DSBs effektiv repariert werden, während komplexe DSBs innerhalb der Ionenspur z.T. etwas mehr Reparaturzeit als 24 h benötigen und daher persistierten. Diese Hypothese könnte über eine differenzielle Färbung von einfachen und komplexen DSBs (Auftreten eines DSB-Markers vs. kombiniertes Auftreten von DSB-, Einzelstrangbruch- und Basenschaden-Marker), wie sie von Asaithamby *et al.* durchgeführt wurde, näher untersucht werden (114). Auch wenn die Ergebnisse durch weitere Experimente oder eine differenzielle Analyse abgesichert werden sollten, zeigten diese, dass wenige Zellen, die einen hohen Schaden erlitten, die Reparaturprozesse in umliegenden und nur leicht geschädigten Zellen stimulierten. Diese Art der Interaktion von nicht-bestrahlten und bestrahlten Zellen, die die Analysen des Endpunktes positiv oder negativ beeinflussen, wird in der Literatur allgemein als *non-target*-Effekt bezeichnet (196, 197). Daher ist der gezogene Schluss, dass die Situation bzw. die Dynamik in der Zellpopulation ebenfalls die DSB-Reparatureffizienz beeinflussen kann, nicht unwahrscheinlich. Im Sinne der Risikoeinschätzung von niedrigen Strahlendosen sind gerade solche Effekte schwer zu erfassen bzw. zu bewerten.

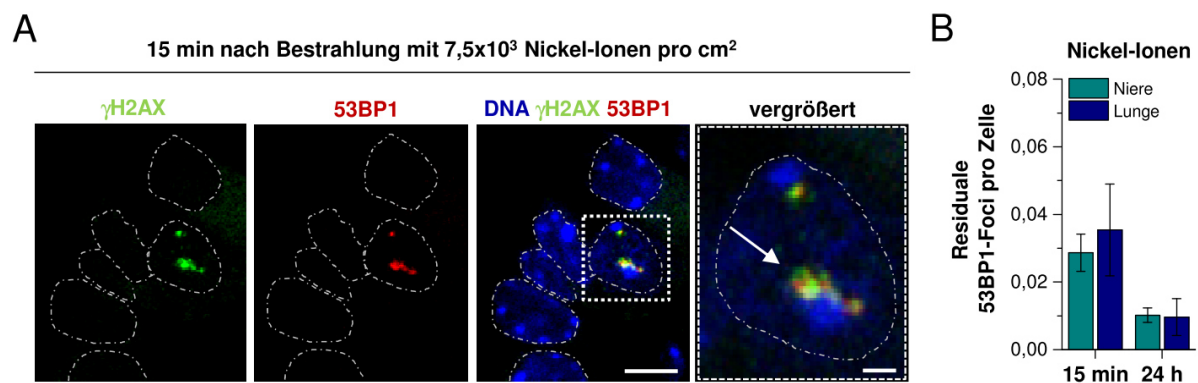


Abb. 21: Die DSB-Reparatur wird in der Niere durch die Bestrahlung mit Nickel-Ionen stimuliert. Adulte C57BL/6 Mäuse wurden mit $7,5 \times 10^3$ Nickel-Ionen/ cm^2 (1 GeV/u, 175 keV/ μm) bestrahlt und nach 15 min bzw. 24 h Reparaturzeit zur Organentnahme getötet. Die Organe wurden entnommen, fixiert und die Gewebeschnitte gegen γH2AX und 53BP1 gefärbt sowie die DNA mit DAPI angefärbt. Eine unbestrahlte Kontrollgruppe von Mäusen wurde entsprechend behandelt. (A) Repräsentative Aufnahme einer Ionenspur in Bronchialepithelzellen der Lunge über die Immunfluoreszenzfärbung (Maximumintensitätsprojektion) gegen γH2AX und 53BP1 nach Bestrahlung mit Nickel-Ionen. Die DNA wurde unspezifisch mit DAPI angefärbt. Die Ionenspur wurde mit einem Pfeil markiert. Der einzeln vorliegende Focus wurde wahrscheinlich von einem δ -Elektron induziert. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm bzw. in der vergrößerten Darstellung 1 μm . (B) Quantifizierung der 53BP1-Foci nach Bestrahlung mit Nickel-Ionen. Dargestellt ist der Mittelwert von 2 Mäusen (abzüglich der spontan auftretenden Foci von 0,04 bzw. 0,06 Foci pro Zelle) sowie deren Standardabweichung. Pro Maus bzw. Organ wurden Foci in min. 3000 Zellen aus unterschiedlichen Färbungen verblindet ausgezählt.

5.2. Diskussion

Die anhaltende, kontroverse Diskussion über das Risiko von niedrigen Strahlendosen, u.a. auch bei der Frage des Risikos von CT-Untersuchungen speziell im Kindesalter, zeigt deutlich die gesellschaftliche Relevanz von Studien im Niedrigdosisbereich auf (13, 31-38, 43). Daher ist es nicht überraschend, dass große Anstrengungen unternommen werden, um mit EPI-CT eine europäische Studie zur Beantwortung dieser Frage zu initiieren (41, 42). Die Durchführung von aussagekräftigen, epidemiologischen Studien im Niedrigdosisbereich (unter 100 mSv) ist aufgrund der statistisch benötigten Kohortengröße, der Einflüsse durch unterschiedliche Lebensweisen der untersuchten Kohorte und der natürlichen Variabilität der Schadensantwort des Organismus schwierig (13, 176). Aus diesem Grund erfolgt die bisherige Risikoabschätzung und die Festlegung der Grenzwerte für medizinische Strahlenexpositionen sowie für umweltbedingte oder berufliche Expositionen über die lineare Dosis-Wirkungsbeziehung des LNT-Modells (13, 173-175). Die lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Strahlenexposition und dem Risiko zur Krebsentstehung beruht auf Ergebnissen von Studien mit relativ hoher Strahlenexposition wie beispielsweise der sogenannten *Life Span* Studie der Atombombenüberlebenden von Hiroshima und Nagasaki (Japan). Für eine Exposition mit einer geringen Strahlendosis wird diese Dosis-Wirkungsbeziehung extrapoliert. An diesem durchaus kritischen Punkt können molekulare Studien in kultivierten Zellen sowie in Modellorganismen helfen, ein tieferes Verständnis der Strahlenantwort nach einer Exposition mit niedrigen Strahlendosen zu erlangen (13, 176).

Im Rahmen dieses Teilprojektes der vorliegenden Arbeit wurde in kultivierten, humanen Fibroblasten sowie im Mausmodell die DSB-Reparatur nach Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen (unter 100 mGy) untersucht und neue Erkenntnisse über die Rolle von ROS bzw. dem ROS-induzierten, oxidativen Stress bei der DSB-Reparatur gewonnen. Der DSB wird als der gefährlichste DNA-Schaden nach einer Strahlenexposition für eine Zelle betrachtet, da dieser im Vergleich zu anderen DNA-Schäden relativ leicht zum Verlust von genetischer Information führen kann und damit ein erhebliches Risiko für die genetische Integrität der Zelle darstellt (54). Um den Nachweis von wenigen DSBs, wie sie durch Strahlendosen unter 100 mGy induziert werden, zu gewährleisten, wurden alle Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit konfluenten Zellen der humanen Fibroblastenzelllinie HOMS F1 durchgeführt. Diese waren in der G0/G1-Phase des Zellzykluses und wiesen eine niedrige Anzahl an spontan auftretenden DSBs auf, die anhand der Färbung der etablierten DSB-Marker γ H2AX und 53BP1 erfasst wurden (Abb. 15). Nach der Exposition mit Röntgenstrahlen wurde zunächst ein linearer Zusammenhang zwischen der Induktion von DSBs und der applizierten Dosis von 5 bis 900 mGy festgestellt (Abb. 16). Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Resultaten anderer Studien (126, 137, 138). Die Reparatur der DSBs hingegen wurde mit

abnehmender Dosis (< 100 mGy) zunehmend schlechter, bis die Reparatur bei 5 mGy so stark beeinträchtigt war, dass 60 % der strahleninduzierten Foci persistierten bzw. die zugrundeliegenden DSBs unrepariert verblieben (Abb. 18). Ein vergleichbares Ergebnis wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für Zellen der Niere und Leber von bestrahlten Mäusen festgestellt (Abb. 20) sowie in der Studie von Grudzenski *et al.* für Zellen weiterer Organe beschrieben (137). Dieses Phänomen wird als *LowDose*-Effekt bezeichnet und wurde bereits von anderen Studien beobachtet (126, 137). Wie in diesen Studien gezeigt werden konnte, handelt es sich beim *LowDose*-Effekt nicht einfach um einen verzögerten Reparaturprozess nach der Exposition mit niedrigen Strahlendosen, sondern diese Foci sind auch noch drei Tage nach der Bestrahlung der Zellen nachweisbar (126, 137). Eine andere Studie zeigte, dass tägliche wiederholte Bestrahlungen mit 10 mGy sogar zu einer Akkumulation der unreparierten DSBs in verschiedenen Geweben der Maus führte (198). Dies impliziert eine hohe physiologische Relevanz des *LowDose*-Effektes. Allgemeiner betrachtet verdeutlichen diese Ergebnisse erneut die gesellschaftliche Relevanz von Studien im Niedrigdosisbereich, denn die für diese Studien verwendeten Strahlendosen werden weltweit in der Diagnostik bei bildgebenden Verfahren mit Röntgenstrahlen tagtäglich tausendfach appliziert.

Bei der Interpretation des *LowDose*-Effektes stellte sich die Frage, warum eine Zelle mit einem γ H2AX-Focus diesen reparieren kann, sobald alle Zellen einen Focus oder mehrere Foci besitzen, und eine andere Zelle dagegen nicht, wenn aufgrund der niedrigen Bestrahlungsdosis nur wenige Zellen einen einzelnen Focus besitzen. Da ein Einfluss durch eine veränderte Struktur oder Komplexität des DSBs selbst ausgeschlossen werden konnte, wurde der Einfluss von oxidativem Stress untersucht, der durch die Strahlenexposition induziert wird und u.a. zur Entstehung von DNA-Schäden (wie dem DSB) führt. Das Ausmaß des strahleninduzierten oxidativen Stresses durch ROS ist wahrscheinlich ebenso wie die resultierende Schadensinduktion proportional zur Bestrahlungsdosis. Eine mögliche Abhängigkeit der Reparaturkapazität von oxidativem Stress wurde durch die durchgeführten Reparaturstudien unterstützt, die darauf hindeuteten, dass die initiale Anzahl der DSBs und somit die Bestrahlungsdosis möglicherweise keine ausschlaggebende Rolle beim *LowDose*-Effekt hat. Experimentell wurde in HOMS1-Zellen unabhängig von der applizierten Strahlendosis (5 - 100 mGy) immer eine ähnliche mittlere Anzahl an persistierenden Foci pro Zelle detektiert (Abb. 17). Dies deutet auf einen Grenzwert hin, bis zu dem die Reparaturprozesse ablaufen und nach dessen Unterschreiten die Reparaturprozesse eingestellt werden. Das impliziert zwar eine gewisse Rolle der Anzahl der DSBs in der einzelnen Zelle, aber sobald aufgrund einer sehr geringen DSB-Induktion bzw. der fortschreitenden Reparatur ein DSB nur noch vereinzelt auftritt, scheinen andere Faktoren wie der vorliegende oxidative Stress ausschlaggebend für die Reparaturkapazität zu sein. Experimentell wurde diese Hypothese mit zwei konträren Ansätzen in kultivierten Zellen sowie deren physiologische Relevanz im Mausmodell untersucht:

Im ersten Ansatz wurde H_2O_2 in der Zellkultur eingesetzt, um den oxidativen Stress vor der Bestrahlung zu verstärken und so zusätzliche Schäden an der DNA, jedoch keine DSBs, zu induzieren. Im Mausmodell wurden entsprechend die Zellen der Lunge analysiert, die im Vergleich zu den Zellen anderer Gewebe einem höheren Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt sind. Es ist bekannt, dass der Anteil des im Zytoplasma gelösten Sauerstoffs die indirekte Strahlenwirkung von Röntgenstrahlung beeinflussen kann. Dieses Phänomen wird allgemein als Sauerstoffeffekt bezeichnet und basiert auf einer verstärkten strahleninduzierten Radikalbildung (11, 49). Für die Reparaturanalyse wurden kultivierte HOMS1-Zellen mit einer Dosis von 12 mGy sowie Mäuse mit einer Dosis von 10 mGy bestrahlt. Bei dieser Dosis war die DSB-Reparatur in Zellen (*in vitro* und *in vivo*) bereits deutlich eingeschränkt, wobei im Mittel ca. 30 % (*in vitro*) bzw. 60 % (*in vivo*) der induzierten DSBs unrepariert verblieben. Die Induktion von DSBs war in Zellen der Lunge im Vergleich zu den Zellen der anderen Organe nicht erhöht. Dies wurde auch für die verwendete H_2O_2 -Konzentration beschrieben (137) und deutet darauf hin, dass in den Zellen der Lunge ein der H_2O_2 -Behandlung vergleichbarer oxidativer Stress vorlag. In den anschließenden Reparaturstudien waren die H_2O_2 -vorbehandelten Zellen sowie die Zellen der Lunge in der Lage, signifikant mehr DSBs zu reparieren als unbehandelte Zellen bzw. Zellen anderer Organe (Abb. 18C+20). Lediglich 4 % (*in vitro*) bzw. 30 % (*in vivo*) der induzierten Brüche verblieben über eine Reparaturzeit von 24 h in den kultivierten, H_2O_2 -vorbehandelten Zellen bzw. in den Zellen der Lunge unrepariert, was in kultivierten Zellen zu einer Verbesserung der Reparatureffizienz um den Faktor 5 und im Mausmodell zu einer Verbesserung der Reparatureffizienz um den Faktor 2 entspricht. Die verbesserte Reparatur in mit H_2O_2 vorbehandelten HOMS1-Zellen wurde von R. Weimer sogar nach einer Bestrahlungsdosis von 25 mGy festgestellt (unveröffentlichte Ergebnisse). Obwohl die DSB-Reparatur bei dieser Dosis nur geringfügig eingeschränkt war, gelang die Stimulation durch H_2O_2 , sodass auch hier nur 4% der induzierten DSBs unrepariert verblieben. Diese Reparatureffizienz entspricht der Effizienz nach der Bestrahlung mit mehr als 100 mGy Röntgenstrahlen.

Im zweiten Ansatz wurde NAC als Radikalfänger eingesetzt, um so den endogenen sowie den durch die Bestrahlung induzierten Radikalstress zu reduzieren. In der Zellkultur wurde beobachtet, dass in NAC-vorbehandelten Zellen bei einer geringfügig eingeschränkten Reparatureffizienz (25-50 mGy) im Mittel mehr DSBs unrepariert zurückblieben als in unbehandelten Zellen (Abb. 19C+20). Bei geringeren Dosen war die Reparatureffizienz bereits deutlich verschlechtert (vgl. Abb. 17C), sodass eine weitere Verschlechterung der Reparatureffizienz durch NAC wohl nicht mehr möglich war. Bei der höheren Dosis von 100 mGy trat der gegenteilige Effekt auf. Hier ist der Strahlenschaden trotz der NAC-Behandlung groß genug um die Reparatur selbst effizient anzuregen. Im Mausmodell wurde die DSB-Reparatureffizienz in Zellen der Lunge, in welchen 30 % der induzierte DSBs über 24 h unrepariert verblieben, durch die Behandlung der Mäuse mit NAC verschlechtert. In Zellen der

Lunge von NAC-behandelten Mäusen verblieben nun 60 % der induzierten DSBs unrepariert. Dies war vergleichbar zu Niere und Leber unbehandelter Mäuse und entspricht einer Verschlechterung der Reparatureffizienz in der Lunge um den Faktor 2. Dieses Ergebnis sowie die Analogie zu den Zellkulturversuchen spricht dafür, dass in der Lunge aufgrund des vorliegenden höheren Sauerstoffpartialdruckes auch ein höheres oxidatives Stresslevel als in den anderen Organen vorliegt. Die Reduktion des Stresslevels durch NAC verdeutlicht die physiologische Bedeutung des oxidativen Stresses für die Reparatureffizienz nach niedrigen Strahlendosen. In Leber und Niere wurde jedoch kein Effekt von NAC auf die Reparatureffizienz festgestellt. Eine weitere Verschlechterung der Reparatureffizienz dieser Organe war vermutlich, ähnlich wie nach der Bestrahlung von kultivierten Zellen mit 5 mGy, nicht möglich. Ob die DSB-Reparatureffizienz dieser Organe ebenfalls von einem bestimmten oxidativen Stresslevel abhängt, wird in einem bereits geplanten Tierexperiment mit einer Bestrahlung im mittleren Dosisbereich (20-50 mGy) untersucht werden. Dieses Experiment konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt und ausgewertet werden. Erste Hinweise auf die physiologische Relevanz für den Organismus gibt die *in vivo* Reparaturstudie mit niedrigen Fluenzen von Nickel-Ionen (Abb. 7), sowie andere *in vivo* Studien mit einer höheren Bestrahlungsdosis von 100 mGy bis 2 Gy Röntgenstrahlen (137, 159). Bei diesen Studien reparierten alle untersuchten Organe über 24 h die induzierten DSBs in gleichem Maße, weshalb eine physiologische Relevanz für den gesamten Organismus wahrscheinlicher erscheint als ein spezifisches Phänomen von Zellen der Lunge.

Interessanterweise konnte in beiden experimentellen Ansätzen die beschriebene Veränderung der Reparatureffizienz auf eine Verschiebung der mittleren Anzahl der persistierenden DSBs pro Zelle und somit auf eine Verschiebung des Grenzwertes in Abhängigkeit des vorliegenden oxidativen Stress zurückgeführt werden. Diese Schlussfolgerung ist durch eine vergleichbare DSB-Induktion zwischen behandelten und unbehandelten Zellen möglich. In H₂O₂-vorbehandelten Zellen wurden so gut wie alle strahleninduzierten DSBs und teilweise sogar spontan auftretende DSBs repariert, sodass der Grenzwert dem Level an spontan auftretenden DSBs pro Zelle entsprach. Im Gegensatz dazu stellen NAC-vorbehandelte Zellen den Reparaturprozess früher ein, wobei der Grenzwert dann entsprechend höher lag als der von unbehandelten Zellen. Dieser Aspekt verdeutlicht, wie komplex und fein reguliert die Schadensantwort der Zelle ist. Eine weitere Antwortmöglichkeit, warum eine Zelle mit einem γ H2AX-Focus diesen reparieren kann und eine andere Zelle dagegen nicht, ist die Kommunikation von den Zellen untereinander. Dieser Einflussfaktor wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht detailliert untersucht, könnte aber ebenfalls eine Rolle spielen. Zumal ROS auch eine Funktion als Botenstoffe innerhalb der Zelle sowie in der Zell-Zell-Kommunikation haben (199). Darüber hinaus deuten Ergebnisse der Reparaturstudien nach der Bestrahlung mit niedrigen Fluenzen Nickel-Ionen auf eine Kommunikation der Zellen bei der

Schadensantwort hin. Diese Art der Interaktion von nicht-bestrahlten und bestrahlten Zellen nach der Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen, welche die Analysen des Endpunktes positiv oder negativ beeinflussen, wird in der Literatur allgemein als *non-target*-Effekt bezeichnet (196, 197). Im Sinne der Risikoeinschätzung von niedrigen Strahlendosen sind gerade solche Effekte schwer zu erfassen bzw. zu bewerten.

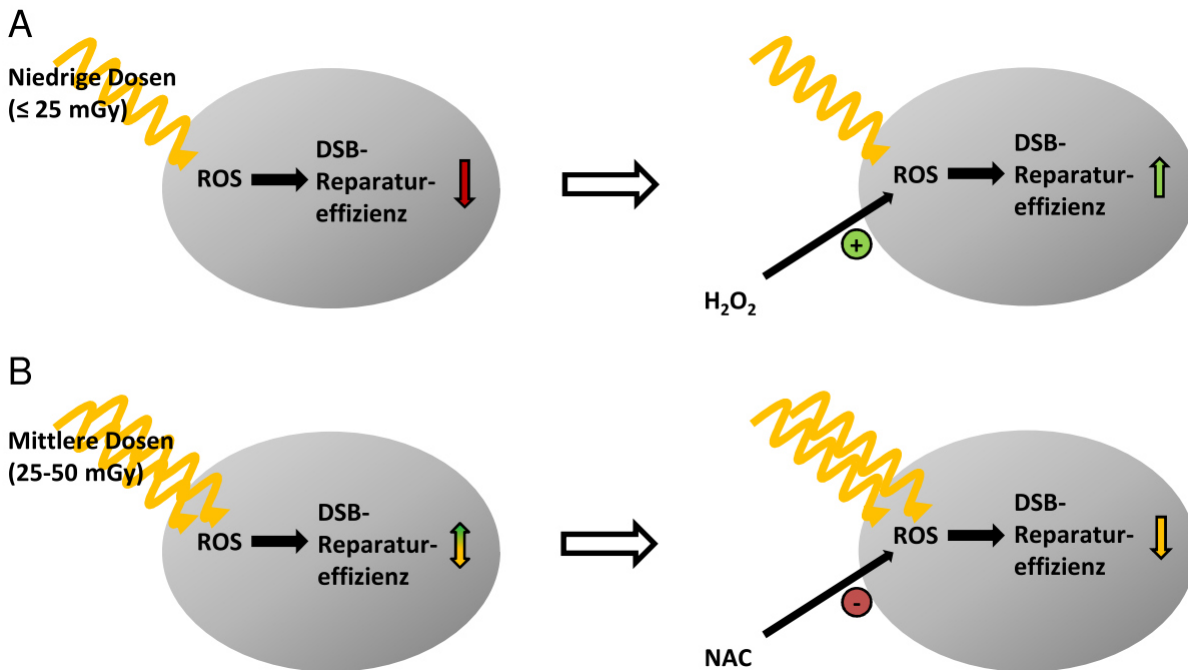


Abb. 22 Schematische Darstellung der kritischen Rolle des ROS-induzierten oxidativen Stresses in der Zelle bei der Reparatur von DSBs. Konfluente humane Fibroblasten wurden mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlen bestrahlt. Die Induktion von DSBs skalierte linear mit der applizierten Dosis, wohingegen deren Reparatur über einen Zeitraum von 24 h mit abnehmender Dosis schlechter wurde. (A) Bei einer schlechten Reparatureffizienz nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen (< 25 mGy) wurde durch die Behandlung der Zellen mit H_2O_2 vor der Bestrahlung die DSB-Reparatur in diesen Zellen stimuliert, während in nicht-behandelten Zellen viele DSBs unrepariert verblieben. Die H_2O_2 -Behandlung der Zellen verstärkt die intrazelluläre ROS-Bildung der anschließenden Bestrahlung mit niedrigen Dosen. (B) Bei einer geringfügig eingeschränkten DSB-Reparatur nach der Bestrahlung mit mittleren Dosen (25-50 mGy) führte die Behandlung der Zellen mit NAC vor der Bestrahlung zu einer Beeinträchtigung der DSB-Reparatur. In diesen Zellen verblieben mehr DSBs unrepariert als in nicht-behandelten Zellen. Die NAC-Behandlung der Zellen führte zu einer Verringerung der intrazellulären, endogen vorhandenen ROS sowie der ROS, die durch die anschließende Bestrahlung mit Röntgenstrahlen entstanden sind. (A+B) Aufgrund der gleichbleibenden Induktion von DSBs in unbehandelten und behandelten Zellen resultiert aus den unterschiedlichen mittleren Anzahlen an unrepariert verbleibenden DSBs eine Beeinflussung der Reparatureffizienz. Dies wird auf die Veränderung des ROS-induzierten oxidativen Stresses nach der Bestrahlung zurückgeführt.

Neben den konfluenten Zellen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, wurden von anderen Studien die Effekte von niedrigen Strahlendosen auf proliferierende Zellen erfasst. Problematisch bei der Analyse von proliferierenden Zellen nach der Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen ist, dass diese erfahrungsgemäß durch spontan auftretende DSBs in der S-Phase ein höheres endogenes Schadenslevel aufweisen (58-60). Dies kann den Nachweis von wenigen DSBs, die von solch niedrigen Strahlendosen induziert werden, schwieriger machen. Dennoch konnte der *LowDose*-Effekt in der Studie von Saha *et al.* für neuronale Stammzellen des sich entwickelnden Gehirns der Maus *in vivo* bestätigt werden (200). Für murine Stammzellen an der Haarwurzel wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass täglich wiederholte Bestrahlungen mit 10 mGy oder 100 mGy zu einer Akkumulation der

unreparierten DSBs führten (198). Die Untersuchung von Effekten von niedrigen Strahlendosen auf Stammzellen und Gewebe ist ein aktives Forschungsfeld, was durch große europäische Forschungsinitiativen wie RISK-IR verdeutlicht wird (201). Im Arbeitsgruppen eigenen Teilprojekt dieser Initiative wurde der *LowDose*-Effekt ebenfalls in kultivierten, embryonalen Stammzellen der Maus festgestellt (unveröffentlichte Ergebnisse). Eine andere Studie von Asaithamby *et al.* konnte den *LowDose*-Effekt in der Lebendzellmikroskopie jedoch nicht nachweisen (138). Bei dieser Analysemethode werden die Foci von Fluoreszenz-gekoppelten Proteinen in lebenden Zellen durch wiederholte Bildaufnahmen über die Reparaturzeit nachgewiesen. Dazu müssen gezielte Änderungen am Genom der Zelle vorgenommen werden, weshalb aus methodischen Gründen häufig, wie auch in dieser Studie, Tumorzelllinien verwendet werden. Die regelmäßige Bildaufnahme zur simultanen Analyse der DSB-Reparatur über die Zeit stellt jedoch einen nicht zu vernachlässigenden Stress für die Zellen dar, der vergleichbar der H₂O₂-Behandlung die DSB-Reparatur stimuliert haben könnte. Gleichermäßen könnte ein erhöhtes endogenes, oxidatives Stresslevel, wie es für viele Tumorzelllinien beschrieben ist, die DSB-Reparatur beeinflusst haben (202). Dennoch bietet die Lebendzellmikroskopie gegenüber dem klassischen γ H2AX-Foci-Assay den entscheidenden Vorteil, dass die Analyse der DSB-Reparatur in lebenden Zellen die Differenzierung zwischen spontan auftretenden und strahleninduzierten Brüchen ermöglicht. Darüber hinaus kann auch das Schicksal der Zellen mit unrepariert verbleibenden Brüchen und somit deren biologische Konsequenz untersucht werden. Durch den technologischen Fortschritt bei der gezielten Veränderung des Genoms sind für die Fortsetzung dieses Projektes ebenfalls Reparaturstudien mittels der Lebendzellmikroskopie mit Fibroblasten geplant.

5.2.1. Limitierungen bei der Übertragung des Experimentes mit kultivierten Zellen auf das Mausmodell

Insgesamt gelang es, im Mausmodell Versuchsbedingungen zu finden, die den Bedingungen der Versuche mit kultivierten Zellen entsprachen. Allerdings gab es auch Unterschiede, wie beispielsweise die unterschiedliche Versorgung der Zellen mit Sauerstoff. Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits die Analyse der DNA-Reparatur in der Lunge diskutiert, die als natürliches Analog zur Behandlung von kultivierten Zellen mit H₂O₂ verwendet wurde. Aus diesem Grund werden im folgenden zwei Unterschiede bei der NAC-Behandlung von kultivierten Zellen und Mäusen diskutiert.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Zellkultur-basierten Experimenten mit NAC und den entsprechenden Experimenten im Mausmodell lag in der jeweiligen Behandlungszeit bzw. in der Verfügbarkeit von NAC. Während die kultivierten Zellen NAC direkt über das Zellkulturmedium erhielten, musste sich NAC im Rahmen der *in vivo* Experimente zunächst im Körper der Maus

verteilen. Deshalb wurden die Mäuse über einen längeren Zeitraum mit NAC behandelt, um eine möglichst gleichbleibende Konzentration von NAC (bzw. den resultierenden Stoffwechselprodukten) zu erreichen. Da NAC eine geringe Bioverfügbarkeit von 5-10 % besitzt, kommen nur 5-10 % der ursprünglichen, oral eingenommenen NAC-Konzentration auch im Blutkreislauf und folglich in den Organen an (183, 184, 203). Dies wird auf einen ausgeprägten *First-Pass*-Effekt zurückgeführt, wobei NAC im Dünndarm bzw. in der Leber zu Cystein deacetyliert wird (192, 203, 204). Experimente mit radioaktiv markiertem NAC im Tiermodell (Ratte, Maus) zeigten, dass neben dem Gastrointestinaltrakt, auch die Leber, Niere, Milz, Blase und Lunge bereits 30 min nach der oralen Gabe von NAC eine Anreicherung der radioaktiven Substanz aufwiesen (193, 205). Darüber hinaus wurden die radioaktiv markierten Moleküle nur zu ca. 50 % innerhalb von 24 h ausgeschieden, was für eine Verstoffwechslung oder eine Rezirkulation dieser Moleküle spricht (193). Allerdings erlauben diese Experimente keine Aussagen darüber, zu welchen Anteilen NAC bzw. Cystein in den Organen vorliegt. Mittels einer Chromatographie wurde gezeigt, dass in der Leber hauptsächlich Cystein und dessen oxidierte Form Cystin vorlag, während in der Lunge noch zu $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{3}$ NAC vorlag (192). Aus Cystein kann von den Zellen der Leber, der Haut, der Niere und der Lunge das zelluläre Antioxidans Glutathion (GSH) synthetisiert werden (192, 193), wobei auch für Cystein selbst eine protektive Wirkung nach Bestrahlung in Sprague-Ratten beschrieben wurde (206). Daher wird das therapeutische Potential von NAC von einigen Studien auch der Anreicherung von Molekülen (NAC, Cystein, GSH) mit einer Sulfhydrylgruppe (-SH) zugeschrieben. Diese ist bei der antioxidativen Wirkung von NAC, Cystein und GSH die entscheidende funktionelle Gruppe (181, 184, 193, 207, 208).

Ein weiterer Unterschied zwischen den Experimenten mit kultivierten Zellen und deren Umsetzung im Mausmodell ist die Aufnahme von Cystein bzw. NAC in die Zelle. Im Gegensatz zu NAC kann Cystein im Körper aufgrund seiner bei pH 7.4 neutralen Ladung aus der Blutbahn in die Zellen diffundieren oder über den Natrium-abhängigen Alanin-Serin-Cystein-Transporter in die Zelle gelangen (209). NAC selbst ist bei diesem pH negativ geladen und kann die Zellmembran deshalb nicht passieren. Daher stellt sich die Frage, wie NAC in die kultivierten Zellen eindringen konnte. Während einige Veröffentlichungen davon ausgehen, dass NAC als Vorläufermolekül bzw. als Derivat des Cysteins ebenfalls die Membran passieren kann, könnte NAC auch durch den strahleninduzierten Schaden an der Zellmembran in die Zelle gelangen (208). Die bei der Bestrahlung von Zellen häufig auftretende Peroxidation von Lipiden verändert die Struktur und damit auch die Permeabilität der Membran, sodass NAC z.B. über eine Porenbildung in die Zelle gelangen könnte (208, 210).

Trotz der Unterschiede, die bei der Übertragung der Experimente mit NAC aus der Zellkultur auf den Modellorganismus Maus unumgänglich waren, zeigen die vorgestellten Ergebnisse im Kontext der Literatur, dass NAC oder dessen ebenfalls radio-protektiv wirkenden Metabolite in

die analysierten Zellen aufgenommen wurde (192, 193, 205, 208). Experimentell wird dies durch die verringerte Induktion von DSBs in mit 50 mM NAC behandelten Zellen sowie in den Organen der NAC-behandelten Mäuse unterstützt, die auf die Reduktion der strahleninduzierten Radikalen bzw. ROS zurückzuführen ist. Reliene *et al.* zeigte, dass eine vergleichbar vorgenommene NAC-Behandlung bei ATM^{-/-}-Mäuse zur Reduktion von oxidativen Schäden sowie zur Reduktion von Deletionen im DNA-Molekül führte (144). Allerdings wurden die Mäuse in dieser Studie nicht bestrahlt, da sie aufgrund der fehlenden Kinase ATM bereits ein höheres endogenes oxidatives Stresslevel aufwiesen (211, 212). Ebenso wurde in den Reparaturstudien, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, mit kultivierten Zellen sowie in der Lunge von Mäusen ein übereinstimmender Effekt von NAC auf die DSB-Reparatur festgestellt. Darüber hinaus wurden diese Ergebnisse indirekt auch durch den beobachteten Effekt der H₂O₂-Behandlung verifiziert, welches in den Zellen zur Bildung von ROS führt und damit den gegenteiligen Effekt zu NAC auslöst.

5.2.2. Computergestützte Quantifizierung von Foci mit "AutoFoci"

Zwei häufige Kritikpunkte an der manuellen Auswertung von Experimenten sind die Subjektivität und die mögliche Beeinflussung der Auswertung durch das erwartete Ergebnis. Eine Beeinflussung der Auswertung durch das erwartete Ergebnis wurde im Rahmen der durchgeführten Quantifizierung von DSBs durch eine Verblindung der Bilddateien bei der Auswertung von kultivierten Zellen bzw. der Objektträger bei der Auswertung von Gewebeschnitten bestmöglich ausgeschlossen. Um die Auswertung zu objektivieren, wurde in Kooperation mit N. Lengert (AG Drossel, TU Darmstadt) das Programm "AutoFoci" zur computergestützten Auszählung von Foci anhand von Einzelzellbildern entwickelt. Inzwischen sind zwar einige Programme zur Focusauszählung käuflich zu erwerben oder werden frei zugänglich zur Verfügung gestellt. Jedoch sind diese oft nicht für die Quantifizierung von Niedrigdosisexperimenten geeignet, was beispielsweise durch lange Bildverarbeitungszeiten (213) und fehlende Adjustierungsmöglichkeiten bei der Objekterkennung (214, 215) deutlich wird. Aus diesen Gründen erfüllen diese Programme nicht die speziellen Anforderungen an eine Quantifizierungsmethode im Niedrigdosis-Bereich, die durch eine hohe Anzahl auszuwertender Zellen sowie durch das niedrige Verhältnis von Foci zu unspezifischen Hintergrundobjekten bestimmt sind. "AutoFoci" hingegen ist speziell an diese Bedürfnisse für die Auswertung im Niedrigdosis-Bereich angepasst. Die Objekterkennung beruht, übereinstimmend mit der manuellen Focuserkennung, auf der Kolo-kalisation der Fluoreszenzsignale der beiden DSB-Marker γ H2AX und 53BP1. Darüber hinaus wird die relative Signalintensität eines Focus zur Signalintensität der gesamten Zelle und der lokalen Varianz der Signalintensität im Focus bewertet. Diese Kriterien gewährleisten die Zuverlässigkeit der Focuserkennung sowie deren

Selektivität gegenüber unspezifischen Signalen und werden auch in ähnlicher Form von anderen Programmen verwendet (216-218). Ein zusätzlicher, exemplarischer Abgleich der Focusauszählung von einigen Zellen mit einer manuellen Focusauszählung gewährleistet, dass Einflüsse durch eine zwischen den Experimenten, bzw. zwischen den experimentellen Bedingungen, leicht variierenden Färbequalität der Zellen über eine Adjustierung der Grenzwerte bei der Objekterkennung minimiert werden. Bei der Adjustierung der Grenzwerte wird der Name der ausgewerteten Datei nicht angezeigt, sodass auch bei diesem manuellen Abgleich eine Beeinflussung der Auswertung durch das erwartete Ergebnis ausgeschlossen wird. "AutoFoci" ermöglicht die Objekterkennung in beispielsweise 5.000 Zellen innerhalb von 30-60 s und benötigt auch nur einen geringe Zeitspanne zu deren manuellen Adjustierung, was diese Methode zeitlich sehr effizient macht.

Die Daten, die von N. Lengert mit der Auswertung über "AutoFoci" generiert wurden, validieren die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten manuellen Quantifizierung von Foci. So konnte der *LowDose*-Effekt nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen sowohl mit der manuellen als auch mit der computergestützten Zählmethode nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde auch die verbesserte DSB-Reparatur in H₂O₂-behandelten Zellen nach Bestrahlung mit 12 mGy bzw. 25 mGy sowie die verschlechterte DSB-Reparatur in NAC-behandelten Zellen nach Bestrahlung mit 25 mGy bzw. 50 mGy statistisch signifikant nachgewiesen. Eine entsprechende Anwendung zur Foci-Analyse in Zellen im Gewebeverband ist prinzipiell denkbar. Allerdings erfordert dies eine Anpassung des Programms, da die Zellen im Gewebe dicht nebeneinander vorliegen und Gewebe im Gegensatz zu kultivierten Zellen eine hohe Autofluoreszenz aufweist, was die zuverlässige Objekterkennung schwieriger macht. Aus diesen Gründen wurde "AutoFoci" bisher nur für die Focusanalyse in kultivierten Zellen eingesetzt und wird in Zukunft die effiziente Quantifizierung von Foci im Rahmen weiterer Niedrigdosis-Studien ermöglichen. Die objektive Auszählung der Foci in mehreren tausend Zellen reduziert den statistischen Fehler durch natürliche Schwankungen innerhalb der Zellpopulation und ermöglicht so auch den Nachweis von kleinen Effekten nach Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen.

5.2.3. Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der DSB-Reparatur

Die im Rahmen dieses Teilprojektes vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass das oxidative Stresslevel wichtig für die effiziente Reparatur nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen war. Daher stellte sich nun die Frage, wie der oxidative Stress oder die resultierenden zellulären Schäden mit der hier analysierten DSB-Reparatureffizienz in Verbindung steht. Eine naheliegende Verknüpfung könnten die hauptverantwortlichen Kinasen der DSB-Reparatur aus der *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase protein family*, DNA-PK und ATM, darstellen.

Für beide Kinasen wurden, abgesehen von ihren Aufgaben bei der DSB-Reparatur weitere Funktionen beschrieben. Einige im Kontext dieser Arbeit relevante Funktionen werden im folgenden Abschnitt näher betrachtet und diskutiert:

DNA-PKcs ist die katalytische Untereinheit der Kinase DNA-PK (Holoenzym aus DNA-PKcs und dem Heterodimer aus Ku70/80), welches ein Schlüsselprotein bei der Reparatur von DSBs über das NHEJ ist. Im Zusammenhang mit oxidativen Stress liegen für DNA-PKcs Hinweise auf eine Interaktion mit dem zentralen Proteinkomplex der Basenexisionsreparatur (BER) aus APE1 (*Apurinic/apyrimidinic endonuclease*), DNA Polymerase beta und XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) vor (219). Die BER ist ein DNA-Reparaturweg, der geschädigte DNA-Basen erkennt und entfernt, um Mutationen aufgrund von Basenfehlpaarungen zu vermeiden. Neben DNA-PKcs kann auch ATM über Chk2 (*Checkpoint kinase 2*) XRCC1 phosphorylieren und somit die BER aktivieren (220). Eine Verknüpfung der BER mit der DSB-Reparatur erscheint im Kontext der 20fach höheren Induktion von Basenschäden im Verhältnis zur Induktion eines DSBs sinnvoll (49, 128). Für die im Rahmen dieser Studie beschriebene, stimulierende Rolle des oxidativen Stresses auf die DSB-Reparatureffizienz bei niedrigen Strahlendosen bleibt allerdings unklar, ob relativ schnell zu reparierende Basenschäden, die DSB-Reparatur (24 h nach der Bestrahlung gemessen) noch beeinflussen können. Andererseits wird in der Literatur teilweise eine langanhaltende, strahleninduzierte Stresssituation der Zelle beschrieben, weshalb die weitere Entstehung von sekundären Schäden noch viele Stunden nach der Bestrahlung nicht völlig ausgeschlossen werden kann (221). Abgesehen von ihrer Funktion im Zellkern, wurde die DNA-PK an sogenannten *Lipid microdomains* nachgewiesen, die sich nach Bestrahlung ausbilden und als Plattform für die strukturelle (Neu-)Organisation Membran-ständiger Proteine und Rezeptoren in der Membran dienen (210, 222). Für diese Plattformen wurde eine Beteiligung an der Signalamplifikation bei oxidativem Stress in der Zelle nachgewiesen; die genaue Rolle der DNA-PK an diesen Plattformen ist jedoch noch unklar (210, 223).

ATM liegt in der Zelle als inaktives Dimer vor und wird beim Auftreten eines DSBs durch die Autophosphorylierung am Serin-1981 aktiviert, wonach es dann als Monomer vorliegt. ATM phosphoryliert verschiedene Proteine, die für die Schadensantwort der Zelle nach einer Strahlenexposition wichtig sind. Dazu gehören beispielsweise Proteine der DNA-Reparatur, Proteine zur Einleitung eines Zellzyklusarrestes, um der Zelle genügend Zeit für die Reparaturprozesse zu geben oder Proteine zur Einleitung der Apoptose, falls der Strahlenschaden zu schwerwiegend ist (224-226). In einer kürzlich erschienenen Studie konnte die direkte Aktivierung von ATM durch oxidativen Stress sowie eine regulierende Rolle von ATM in der Stressantwort der Zelle nachgewiesen werden (227, 228). Bei oxidativen Stress, der im Rahmen dieser Studie ebenfalls durch H₂O₂ induziert wurde, kommt es durch die Oxidation des Cystein-2291 zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den zwei als Dimer vorliegenden

ATM-Molekülen (227). Als aktiviertes, kovalent verbundenes Dimer ist ATM an der Regulierung der anti-oxidativen Kapazität der Zelle beteiligt, indem es über den Pentose-Phosphatweg die Herstellung des Kofaktors NADPH (Nicotinamidadeninukleotidphosphat) der Glutathion-Reduktase stimuliert (229). Über die Glutathion-Reduktase kann oxidiertes Glutathion (GSSG) zu zwei Molekülen Glutathion (GSH) reduziert werden, welche der Zelle dann wieder als Antioxidant zur Verfügung stehen. Darüber hinaus können über die Stimulierung dieses Signalweges und die aktivierende Phosphorylierung von Hsp27 (*Heat shock protein 27*) auch neue Nukleotide für die DNA-Reparatur synthetisiert werden (229). Desweiteren regt die ATM-vermittelte Aktivierung des Signalweges von LKB1 (*Liver kinase B1*) - AMPK (*AMP-activated protein kinase*) - TSC2 (*Tuberous sclerosis complex 2*) - mTORC1 (*Mammalian target of rapamycin complex 1*) die Autophagie in der Zelle an, sodass beschädigte Proteine oder Organelle recycelt werden (230-232). Damit verbindet ATM die zentralen Signalwege der zellulären Homöostase, der Proteinsynthese und des Zellwachstums mit der DNA-Schadensantwort. Die neu entdeckten Funktionen von ATM bei der zellulären Antwort auf oxidativen Stress helfen auch einige der Symptome von Menschen mit der Krankheit *Ataxia teleangiectasia* besser zu verstehen, die auf eine homozygote Mutation im ATM-codierendem Gen zurückzuführen ist. Durch eine alleinige Rolle von ATM in der DNA-Schadensantwort waren einige Symptome der erkrankten Menschen wie beispielsweise die Neurodegeneration nicht vollkommen erklärbar. Derzeit ist allerdings in vielen Fällen noch unklar, welche der bereits beschriebenen Aufgaben von ATM als Monomer oder von ATM als Dimer ausgeführt werden, da diese nach einer Schadensinduktion häufig gleichzeitig auftreten (233, 234).

Analog zum Aktivierungsmechanismus von ATM werden durch oxidativen Stress auch Redox-sensitive Transkriptionsfaktoren, wie NRF-2 aktiviert. In Gegenwart von oxidativen Stress wird NRF-2 durch die Oxidation von Cysteinen von seinem Bindungspartner Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) freigesetzt (61, 62). Daraufhin transloziert NRF-2 in den Zellkern und bewirkt die Genexpression von zahlreichen Proteinen und Enzymen der antioxidativen Zellantwort, die über ein sogenanntes AR-Element (*antioxidant response element*) verfügen (235) (236). Zu den zahlreichen Target-Genen von NRF-2 die inzwischen bekannt sind, gehören unter anderem Enzyme zur Synthese des Antioxidans Glutathion oder der Superoxiddismutase (236). Darüber hinaus findet sich auch hier eine Verknüpfung zu DNA-Reparaturprozessen. Die Transkription der Glykosylase Ogg1 (*8-oxoguanine DNA glycosylase*), welche die oxidierte Base 8-Oxoguanin im Rahmen der BER erkennt und entfernt, und von DSB-Reparaturproteinen wie 53BP1 werden von NRF-2 reguliert (237-239). Studien zur Aktivierung von NRF-2 zeigten, dass NRF-2 nach Bestrahlung von Keap-1 freigesetzt wurde und in den Zellkern transloziert, was durch eine Behandlung der Zellen mit NAC reduziert wurde (240). In Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen zeigt diese Studie von Lee *et al.*, dass NAC das oxidative Stresslevel und damit die antioxidative Zellantwort beeinflusst.

Allein diese nähere Betrachtung ausgewählter Funktionen von DNA-PK, ATM und NRF-2 und wie diese mit deren Aufgaben bei der DSB-Reparatur verzahnt sind, zeigt wie komplex die Antwort der Zellen auf oxidativen Stress ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine eingeschränkte DSB-Reparatur von Zellen nach deren Bestrahlung mit niedrigen Dosen sowie durch eine Vorbehandlung der Zellen mit NAC festgestellt. Dies könnte möglicherweise aus einer unzureichenden Aktivierung von redox-sensitiven Molekülen, wie ATM, resultieren. Aufgrund der Sequenzhomologien innerhalb der beteiligten Proteindomäne zwischen ATM und DNA-PKcs bzw. der Kinase mTOR (ebenfalls ein Mitglied der Proteinfamilie) ist auch bei diesen Kinasen eine vergleichbare Aktivierung durch oxidativen Stress denkbar (224, 241-243). Zwei kürzlich veröffentlichte Studien beschreiben eine regulatorische Rolle von DNA-PK auf die Aktivität von ATM nach der Induktion von oxidativen Stress sowie direkt am DSB (244, 245). Daher wäre auch eine fehlende regulatorische Funktion der Kinasen denkbar. Studien zur Aufklärung eines neuen Mechanismus werden in der Regel mit hohen Strahlendosen durchgeführt, um eine möglichst homogene und eindeutige Schadensantwort zu bekommen. Aufgrund der festgestellten Unterschiede bei der Reparatur nach der Strahlenexposition mit niedrigen vs. hohen Dosen sollen in nachfolgenden Studien die Rolle und Funktion von ATM und DNA-PKcs nach der Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen näher charakterisiert werden.

5.2.4. Abschließende Zusammenfassung der Ergebnisse

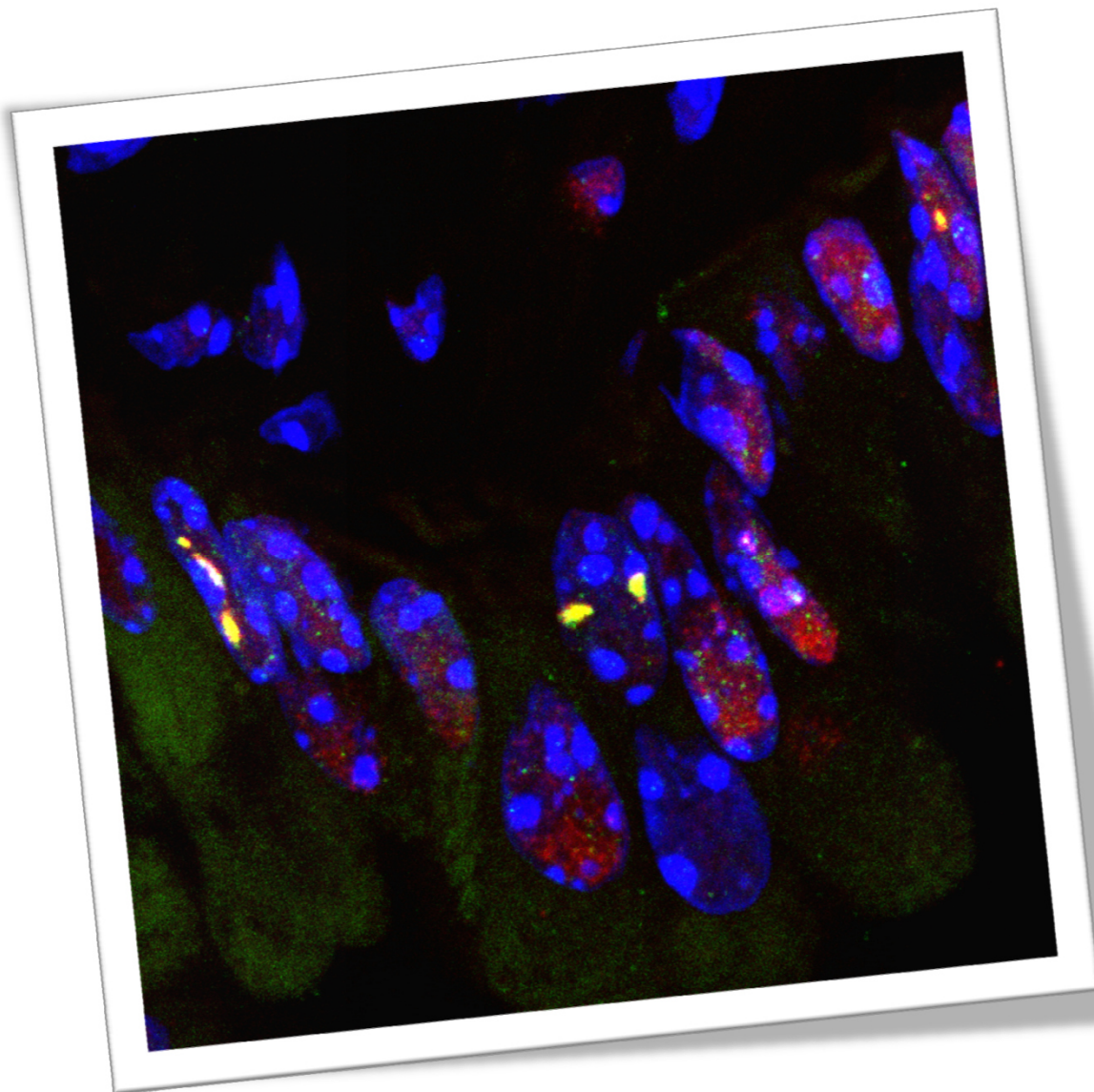
In diesem Teilprojekt wurden vertiefende Studien zum *LowDose*-Effekt durchgeführt und so neue Erkenntnisse über die kritische Rolle des strahlen-induzierten oxidativen Stresses auf die DSB-Reparatur gewonnen. Darauf aufbauend und im Kontext der aktuellen Literatur wurde die Hypothese zum *LowDose*-Effekt, die in den vorangegangenen Studien hauptsächlich auf die unterschiedlichen Induktionen von DNA-Schäden durch niedrige vs. hohe Strahlendosen zurückgeführt wurde, erweitert (126, 137). Die Detektion eines Grenzwertes, bis zu dem die Reparaturprozesse unabhängig von der initialen Strahlendosis ablaufen, impliziert eine gewisse Rolle der Anzahl der DSBs in der einzelnen Zelle. Wenn aber aufgrund einer geringen DSB-Induktion oder den fortschreitenden DSB-Reparatur ein DSB nur noch vereinzelt auftritt, scheinen interessanterweise andere Faktoren ausschlaggebend zu sein. Dies wurde durch die festgestellte Abhängigkeit des Grenzwertes vom oxidativen Stresslevel bestätigt. So führte eine Behandlung der Zellen mit H₂O₂ zu einem niedrigerem Grenzwert und damit zu einer verbesserten Reparatureffizienz. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung mit NAC zu einem höheren Grenzwert und so zu einer verschlechterten Reparatureffizienz. Im Bezug auf die Reparatureffizienz liegt daher eine Dosis-modifizierende Wirkung durch die H₂O₂- bzw. NAC-Behandlung vor. Eine naheliegende Verknüpfung zwischen dem oxidativen Stress und der

DSB-Reparatur könnten DNA-PK und ATM darstellen. Ihre Rolle beim *LowDose*-Effekt wird in zukünftigen Studien untersucht werden.

In der diagnostischen Anwendung können Strahlendosen bei bestimmten Untersuchungen nicht reduziert werden, weshalb der Einsatz von strahlenprotektiven Substanzen aufgrund der Abschwächung des initialen Strahlenschadens bei einer Strahlenexposition diskutiert werden. Die einzige derzeit zugelassene strahlenprotektive Substanz ist Amifostin, deren Einnahme jedoch erhebliche Nebenwirkungen hat und daher wahrscheinlich für eine Routineuntersuchung mit niedrigen Strahlenexpositionen nicht gerechtfertigt ist (246). Für die Anwendung in der klinischen Routine testeten Kufner *et al.* und Brand *et al.* daher das allgemein gut verträgliche NAC sowie weitere Antioxidantien wie Vitamin C (179, 247). NAC, welches mit weiteren antioxidativen Substanzen kombiniert eingesetzt wurde, wurde oral von gesunden Probanden eingenommen. Nach Bestrahlung des Blutes (*ex vivo*) der Probanden konnte über den Foci-Assay eine Reduktion der DSB-Induktion um 50 % in Lymphozyten nachgewiesen werden (247). Allerdings wirkte sich der Antioxidantmix negativ auf die Überlebensrate von Fibroblasten aus, die vergleichbar zu den Lymphozyten behandelt wurden (247). Dies ist in Übereinstimmung mit den vorgestellten Ergebnissen zur verschlechterten DSB-Reparatur im Rahmen dieser Arbeit ein kritischer Aspekt bei der Behandlung mit NAC zur Reduktion des Strahlenschadens. Ob ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen dem Persistieren von unreparierten DSBs und dem verringertem Zellüberleben besteht, werden Studien mit der Lebendzellmikroskopie zeigen. Diese erlauben die simultane Analyse der DSB-Reparatur der Zellen sowie die Analyse ihres Schicksals. Dennoch unterstreicht die Studie, wie auch die vorliegende Arbeit, dass ein bestimmter zellulärer Stress sowie die nachfolgende Signalweiterleitung wichtig für die Zelle ist und daher deren exogene Modulation durch Antioxidantien nicht ungefährlich für die Zelle sein kann. Neben dem molekularen Ansatz zur Erforschung der grundlegenden Mechanismen sind zur Risikoabschätzung von niedrigen Strahlendosen entsprechende epidemiologische Studien unabdingbar. Einige Studien zum Risiko von CT-Untersuchungen wurden bereits veröffentlicht, allerdings sind die untersuchten Kohorten zum derzeitigen Zeitpunkt relativ klein, und die Studien unterscheiden sich stark in ihrem Design. Im Laufe der nächsten Jahre ist hier mit weiteren Ergebnissen zu rechnen, die gemeinsam mit den molekularen Studien zur Verbesserung der Risikoabschätzung im Niedrigdosisbereich beitragen können.

6. Biodosimetrie:

*Direkte Messung der DNA-Schäden nach der
Exposition mit Radon*



Radon ist ein natürlich auftretendes radioaktives Edelgas, welches mit ca. 1,1 mSv pro Jahr wesentlich zur natürlichen Strahlenexposition der Bevölkerung in Deutschland beiträgt (1). Das stabilste Radon-Isotop Radon-222 (zukünftig Radon genannt) entsteht innerhalb der Zerfallsreihe des Uranisotops Uran-238 und wird daher aus allen uranhaltigen Gesteinen der Erdkruste sowie aus uranhaltigen (Bau-) Materialien freigesetzt. Aufgrund seiner Edelgaseigenschaften ist Radon relativ reaktionsträge und entweicht über Risse und Spalten aus dem Erdreich. Radon und drei seiner Tochternuklide emittieren beim Zerfall energiereiche α -Teilchen, die die Zellen des Körpers schädigt, wenn dieser Zerfall im Körper auftritt. Epidemiologische Studien stellten einen Zusammenhang zwischen der Radonkonzentration in Wohnräumen und dem Auftreten von Lungenkrebs fest (2, 8). Neben dem Krebsrisiko ist auch die Induktion von nicht-malignen Effekten durchaus denkbar (248-250). Damit stellen Radon und dessen Zerfallsprodukte ein Risiko für beruflich strahlenexponierte Personen beispielsweise im Uran- und Erz-Bergbau sowie für Einwohner von unzureichend isolierten Gebäuden, in welchen sich Radon anreichern kann, dar.

Trotz dieser schwer abzuschätzenden, gesundheitlichen Risiken werden beispielsweise Rheuma-Patienten seit Jahrzehnten mit Radon therapeutisch behandelt. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass eine Radon-Behandlung durch Bäder und Einfahrten in sogenannte Heilstollen eine längerfristige, entzündungshemmende und schmerzstillende Wirkung hat. Diese erlaubt es sogar auf andere, in Bezug auf Nebenwirkungen risikoreiche Medikamente zu verzichten (251-253). Um das Therapie-assoziierte, gesundheitliche Risiko einer Radonexposition besser abzuschätzen, sollte in diesem Teilprojekt ein biologischer Ansatz zur Bewertung der Strahlenexposition des Organismus gewählt werden. Dabei macht man sich zunutze, dass die durch die Einwirkung von α -Teilchen auf lebende Zellen entstehenden DNA-Schäden nicht nur für die Ausprägung der Strahlenwirkung relevant sind, sondern auch zur biodosimetrischen Bewertung der Strahlenexposition herangezogen werden können. Für die Biodosimetrie wurde die Maus als Modellorganismus verwendet, um die Aufnahme von Radon über die Atemluft sowie die Verteilung von Radon im Organismus nachzustellen. Die separate Analyse der DNA-Schäden in Zellen verschiedener Organe erlaubt Rückschlüsse auf deren Strahlenexposition sowie der zugrundeliegenden Verteilung von Radon im Körper. Ein detaillierteres Verständnis der Verteilung von Radon im Körper und der damit verbundenen biologischen Effekte ist für die medizinische Anwendung sowie allgemein für den Strahlenschutz von besonderer Wichtigkeit.

6.1. Ergebnisse

6.1.1. Inhomogene Dosisdeposition durch Radon im Körper

Für die biodosimetrische Analyse der Verteilung von Radon im Körper und des Therapie-assoziierten Risikos einer Radonexposition wurden Mäuse in einer von A. Maier (GSI) speziell angefertigten Kammer Radon-haltiger Luft ausgesetzt (147). Entsprechend der zur therapeutischen Behandlung eingesetzten Radonexposition in Heilstollen erfolgte die Exposition der Mäuse jeweils über 1 h. Die verwendete Radon-Aktivitätskonzentrationen von 440 kBq/m^3 entsprach der mittleren Aktivitätskonzentration von insgesamt zehn Behandlungen im Heilstollen von Bad Gastein (Österreich), die im Rahmen einer Therapie vorgenommen werden. Bei dieser Radon-Aktivitätskonzentration wurde das Auftreten eines α -Zerfalls und dessen lokal begrenzte Dosisdeposition als sehr seltenes Ereignis eingestuft, weshalb eine Dosis im Milli-Gray-Bereich erwartet wurde. Zum sensitiven Nachweis von DSBs wurde aus diesem Grund der γH2AX -Foci-Assay eingesetzt (126, 128). Um die ermittelte Anzahl der Foci pro Zelle später zur Bewertung der Strahlenexposition in eine Dosis umzurechnen, wurden Mäuse mit 10 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt. Eine unbestrahlte Kontrollgruppe von Mäusen wurde entsprechend behandelt und diente der Analyse der spontan auftretenden DSBs im jeweiligen Gewebe. Für die Biodosimetrie wurde die Induktion von DSBs 15 min nach der einstündigen Radonexposition bzw. nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen in G0/G1-Zellen verschiedener Organe untersucht. Die Gewebeschnitten von Lunge, Niere, Herz, Leber, und Knochen wurden gegen die etablierten DSB-Marker γH2AX und 53BP1 gefärbt und die resultierenden Foci in den Bronchialepithelzellen der Lunge, den Tubuluszellen der Niere, den längs angeschnittenen Zellen des Herzmuskels, den Hepatozyten der Leber sowie den Zellen der Knochenhaut ausgezählt.

Die Quantifizierung der Foci in Zellen von Radon-exponierten Mäusen wurde insgesamt von drei Personen durchgeführt. Dies diente einerseits zur Verifikation der Ergebnisse zur DSB-Induktion und andererseits wurden ausgehend von dieser Analyse weitere Zeitpunkte oder andere Aspekte untersucht. Alle Personen beobachteten bei der Quantifizierung der Foci in den analysierten Organen von Radon-exponierten Mäusen neben einzeln vorliegenden Foci auch kurze Ionenspuren, die aus mehreren Foci bestanden (Abb. 23A). Diese entstehen, wenn Radon oder dessen Tochternuklide zerfallen und die emittierten α -Partikel die Zellen durchdringen. Die Foci innerhalb der Ionenspuren schienen häufig größer und Signal-intensiver zu sein, was auf geclusterte DSBs innerhalb der Ionenspur eines α -Teilchens hindeutet und bereits von anderen Studien beschrieben wurde (52, 114, 119, 120, 143, 160, 161).

Eine erste Quantifizierung der Foci wurde von R. Schäfer (im folgendem Person #1) im Rahmen ihrer Bachelorarbeit vorgenommen. Sie quantifizierte die Foci in Zellen der Lunge, der Niere, dem Herz, der Leber und dem Knochen von zwei Radon-exponierten Mäusen sowie von einer

unbestrahlten Maus aus der Kontrollgruppe. (Eine dritte Radon-exponierte Maus sowie weitere Kontrollmäuse standen zum Zeitpunkt der Bachelorarbeit von R. Schäfer noch nicht zur Verfügung.) In den analysierten Organen der unbestrahlten Maus wurde eine sehr niedrige Anzahl von 0,02-0,05 spontan auftretenden Foci pro Zelle festgestellt (Abb. 23B). Dieses Ergebnis bestätigte die Eignung der Maus zur Analyse von geringen Anzahlen an DSBs, wie sie durch niedrige Strahlendosen induziert werden. Im Vergleich zu den bisher vorgestellten Ergebnissen (vgl. Abb. 20) variierten die jeweils bestimmten Absolutzahlen der spontan auftretenden Foci pro Zelle geringfügig, was auf die subjektive Erkennung und Erfassung eines Focus bei der Quantifizierung zurückzuführen ist. Die Quantifizierung der Foci in den Organen von Radon-exponierten Mäusen zeigte einen vergleichbaren strahleninduzierten Anstieg von 0,02-0,03 Foci pro Zelle zwischen den Organen Herz, Niere, Leber und Knochen. Dies bestätigte, dass sich Radon durch die freie Diffusion im Körper verteilt und daher die Organe gleichermaßen schädigt (Abb. 23C, #1). Eine präferentielle Anreicherung von Radon am Knochen, wie sie aufgrund der therapeutischen Anwendung naheliegend war, konnte in der Analyse nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Lunge durch die Strahlenexposition eine deutlich erhöhte mittlere Anzahl von 0,1 Foci pro Zelle (SD 0,005). Eine höhere Lungengewebe-spezifische Ausbildung von Foci bei gleicher Dosisdeposition wurde aufgrund von vorangegangenen Experimenten mit Röntgenstrahlen sowie Nickel-Ionen (vgl. Abb. 20C und 21B) ausgeschlossen. Deshalb musste die überraschend hohe strahleninduzierte Anzahl an Foci pro Zelle auf den Zerfall von Radon und dessen Tochternukliden zurückzuführen sein. Ein Effekt der wahrscheinlich ausschließlich zur Dosisdeposition in der Lunge beiträgt, ist die Schädigung der Zellen durch Aerosol-gebundene Tochternuklide. Diese entstehen, wenn Radon in der Luft zerfällt und sich dessen Tochternuklide an kleinste Partikel und Wassertröpfchen der Luft heften. Werden diese Tochternuklid-beladenen Aerosole eingeatmet und adhären, ebenso wie andere Partikel, an den Flimmerhärchen der Epithelzellen der Lunge, schädigt der weitere Zerfall der Tochternuklide die umliegenden Zellen.

Dieses Ergebnis wurde durch die Quantifizierung der Foci in den Organen von drei Radon-exponierten Mäusen von B. Basso (im folgenden Person #2, Abb. 23C) sowie von L. Hintz (im folgenden Person #3, Abb. 23C) bestätigt. Beide Personen stellten in unabhängig voneinander durchgeführte Analysen eine signifikant höhere Focus-Induktion in der Lunge im Vergleich zu anderen analysierten Organen fest. Dies verifiziert die Ergebnisse der ersten Analyse und deren Interpretation. Ein direkter Vergleich der Absolutwerte der verschiedenen Personen zeigte, dass diese für die Quantifizierung der Foci in Zellen der Niere und des Herzens (0,02-0,03 Foci pro Zelle) sehr ähnlich waren, aber für die Quantifizierung der Foci in der Lunge (~0,10 vs. ~0,07 vs. ~0,05 Foci pro Zelle) stärker voneinander abwichen (Abb. 23C). Bei der Beurteilung dieser Diskrepanz sind mehrere Aspekte zu berücksichtigen: Neben der subjektiven Erkennung und Erfassung von Foci quantifizierten die Personen #2 und #3 die Foci im Gewebe

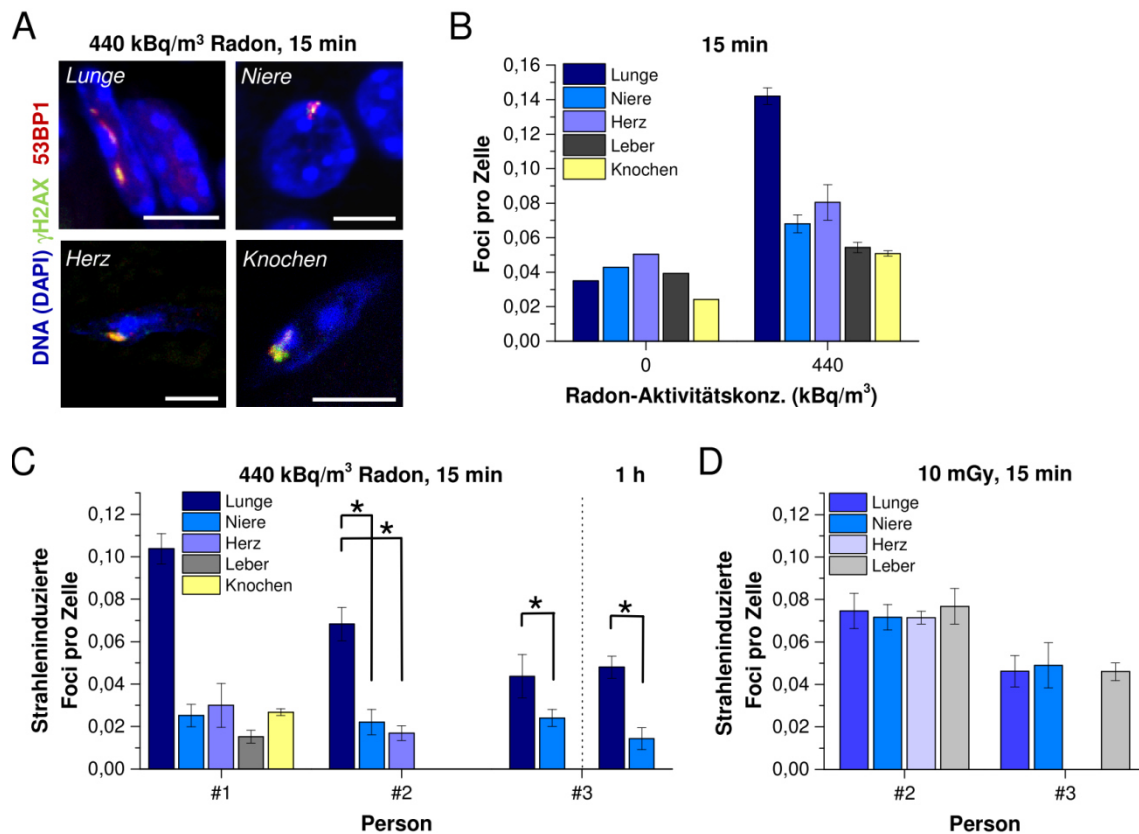


Abb. 23: Die Exposition mit Radon führt zu einer erhöhten DSB-Induktion in der Lunge. Adulte C57BL/6 Mäuse wurden über 1 h mit 440 kBq/m³ Radon-222 (A-C) oder 10 mGy Röntgenstrahlen (D) bestrahlt und nach 15 min (bzw. 1 h) zur Organentnahme getötet. Die Organe wurden entnommen, fixiert und die Gewebeschnitte gegen γ H2AX und 53BP1 gefärbt. Eine unbestrahlte Kontrollgruppe von Mäusen wurde entsprechend behandelt. (A) Repräsentative Aufnahme (Maximumintensitätsprojektion) einer Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX und 53BP1 in Zellen verschiedener Organe nach Radonexposition. Die Aufnahmen von Lunge und Niere wurden von L. Hintz angefertigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. (B) Quantifizierung der 53BP1-Foci nach Bestrahlung mit Radon. Dargestellt ist die Auszählung der Foci in Zellen einer unbestrahlten Maus oder der Mittelwert von zwei bestrahlten Mäusen sowie deren Standardabweichung. Pro Maus bzw. Organ wurden Foci in min. 1500 Zellen aus unterschiedlichen Färbungen ausgezählt. (C+D) Quantifizierung der strahleninduzierten 53BP1-Foci nach Bestrahlung mit Radon (C) oder Röntgenstrahlen (D) durch verschiedene Personen. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei bestrahlten Mäusen (abzüglich der unbestrahlten Kontrolle aus B) sowie deren Standardabweichung (für #1) oder der Mittelwert von jeweils drei Mäusen (abzüglich 0,02-0,04 Foci pro Zelle (#2) bzw. 0,05-0,06 Foci pro Zelle (#3) von 3-5 unbestrahlten Mäusen) und deren Standardfehler (für #2, #3). Pro Maus bzw. Organ wurden Foci in min. 1500 Zellen aus unterschiedlichen Färbungen ausgezählt. Da keiner bestrahlten Maus eine Kontrollmaus zugewiesen wurde, wurde der Standardfehler über die Fehlerfortpflanzung nach Gauß berechnet. Die statistische Signifikanz wurde über die Konfidenzintervalle überprüft (*; $p < 0,05$). (B-D) Die Quantifizierung der Foci wurde von R. Schäfer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (B, Person #1), B. Basso (Person #2) sowie von L. Hintz im Rahmen ihrer Masterarbeit (Person #3) vorgenommen (254, 255).

verblindet, was einen hohen Zeitaufwand bedeutet und deshalb im Rahmen einer Bachelorarbeit (Person #1) nicht möglich war. Die verblindete Analyse minimiert das Risiko, dass die Auswertung durch das erwartete Ergebnis beeinflusst wird. Darüber hinaus ist die Bestimmung der Zellanzahl ein weiterer Aspekt. Diese könnte für die eng und teilweise überlappend vorliegenden Bronchialepithelzellen der Lunge schwieriger sein als für die einzeln vorliegenden Tubuluszellen in der Niere (vgl. Abb. 20A). Die subjektive Erfassung der Foci spiegelte sich auch in der parallel durchgeführten Quantifizierung der 53BP1-Foci in den Organen von Mäusen wider, die mit 10 mGy Röntgenstrahlen bestrahlt wurden. Diese wird zur späteren Berechnung einer Dosis dienen, um die Strahlenexposition der Radon-exponierten Organe zu bewerten (Abb. 23D).

Alle analysierten Organe zeigten 15 min nach der Bestrahlung eine vergleichbare Focus-Induktion (Abb. 23D). Konsistent mit der Quantifizierung der 53BP1-Foci in Organen von Radon-exponierten Mäusen lag die bestimmte Focus-Induktion von Person #2 höher als von Person #3. (Ein vergleichbare Auswertung von Person #1 liegt leider nicht vor. Allerdings erhielt sie im Rahmen einer exemplarischen Zählung ähnliche Werte zu den bereits im Teilprojekt 2 dieser Arbeit vorgestellten Zählungen (vgl. Abb. 20A).) Die vergleichbare Induktion von verschiedenen Organen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen stimmt sehr gut mit den Ergebnissen des ersten Teilprojektes dieser Arbeit sowie mit früheren Studien überein (137, 159). Daher wurde für die Berechnung der Dosis von Radon-exponierten Geweben auch in Knochenzellen eine vergleichbare DSB-Induktion angenommen. Anhand des bekannten Verhältnisses zwischen der mittleren Anzahl der Foci pro Zelle und der applizierten Dosis für Röntgenstrahlen wurde anhand der detektierten Foci die unbekannte Dosis in Radon-exponierten Geweben abgeschätzt. Für die analysierten Organe wurde eine mittlere Röntgen-äquivalente Dosis von 4 mGy in Leber, Knochen, Niere und Herz abgeschätzt sowie 11 mGy für die Lunge.

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob die detektierten DNA-Schäden nach der Beendigung der Radonexposition weiter ansteigen. Dieses Ansteigen der DNA-Schäden wäre aufgrund der im Körper verbleibenden Tochternuklide mit relativ kurzen Halbwertszeiten von wenigen Minuten, bis zur Entstehung des Isotopes Blei-210 denkbar (vgl. Abb. 2). Mit einer Halbwertszeit von 22 Jahren ist Blei-210 für biologische Prozesse als weitestgehend stabil zu betrachten. Im Gegensatz zu dessen festen Tochternukliden, verlässt das gasförmige Radon relativ schnell nach Beendigung der Radonexposition den Körper über die Atmung und kann daher bei der Untersuchung dieses Aspektes wahrscheinlich vernachlässigt werden (256). Um dies zu untersuchen, wurden drei Mäuse mit 440 kBq/m³ Radon bestrahlt und die Foci 1 h nach Beendigung der Radonexposition in Zellen der Lunge und Niere quantifiziert. Übereinstimmend mit der vorangegangenen Analyse wurde für die Lunge eine signifikant höhere mittlere Anzahl an strahleninduzierten Foci pro Zelle (0,048 Foci pro Zelle, SE 0,005) nachgewiesen als in der Niere (0,014 Foci pro Zelle, SE 0,005; Abb. 23C, #3). Dennoch wurde keine wesentliche Veränderung der mittleren Anzahl an strahleninduzierten Foci pro Zelle im Vergleich zu den Werten nach 15 min und damit der zugrundeliegenden deponierten Dosis festgestellt. Dies könnte auf ein Gleichgewicht zwischen den neu entstehenden DSBs und der unmittelbar nach der Schadensinduktion beginnenden Reparatur der Schäden hinweisen. Alternativ könnte die zusätzliche Schadensinduktion kaum nachweisbar sein und die bestehenden DSBs nur langsam repariert werden. Obwohl eine langsame Reparatur von α -Teilchen-induzierten DSBs beschrieben wurde, erscheint ein vorliegendes Gleichgewicht wahrscheinlicher, da nicht alle DSBs strukturell komplex sind bzw. durch α -Teilchen induziert wurden (vgl. Abb. 2). Neben den

α -Teilchen können DSBs auch durch den Zerfall von Pb-214 und Bi-214 und den dabei emittierten hochenergetischen γ -Strahlen und Elektronen (β^- -Zerfall) induziert werden.

Zusammengefasst wurde mittels der Foci-Analyse erstmals eine inhomogene Focus-Induktion bzw. Dosisdeposition durch Radon im Körper biologisch nachgewiesen. In allen analysierten Organen, abgesehen von der Lunge, wurde eine vergleichbare Anzahl strahleninduzierter Foci detektiert, die einer Röntgen-äquivalenten Dosis von ca. 4 mGy entspricht. Diese ist wahrscheinlich auf den Zerfall von frei im Körper diffundierendem Radon sowie den über das Blut transportierten Tochternukliden zurückzuführen (256-259). In der Lunge wurde eine erhöhte Anzahl strahleninduzierter Foci pro Zelle und damit auch eine entsprechend höhere Röntgen-äquivalente Dosis von ca. 11 mGy detektiert. Diese setzt sich aus der DSB-Induktion durch den Zerfall von eingeatmeten bzw. frei im Körper diffundierendem Radon sowie der zusätzlichen DSB-Induktion von an Aerosolen anhaftenden Tochternukliden des Radons zusammen. Obwohl es gelang über die Kalibrierung mit Röntgenstrahlen aus den detektierten Foci eine Dosis zu berechnen, kann diese die Dosisdeposition von Radon möglicherweise nicht ausreichend abbilden. Diese Fragestellung wurde in den folgenden Analysen im nächsten Kapitel aufgegriffen und entsprechende Experimente zur Entwicklung von Korrekturfaktoren wurden durchgeführt.

6.1.2. Entwicklung von Dosis-Korrekturfaktoren zur Bewertung der Strahlenexposition

Im nächsten Schritt sollte die Röntgen-äquivalente Dosis zur Bewertung der Strahlenexposition in eine α -Teilchen-Dosis umgerechnet werden. Die Entwicklung von Korrekturfaktoren war notwendig, da sich die Dosisdeposition zwischen Röntgenstrahlen und α -Teilchen unterscheidet. So weisen durch α -Zerfälle induzierte Ionenspuren typischerweise geclusterte DSBs auf, wobei mehrere DSBs in einem Focussignal vorliegen können (51-54). Bei der Quantifizierung der Foci wurden Ionenspuren mit großen und signal-intensiveren Foci zwar nur relativ selten beobachtet, aber deren Größe und Signalintensität deutet auf das Vorliegen von geclusterten DSBs hin. Aus diesem Grund kann die Röntgen-äquivalente Dosis möglicherweise immer nur die minimal vorliegende Dosis repräsentieren. Die Entwicklung der Korrekturfaktoren wurde von L. Hintz (Person #3) vorgenommen, weshalb in diesem Abschnitt zunächst ausschließlich mit ihren Ergebnissen gerechnet wird.

Korrektur der Dosis aufgrund von geclusterten DSBs

Für die Etablierung eines Korrekturfaktors für das Vorliegen von geclusterten DSBs wurde zunächst der Anteil der Foci bestimmt, die innerhalb von Ionenspuren vorlagen. Dazu wurde bei der Quantifizierung der Foci zwischen einzeln auftretenden Foci und den Foci aus Ionenspuren

differenziert. Das Vorliegen einer Ionenspur wurde über ungewöhnlich große und unförmige Foci oder mindestens drei Foci in räumlicher Nähe definiert. Diese differenzierte Quantifizierung der Foci bestätigte den visuellen Eindruck, dass die meisten Foci einzeln auftraten und nur jeder 6. Focus in der Lunge bzw. jeder 5. Focus in der Niere innerhalb einer Ionenspur vorlag (Abb. 24 A). Dies resultierte aus den nur selten detektierten α -Zerfall-induzierten Ionenspuren. Obwohl α -Teilchen beim durchdringen der Zellen nicht immer eine eindeutig erkennbare Ionenspur hinterlassen, was zu einer Unterschätzung ihres Anteils bei der Schadensinduktion führen würde, könnten auch die beim Zerfall von Blei-214 und Bismuth-214 ausgesendete hochenergetische γ -Strahlen und Elektronen (β^- -Zerfall) zur Schadensinduktion beitragen. In der Lunge, die im Vergleich zur Niere eine höhere Focus-Anzahl aufwies, wurden durchschnittlich 2 Ionenspuren pro 1000 Zellen (SE 0,49) erfasst (Abb. 24B). Dass Ionenspuren nach der Exposition von Zellen mit Radon nur selten zu beobachten sind, wurde auch in der Studie von Wang *et al.* und Ding *et al.* beschrieben (260, 261). In dieser Studie mit peripheren Blutzellen sowie Knochenmarkszellen der Ratte wurden nach einer *ex vivo* Exposition der Zellen mit 4,5 mGy Radon 4 Ionenspuren pro 1000 Zellen detektiert (260). Die höhere Anzahl der Ionenspuren pro mGy im Vergleich zu den hier vorgestellten Ergebnissen könnte auf die unterschiedlichen Expositionsbedingungen (*ex vivo* vs. *in vivo*) sowie die von Wang *et al.* durchgeführte Dosimetrie für die Radonexposition mit CR-39 zurückzuführen sein. Diese ist für kurze Exposition mit Radon im Milli-Gray-Bereich aufgrund der geringen Trefferanzahl stark fehlerbehaftet und wurde daher auch nicht für die vorgestellten Experimente verwendet (262).

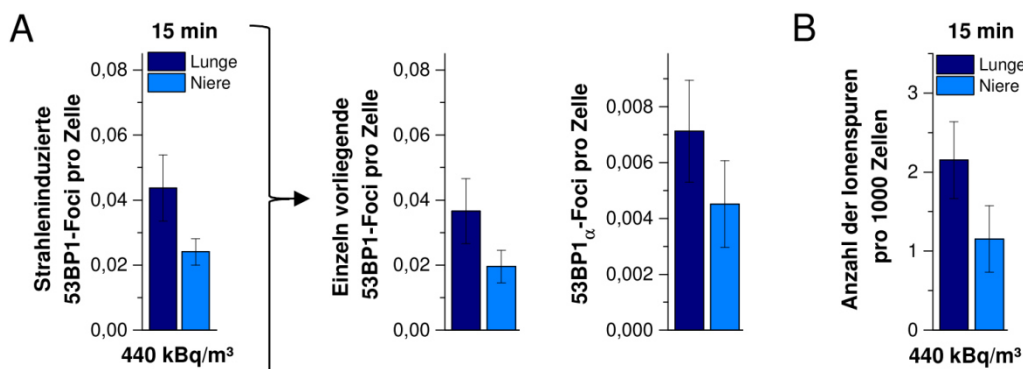


Abb. 24: Ionenspuren aus großen und signalintensiven 53BP1-Foci treten nur selten auf. Adulte C57BL/6 Mäuse wurden über 1 h mit 440 kBq/m³ Radon-222 bestrahlt und nach 15 min zur Organentnahme getötet. Die Organe wurden entnommen, fixiert und die Gewebeschnitte gegen γ H2AX und 53BP1 gefärbt. Eine unbestrahlte Kontrollgruppe von Mäusen wurde entsprechend behandelt. (A+B) Quantifizierung der 53BP1-Foci (A) bzw. der Ionenspuren (B) nach Bestrahlung mit Radon. Bei der Analyse der Foci wurden einzeln vorliegende oder in einer Ionenspur vorliegende Foci (große und unförmige Foci oder min. 3 Foci in räumlicher Nähe; in der Abbildung als 53BP1 α bezeichnet) separat erfasst (mittlerer und rechter Graph). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von drei bestrahlten Mäusen (abzüglich 0,05-0,06 Foci pro Zelle von fünf unbestrahlten Mäusen) sowie dessen Standardfehler. Pro Maus bzw. Organ wurden Foci (A) bzw. die Ionenspuren (B) in min. 1500 Zellen aus unterschiedlichen Färbungen ausgezählt. Da keiner bestrahlten Maus eine Kontrollmaus zugewiesen wurde, wurde der dargestellte Standardfehler über die Fehlerfortpflanzung nach Gauß berechnet. Die dargestellten Daten wurden von L. Hintz im Rahmen ihrer Masterarbeit erhoben (254).

Um die Anzahl der DSBs in Foci innerhalb der Ionenspur zu bestimmen, wurde im Lungengewebe die Focusgröße sowie deren mittlere Signalintensität gemessen. Diese

Messungen bestätigten den visuellen Eindruck, dass die Foci innerhalb der Ionenspur signifikant größer (durchschnittliche Fläche von $0,76 \mu\text{m}^2$ vs. $0,37 \mu\text{m}^2$ (SE 0,029 bzw. 0,13)) waren und eine signifikant höhere Signalintensität (durchschnittlicher Grauwert von 133 vs. 65 (SE 5 bzw. 8)) besaßen als die einzelnen 53BP1-Foci in Radon-exponiertem Gewebe (Abb. 25A+B). Da die Größe und die Intensität auf das Vorliegen von geclusterten DSBs innerhalb der Ionenspur schließen lässt (52, 114, 119, 120, 143, 160, 161), wurde für die Berechnung wie viele DSBs in einem Focus vorliegen, die mittlere Signalintensität mit der Größe des Focus multipliziert ($I \times F$). Als zusätzlicher Vergleich wurde diese Analyse auch für Foci im Lungengewebe nach der Bestrahlung mit 10 mGy Röntgenstrahlen durchgeführt. Für Foci innerhalb der Ionenspuren war das bestimmte Produkt ($I \times F$) viermal höher als für Foci aus unbestrahltem oder mit 10 mGy Röntgenstrahlen bestrahltem Lungengewebe (Abb. 25C). Demnach liegen in einem Focus innerhalb der Ionenspur durchschnittlich 4 DSBs. Korrigiert man die Anzahl der DSBs in Foci der Ionenspur entsprechend, wird in der Lunge eine Röntgen-äquivalente Dosis von 14 mGy deponiert. Wird für die Foci in der Niere das gleiche Komplexität angenommen, wird eine Röntgen-äquivalente Dosis von 7,6 mGy deponiert. Eine vergleichbare Komplexität anzunehmen, ist aufgrund der gleichen Art der Schadensinduktion und der vergleichbaren Zellkerngröße plausibel.

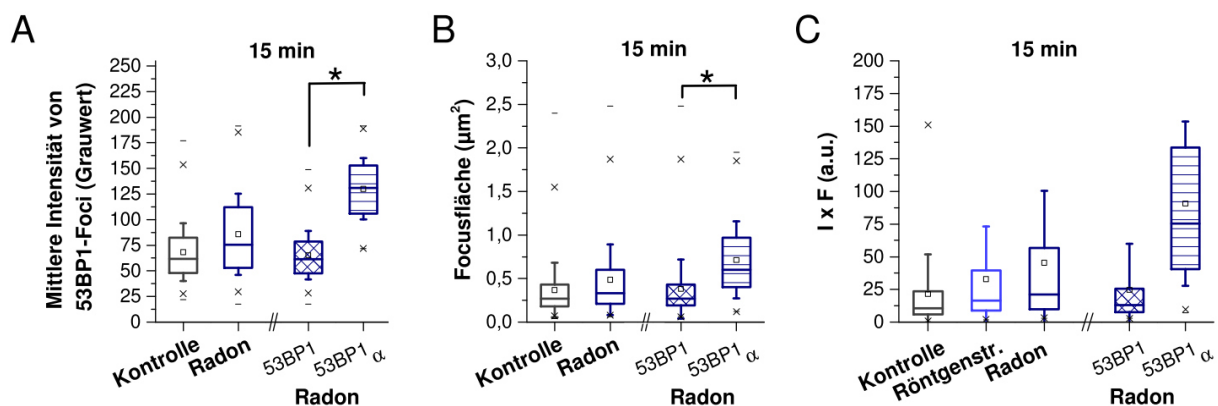


Abb. 25: 53BP1-Foci innerhalb der Ionenspur repräsentieren mehrere geclusterte DSBs. Adulte C57BL/6 Mäuse wurden über 1 h mit 440 kBq/m^3 Radon-222 (A-C) bzw. mit 10 mGy Röntgenstrahlen (C) bestrahlt und nach 15 min zur Organentnahme getötet. Die Organe wurden entnommen, fixiert und die Gewebeschnitte gegen γH2AX und 53BP1 gefärbt. Eine unbestrahlte Kontrollgruppe von Mäusen wurde entsprechend behandelt. (A+B) Analyse der mittleren Intensität und der Größe von 53BP1-Foci. Dargestellt ist die Verteilung der mittleren Signalintensität (A) bzw. der Focusfläche (B) in Boxplots von Messungen der Foci in Zellen des Bronchialepithels (Lunge) von drei Mäusen sowie deren Standardabweichung (Whisker). Pro Maus wurden die Größe und die mittlere Signalintensität anhand von hochauflösenden Stapelaufnahmen von je 35 53BP1- und 75 53BP1 α -Foci bestimmt. Zum Vergleich wurden auch die Signalintensität und Größe von jeweils 70 Foci von fünf unbestrahlten Mäusen bestimmt. (C) Analyse des Clustering von 53BP1 α -Foci. Dargestellt ist die Verteilung des Produktes aus der Focusfläche (aus B) und der mittleren Signalintensität (aus A; abzüglich der Signalintensität in den Zellen) in Boxplots von Messungen der Foci in Zellen des Bronchialepithels (Lunge) sowie deren Standardabweichung (Whisker). Zum Vergleich wurde dieser Parameter auch für jeweils 100 Foci von drei mit 10 mGy Röntgenstrahlung bestrahlten Mäusen bestimmt. (A-C) Die Boxen umfassen 25-75 % der Daten, die "x" unter und über der Box 98 % der Daten. Die statistische Signifikanz wurde anhand der Mittelwerte der einzelnen Mäuse über einen einseitigen t-Test überprüft (*; $p < 0,05$). Die dargestellten Daten wurden von L. Hintz im Rahmen ihrer Dissertation erhoben.

Korrektur für die unterschiedliche Art der Energiedeposition von Röntgenstrahlen und α -Teilchen

Eine weitere Korrektur wurde aufgrund der unterschiedlichen Energiedeposition von Photonen und α -Teilchen vorgenommen, da diese auch bei gleicher Dosis möglicherweise unterschiedlich viele DSBs induzieren können. Durch diese weitere Korrektur kann aus der bestimmten Röntgen-äquivalenten Dosis eine α -Teilchen Dosis berechnet werden. Um dies experimentell zu untersuchen, wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF-Zellen) mit 100 mGy Röntgenstrahlen bzw. α -Teilchen einer Americium-241-Quelle bestrahlt. Analog zur Quantifizierung der Foci im Gewebe wurden nur 53BP1-Foci in MEF-Zellen erfasst, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befanden. Zellen in der G2- oder S-Phase wurden über die Färbung gegen CyclinB und den Nachweis des während der S-Phase inkorporierten Nukleotidanalogs EdU ausgeschlossen (Abb. 26A). Nach der Bestrahlung konnte durch die Färbung von 53BP1 das typische Schadensmuster von Röntgenstrahlen bzw. α -Teilchen beobachtet werden. Während Röntgenstrahlen ihre Energie homogen in der bestrahlten Zelle deponieren, wird diese von α -Teilchen entlang ihrer Bahnspur durch die durchdrungene Zelle deponiert (vgl. Kapitel 1.2).

Vorläufige Daten des ersten Experimentes mit MEF-Zellen zeigten, dass unbestrahlte G1-Zellen durchschnittlich 0,23 Foci pro Zelle aufwiesen. Bei der Quantifizierung der Foci 15 min nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen wurden durchschnittlich 2 DSBs pro Zelle festgestellt, nach der Bestrahlung mit α -Teilchen 1,7 DSBs pro Zelle. Diese Angabe ist für α -Teilchen möglicherweise irreführend, da von α -Teilchen durchdrungene Zellen in der Regel 3-4 DSBs aufweisen (Abb. 26B) und deshalb entsprechend mehr Zellen ohne DSBs vorliegen. Eine differenzierte Quantifizierung zwischen einzeln vorliegenden Foci und Foci innerhalb einer Ionenspur nach der Bestrahlung mit α -Teilchen zeigte, dass jeder 1,4te strahleninduzierte Focus (80 % der Foci) innerhalb einer Ionenspur vorlag. Dieser höhere Anteil der Foci, die innerhalb einer Ionenspur vorliegen, war im Vergleich zum Gewebe zu erwarten und ist auf die reine Bestrahlung mit α -Partikeln zurückzuführen. Darüber hinaus trägt der größere Zellkern von kultivierten Zellen im Vergleich zu Zellen im Gewebeverband möglicherweise zur Erkennung der Foci innerhalb von Ionenspuren bei. Aus diesem Grund wurde in den MEF-Zellen auch die Anzahl der DSBs, die in Foci innerhalb der Ionenspur vorliegen, bestimmt. Entsprechend der Analyse im Gewebe wurde für alle Foci die Größe sowie deren Signalintensität gemessen und diese multipliziert. Während der Analyse fiel auf, dass die Foci aus unbestrahlten Zellen im Vergleich zu bestrahlten Zellen teilweise sehr groß waren. Dabei könnte es sich um sogenannte *53BP1 nuclear bodies* handeln, die replikationsstress assoziierte Schädigungen der DNA markieren (263). Dennoch war das bestimmte Produkt (IxF) für Foci innerhalb der Ionenspuren 1,5 mal höher als für die gemittelten Foci von unbestrahlten und mit Röntgenstrahlen bestrahlten MEF-Zellen (Abb. 26C). Daher liegen in einem Focus innerhalb der Ionenspur

durchschnittlich 1,5 DSBs. Korrigiert man die Anzahl der DSBs entsprechend, liegen nach einer Bestrahlung mit 100 mGy α -Teilchen durchschnittlich 2,4 DSBs pro Zelle vor. Folglich werden bei gleicher applizierter Dosis durch α -Teilchen 18 % mehr DSBs induziert (Faktor von 1,18). Aufgrund der beobachteten *53BP1 nuclear bodies* ist es jedoch wahrscheinlich, dass der ermittelte Faktor das *Clustering* von DSBs unterschätzt. Um solche Effekte in zukünftigen Experimenten auszuschließen, könnten diese Experimente mit konfluenten Zellen durchgeführt werden oder lediglich die Foci von Zellen als Vergleich heranziehen, die mit Röntgenstrahlen bestrahlt wurden. Für dieses Experiment würde dieses Vorgehen zu durchschnittlich 1,8 DSBs pro Focus innerhalb einer Ionenspur und damit zu einer Anzahl von 2,6 DSBs pro Zelle nach der Bestrahlung mit α -Teilchen führen.

Mit dem ermittelten Korrekturfaktor kann die Röntgen-äquivalente Dosis in eine Dosis durch α -Teilchen über den bestimmten Faktor von 1,18 umgerechnet werden. In der Lunge eine Dosis von ca. 17 mGy deponiert und in der Niere bei vorausgesetzter gleicher Anzahl von DSBs pro Focus eine Dosis von 8 mGy (basierend auf dem Mittelwert von Person #3). Da bei den anderen beiden Personen bei der Quantifizierung der Foci nach der Radonexposition niedrigere Werte für die Niere festgestellt wurden, wurde die Dosis erneut aus den gemittelten Werten aller Auswertungen bestimmt. Für diese Berechnung wird für alle analysierten Organe der gleiche Anteil der Foci innerhalb von Ionenspuren und deren vergleichbare Komplexität angenommen. Daraus resultiert eine gemittelte Dosis in der Lunge von 19 mGy, während in Niere, Herz, Leber und Knochen eine mittlere Dosis von 6 mGy vorliegt. Wenn man nun davon ausgeht, dass der Anteil der Dosisdeposition und damit die Focus-Induktion durch den Zerfall von frei im Körper diffundierendem Radon für alle Organe gleich ist, wird bei der Exposition der Mäusen mit 440 kBq/m³ Radon ca. zweidrittel der Schädigung der Lunge durch den Zerfall von Aerosolen-angehefteten Tochternukliden verursacht. Diese experimentellen Ergebnisse unterstützen die allgemeine Ansicht, dass die gesundheitliche Gefährdung durch eine chronische Radon-Exposition weniger vom Radon selbst als von seinen kurzlebigen radioaktiven Zerfallsprodukten ausgeht (2, 3).

Aufgrund der starken Abhängigkeit der vorgenommenen Dosiskorrektur von der Anzahl der geclusterten DSBs pro Focus innerhalb der Ionenspur soll dieser Korrekturfaktor im Rahmen von zukünftigen Experimenten mit einem anderen Ansatz überprüft werden. Eine vielversprechende Möglichkeit wäre der Nachweis des Proteinheterodimers aus KU70/80. Das Heterodimer von KU70/80 liegt nur an der Bruchstelle der DNA vor, weshalb es in der Immunfluoreszenz viel kleinere Signale aufweist als γ H2AX und 53BP1, die über mehrere Megabasenpaare um den Bruch vorliegen (71, 87). Diese Färbung wird zur Zeit in kultivierten Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen sowie α -Teilchen etabliert und soll anschließend auch im Gewebe angewendet werden.

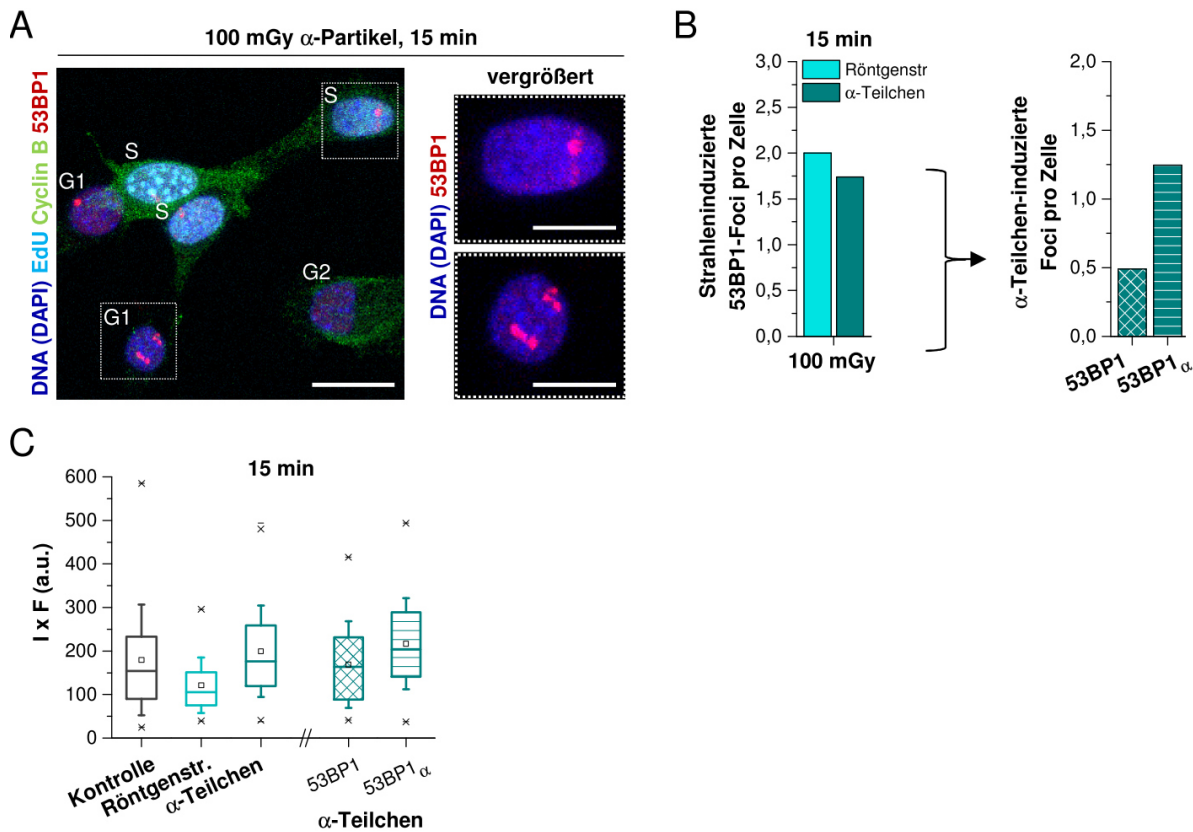


Abb. 26: Foci in Ionenspuren treten nach der Bestrahlung von MEF-Zellen mit α -Partikeln häufig auf und repräsentieren geclusterte DSBs. MEF-Zellen wurden in Multiwellplatten mit einem Mylarfolienboden kultiviert. 30 min vor der Bestrahlung wurde EdU zugegeben, um S-Phase Zellen zu markieren. Die Zellen wurden mit 100 mGy Röntgenstrahlen oder α -Partikel einer Americium-241-Quelle bestrahlt und nach 15 min fixiert. Die Zellen wurden gegen Cyclin B und 53BP1 gefärbt und in die DNA eingebautes EdU nachgewiesen. Unbestrahlte Zellen wurden entsprechend behandelt und dienen als Kontrolle. (A) Repräsentative Aufnahme (Maximumintensitätsprojektion) einer Immunfluoreszenzfärbung gegen 53BP1 in MEF-Zellen nach Bestrahlung. Der Nachweis von EdU in S-Phase-Zellen und die Färbung gegen Cyclin B in S und G2-Phase-Zellen ermöglicht die Identifizierung von G1-Phase-Zellen, die diese Signale nicht zeigen. Die Aufnahmen wurden von L. Hintz angefertigt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm bzw. in der vergrößerten Darstellung 10 μm . (B) Quantifizierung der 53BP1-Foci in MEF-Zellen nach Bestrahlung. Bei der Analyse der Foci wurden einzeln vorliegende oder in einer Ionenspur vorliegende Foci (große und unförmige Foci oder min. 3 Foci in räumlicher Nähe; als 53BP1 α bezeichnet) separat erfasst (rechter Graph). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 60 Zellen eines Experimentes (abzüglich 0,23 Foci pro Zelle von unbestrahlten Zellen). (C) Analyse des Clustering von 53BP1 α -Foci. Dargestellt ist die Verteilung des Produktes aus der Focusfläche und der mittleren Signalintensität (abzüglich der Signalintensität in den Zellen) in Boxplots von Messungen der Foci in MEF-Zellen sowie deren Standardabweichung (Whisker). Zum Vergleich wurde dieser Parameter auch für Foci von unbestrahlten und mit Röntgenstrahlen bestrahlten MEF-Zellen bestimmt. Die Boxen umfassen 25-75 % der Daten, die "x" unter und über der Box 98 % der Daten. Die Messungen von 50 Foci in unbestrahlten Zellen und min. 100 Foci in bestrahlten Zellen wurden anhand von hochauflösenden Stapelaufnahmen durchgeführt. Die dargestellten Daten wurden von L. Hintz im Rahmen ihrer Dissertation erhoben.

6.1.3. Die Aerosolkonzentration als kritischer Faktor bei der Schädigung der Lunge

Wegen der überraschend hohen Schadensinduktion in der Lunge, welche vermutlich zu zwei Dritteln auf die Aerosol-gebundenen Tochternuklide zurückzuführen ist, wurde im nächsten Schritt die Focus-Ausbildung im Mausegewebe nach einer Exposition mit 44 kBq/m³ Radon quantifiziert. Neben der biodosimetrischen Analyse der Schadensinduktion sollte dieses Experiment zeigen,

ob die Kapazität der Aerosole für die Bindung der Tochternuklide begrenzt ist und bei der Exposition mit 440 kBq/m^3 Radon möglicherweise bereits gesättigt war. Wäre dies der Fall, hätte man folglich die durch Tochternuklide in der Lunge deponierte Dosis nach der Exposition mit 440 kBq/m^3 Radon noch unterschätzt. Allgemeiner betrachtet würde dies bedeuten, dass die Aerosolkonzentration bei der therapeutischen Radonexposition ein entscheidender Faktor bei der Dosisdeposition in der Lunge ist.

Für die Analyse wurden Mäuse in einer speziellen Kammer über 1 h Radon-haltiger Luft ausgesetzt (147). Die verwendete Radon-Aktivitätskonzentrationen von 44 kBq/m^3 entsprach der mittleren Aktivitätskonzentration wie sie im Heilstollen von Bad Gastein (Österreich) vorliegt. Die Induktion von DSBs wurde 15 min nach der einstündigen Radonexposition untersucht, wozu ebenfalls γH2AX und 53BP1 als DSB-Marker verwendet wurden. Eine unbestrahlte Kontrollgruppe wurde entsprechend behandelt und diente der Analyse der spontan auftretenden DSBs im jeweiligen Gewebe. Die 53BP1-Foci wurden in den Bronchialepithelzellen der Lunge, den Tubuluszellen der Niere und den Hepatozyten der Leber ausgezählt. Dabei wurden neben einzeln vorliegenden Foci selten auch kurze Ionenspuren der α -Partikel beobachtet (vgl. Abb. 23A). Diese Foci erschienen teilweise größer und Signal-intensiver zu sein, was auf geclusterte DSBs innerhalb der Ionenspur eines α -Teilchens hindeutet und durch die Messung der Focusgröße und dessen Intensität experimentell bestätigt wurde.

Erstaunlicherweise wurde in Zellen der Lunge ein strahleninduzierter Anstieg der mittleren Anzahl um 0,02 53BP1-Foci pro Zelle (SE 0,013; $p=0,072$) festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen der Niere und Leber keinen strahleninduzierten Anstieg der mittleren Anzahl an 53BP1-Foci im Vergleich zu unbestrahlten Tieren (Abb. 27A). Im Vergleich zur Focus-Induktion in der Lunge von Mäusen nach der Exposition mit 440 kBq/m^3 war diese lediglich ungefähr zweimal niedriger (Abb. 27B). Dies deutet auf eine nicht-lineare Schädigung in der Lunge durch die Exposition von Mäusen mit 44 und 440 kBq/m^3 Radon hin. Aufgrund der Variation der mittleren Anzahl von Foci pro Zelle zwischen den Mäusen kann der bestimmte Faktor innerhalb von $2 \pm 1,4$ liegen. Auch wenn statistisch mit einer Wahrscheinlichkeit von 7,2 % eine lineare Schadensinduktion nicht völlig ausgeschlossen werden kann, deutet dies darauf hin, dass die Aerosole bei der Exposition mit 440 kBq/m^3 Radon gesättigt waren. Folglich wurde die ermittelte Dosis durch diesen Effekt unterschätzt. Ab wann die Aerosole gesättigt werden, soll mit einer physikalischen Messung in Kooperation mit A. Maier (GSI) ermittelt werden. Dazu werden die Aerosole an einem Glasfaserfilter aus der Radon-haltigen Luft abgeschieden und die Zerfälle von Blei-214 und Bismuth-214 mittels der γ -Spektroskopie gemessen.

Wenn man nun davon ausgeht, dass der Anteil der Dosisdeposition und damit die Focus-Induktion durch den Zerfall von frei im Körper diffundierendem Radon für alle Organe gleich ist, wird bei der Exposition der Mäusen mit 44 kBq/m^3 Radon die gesamte Schädigung der Lunge

durch den Zerfall von Aerosolen-angehefteten Tochternukliden verursacht. Entsprechend der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Bestimmung und Korrektur der Dosis wird in der Lunge eine Dosis von ca. 8 mGy deponiert. Dies bedeutet, dass bei jedem Aufenthalt im Heilstollen bei gleichen Rahmenbedingungen, wie beispielsweise der Aerosolkonzentration, eine mittlere Dosis von 8 mGy in der Lunge appliziert wird. Dies unterstützt die allgemeine Ansicht, dass die gesundheitliche Gefährdung durch eine chronische Radon-Exposition weniger vom Radon selbst als von seinen kurzlebigen radioaktiven Zerfallsprodukten ausgeht (2, 3). Darüber hinaus verdeutlichen diese Ergebnisse, dass Aerosole einen kritischen Faktor bei der Schädigung der Lunge darstellen.

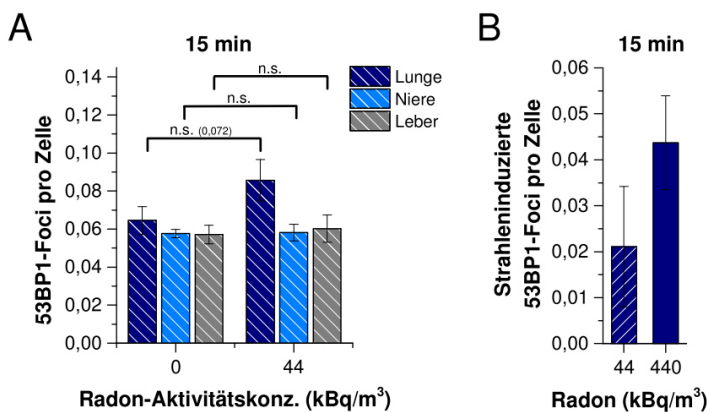


Abb. 27: Aerosolen-anhaftende Tochternuklide des Radons verursachen die hohe Schädigung in der Lunge. Adulte C57BL/6 Mäuse wurden über 1 h mit 44 kBq/m³ Radon-222 und nach 15 min zur Organentnahme getötet. Die Organe wurden entnommen, fixiert und die Gewebeschnitte gegen γ H2AX und 53BP1 gefärbt. Eine unbestrahlte Kontrollgruppe von Mäusen wurde entsprechend behandelt. (A+B) Quantifizierung der 53BP1-Foci nach Radonexposition. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von fünf unbestrahlten oder drei bestrahlten Mäusen (A) bzw. der Mittelwert von drei bestrahlten Mäusen (abzüglich 0,05-0,06 Foci pro Zelle von fünf unbestrahlten Mäusen) sowie deren Standardfehler. Pro Maus wurden die Foci in min. 7500 Zellen der Lunge bzw. min. 2000 Zellen der Niere oder Leber aus unterschiedlichen Färbungen verblindet ausgezählt. Die statistische Signifikanz wurde mittels einem einseitigem t-Test überprüft (n.s.: nicht signifikant). Die dargestellten Daten wurden von L. Hintz im Rahmen ihrer Masterarbeit sowie ihrer Dissertation erhoben (254). (B) Die dargestellten Mittelwerte der strahleninduzierten Foci pro Zelle durch eine Exposition mit 440 kBq/m³ Radon entsprechen den in Abb. 23C (Person #3) gezeigten Daten.

6.1.4. Langsame Reparatur von Radon-induzierten DSBs

Neben der Biodosimetrie, die die Verteilung von Radon im Körper aufzeigen sollte, wurde auch die Reparatur der induzierten Brüche untersucht. Diese Studien sollten die Beurteilung des genetischen Risikos einer Exposition unterstützen, die im Rahmen des Verbundprojektes GREWIS primär mittels chromosomaler Studien vorgenommen wird. Komplexe oder geclusterte Brüche, wie sie durch α -Teilchen induziert werden, sind aufgrund der räumlichen Nähe von verschiedensten DNA-Schäden für die Zelle nur schwer zu reparieren und können leicht zum Verlust von genetischer Information sowie stabilen Veränderungen im Genom (wie zum Beispiel Translokationen) führen. Gegenüber chromosomalen Studien hat der verwendete γ H2AX-Assay

eine höhere Sensitivität bei der Analyse der Reparatur der DSBs, jedoch ermöglichte dieser nicht die Untersuchung der Entstehung von stabilen Veränderungen im Genom.

Zur Beurteilung des genetischen Risikos wurden die Mäuse in einer von A. Maier (GSI) speziell angefertigten Kammer über 1 h Radon-haltiger Luft ausgesetzt (147). Die verwendete Radon-Aktivitätskonzentration von 440 kBq/m³ entsprach der Aktivitätskonzentration von insgesamt zehn Einfahrten in den Heilstollen, die im Rahmen einer Therapie vorgenommen werden. Die Mäuse wurden 15 min, 24 h und 7 d nach Expositionsende zur Organentnahme getötet. Eine unbestrahlte Kontrollgruppe wurde entsprechend behandelt und diente der Analyse der spontan auftretenden DSBs im jeweiligen Gewebe. Die Gewebeschnitte von Lunge, Niere und Herz wurden gegen 53BP1 gefärbt und die resultierenden Foci in den Bronchialepithelzellen der Lunge, den Tubuluszellen der Niere und den längsangeschnittenen Zellen des Herzmuskels ausgezählt.

Die Quantifizierung der 53BP1-Foci zeigte für alle Organe eine Abnahme der 53BP1-Foci über die analysierte Reparaturzeit von 7 Tagen (Abb. 28A+B). Dennoch wurde in Zellen der Lunge und des Herzens über eine Reparaturzeit von 24 h nur ca. 50 % der induzierten DSBs repariert. In der Niere wurde eine geringe Veränderung in der mittleren Anzahl der Foci pro Zelle detektiert, sodass hier anscheinend kaum induzierte Schäden repariert wurden. Die schlechte Reparatureffizienz der DSBs der analysierten Organe kann auf das Vorliegen von komplexen Brüchen nach der Radonexposition zurückgeführt werden und wurde bereits für kultivierte Zellen nach der Bestrahlung mit α -Teilchen oder Schwerionen beschrieben (51-54). Diese schwierige Reparatur der komplexen oder geclusterten Brüche und das assoziierte Risiko für den Verlust von genetischer Information, beispielsweise durch eine starke Prozessierung der Bruchenden, macht α -Teilchen im Bezug auf die Strahlenwirkung effektiver und damit gefährlicher als beispielsweise Röntgenstrahlen. Neben der langsamen DSB-Reparatur kann auch eine über den Expositionszeitraum andauernde Schadensinduktion durch im Körper verbleibende Tochternukliden und deren weiteren Zerfällen nicht völlig ausgeschlossen werden. Entsprechende Experimente, bei denen die Foci 1 h nach Beendigung der Radonexposition quantifiziert wurden, zeigten weder einen wesentlichen Anstieg noch eine wesentliche Abnahme der Foci (vgl. Abb. 23C). Weshalb zu diesem Zeitpunkt ein Gleichgewicht zwischen beginnenden Reparaturprozessen und der anhaltenden Schadensinduktion angenommen wurde. Im Gegensatz dazu, zeigte die Studie von Ding *et al.* einen Anstieg von γ H2AX- sowie 53BP1-Foci in humanen Lymphozyten (*ex vivo*) innerhalb der ersten 3 h nach Beendigung der Radonexposition (261).

Über einen Zeitraum von 7 Tagen ist die Reparatur der DSBs scheinbar abgeschlossen. Allerdings ist die Analyse von fixierten Zellen immer nur eine Momentaufnahme des fortschreitenden Reparaturprozesses, wodurch das Schicksal der einzelnen, geschädigten

Zellen unklar bleibt. Für weitere Studien ist es daher sehr interessant zu untersuchen, ob eine geschädigte Zelle geregelt abstirbt (Apoptose) und dadurch die Anzahl der geschädigten Zellen abnimmt oder ob die Schäden repariert werden. Daher soll die Lebendzell-Mikroskopie für die Analyse von niedrigen Strahlendosen in kultivierten Zellen etabliert werden. Durch die kontinuierliche Beobachtung der Zellpopulation können gleichzeitig das Schicksal der Zellen und die individuelle Reparaturzeit von DSBs erfasst werden, die durch fluoreszierende Proteine in den lebenden Zellen sichtbar gemacht werden.

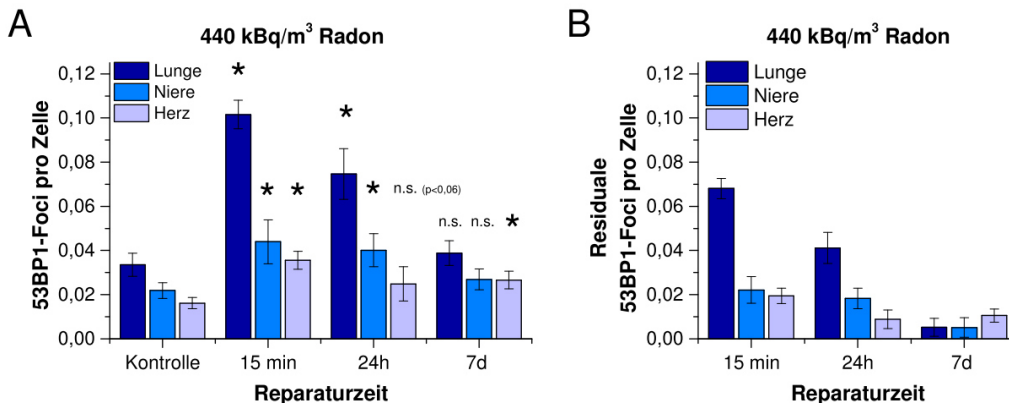


Abb. 28: Reparatur von komplexen DSBs nach der Radonexposition ist zeitaufwendig. Adulte C57BL/6 Mäuse wurden über 1 h mit 440 kBq/m³ Radon-222 bestrahlt und nach 15 min, 24 h, 7 d zur Organentnahme getötet. Die Organe wurden entnommen, fixiert und die Gewebeschnitte gegen γ H2AX oder 53BP1 gefärbt. Eine unbestrahlte Kontrollgruppe von Mäusen wurde entsprechend behandelt. (A+B) Quantifizierung der 53BP1-Foci nach Bestrahlung mit Radon. (A) Dargestellt ist die Auszählung der Foci in Zellen von vier unbestrahlten Mäusen oder der Mittelwert von drei bestrahlten Mäusen sowie deren Standardfehler. Pro Maus bzw. Organ wurden Foci in min. 1500 Zellen aus unterschiedlichen Färbungen ausgezählt. Der strahleninduzierte Anstieg der Foci wurde mit einem einseitigen t-Test überprüft (*; $p < 0,05$). (B) Dargestellt ist der Mittelwert von drei bestrahlten Mäusen (abzüglich der unbestrahlten Kontrolle aus A) sowie deren Standardabweichung und deren Standardfehler. Pro Maus bzw. Organ wurden Foci in min. 1500 Zellen aus unterschiedlichen Färbungen ausgezählt. Da keiner bestrahlten Maus eine Kontrollmaus zugewiesen wurde, wurde der dargestellte Standardfehler über die Fehlerfortpflanzung nach Gauß berechnet. (A+B) Die Quantifizierung der Foci wurde von B. Basso vorgenommen. Die dargestellten Mittelwerte der strahleninduzierten Foci pro Zelle, die 15 min nach Ende der Radonexposition erhoben wurden, entsprechen den in Abb. 23C (Person #2) gezeigten Daten.

6.2. Diskussion

Radon ist ein natürlich auftretendes radioaktives Edelgas, welches überall auf der Welt in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegt und zur Strahlenbelastung der Bevölkerung beiträgt. Die Exposition von Radon ist auf der einen Seite ein wesentlicher Risikofaktor bei der Entstehung von Lungenkrebs (2, 8), auf der anderen Seite sind Radon-Kuren ein beliebtes Heilmittel zur Behandlung von Patienten mit entzündlichen Krankheiten des Bewegungsapparates (251-253). Die Therapie bewirkt bei den Patienten eine Schmerzreduktion, die es erlaubt auf eine entsprechende Medikation mit starken Nebenwirkungen zu verzichten. Allerdings ist eine Strahlenexposition auch immer mit einem gewissen gesundheitlichen Risiko verbunden. Das Therapie-assoziierte Risiko ist wegen der unzureichend bekannten Verteilung von Radon im Körper und dessen Wirkungsweise jedoch nur schwer abzuschätzen und mit vielen Unsicherheiten behaftet.

In diesem Teilprojekt wurden erstmals umfangreiche biologische Ergebnisse zur inhomogenen Verteilung von Radon im Körper gewonnen, die es erlauben die Therapie-assoziierte Strahlenexposition einzelner Organe abzuschätzen. Um die Aufnahme von Radon über die Atemluft sowie dessen Verteilung im Organismus bestmöglich nachzustellen, wurde die Maus als Modellorganismus ausgewählt. Diese wurden angepasst an die therapeutische Anwendung von Radon unter kontrollierten Bedingungen für 1 h Radon-haltiger Luft ausgesetzt, deren Aktivitätskonzentration von 44 kBq/m³ von einer Einfahrt in den Heilstollen von Bad Gastein (Österreich) oder den insgesamt 10 Einfahrten (440 kBq/m³) innerhalb einer Therapie entsprach. Bei der biodosimetrischen Bewertung der Strahlenexposition macht man sich zunutze, dass die durch die Einwirkung von α -Teilchen auf lebende Zellen entstehenden DNA-Schäden mit dem sehr sensitiven Foci-Assay nachweisbar sind (128). Über eine bekannte Dosis-Wirkungsbeziehung kann von der Anzahl dieser detektierten Foci auf die zugrundeliegende, bis dahin unbekannte Dosis geschlossen werden.

Erstaunlicherweise wurde nach der Exposition der Mäuse mit 44 kBq/m³ in Zellen der Lunge strahleninduzierte DSBs festgestellt, sodass bei vergleichbaren Rahmenbedingungen bereits eine Einfahrt in den Stollen zu einer nachweisbaren Schädigung in der Lunge führt. Im Gegensatz dazu konnte in Zellen der Niere und Leber keine strahleninduzierten DSBs detektiert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit der Studie von Wang *et al.* überein. Obwohl in dieser Studie Sprague-Ratten über 13 Tage für jeweils 12 h Radon-haltiger Luft (40 kBq/m³) ausgesetzt waren, wurde keine Schadensinduktion in peripheren Lymphozyten festgestellt (260). Auch wenn in dieser Studie vergleichsweise sehr lange Expositionszeiten verwendet wurden, ist der analysierte Schaden aufgrund von Reparaturprozessen vermutlich hauptsächlich auf die letzten Expositionen zurückzuführen.

Nach einer Exposition der Mäuse mit 440 kBq/m^3 wurde für alle analysierten Organen eine strahleninduzierte Induktion von DSB festgestellt. Die Anzahl der strahleninduzierten Foci im Gewebe wurde in eine Röntgen-äquivalente Dosis umgerechnet, wozu das Verhältnis zwischen der Focusausbildung und der zugrundeliegenden Dosisdeposition von Röntgenstrahlen im Gewebe verwendet wurde. Über die Etablierung von Korrekturfaktoren für die unterschiedliche Art der Dosisdeposition von α -Teilchen und Röntgenstrahlen gelang es die Dosis und damit die Strahlenexposition für verschiedene Gewebe von Radon-exponierten Mäusen zu ermitteln. Durch die Exposition der Mäuse mit 440 kBq/m^3 wurde für Niere, Herz, Leber und Knochen eine mittlere Dosis von ca. 6 mGy (SD 1,4) detektiert. Eine aufgrund der therapeutischen Anwendung vermutete, präferenzielle Anreicherung von Radon am Knochen konnte in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden. Die vergleichbare Schädigung bzw. Strahlenexposition dieser Organe ist auf die freie Diffusion von Radon im Körper zurückzuführen. Neben der reinen Diffusion von Radon könnte auch ein Transport von Radon oder der Tochternuklide aus der Lunge über das Blut zur Schädigung der Organe beitragen (256-259). Experimentell könnte dieser Aspekt im Modellorganismus durch die Quantifizierung der Foci in peripheren Lymphozyten aus dem Blut oder in stark durchbluteten Organen, wie der Milz überprüft werden. In der Lunge wurde eine im Vergleich zu anderen Organen erhöhte Dosis von ca. 19 mGy detektiert. Diese setzt sich aus der DSB-Induktion durch den Zerfall von eingeatmeten bzw. frei diffundierendem Radon und dessen Tochternukliden sowie der zusätzlichen DSB-Induktion durch den Zerfall von Aerosolen-anhaftenden Tochternukliden des Radons zusammen.

Wenn man annimmt, dass der Anteil der Dosisdeposition und die zugrundeliegende DSB-Induktion durch den Zerfall von frei im Körper diffundierendem Radon für alle Organe etwa gleich ist, dann wären zusätzliche Schäden in der Lunge auf Aerosol-angeheftete Tochternuklide zurückzuführen. Daraus lässt sich ableiten, dass nach der Exposition mit 440 kBq/m^3 Radon ca. zweidrittel der DSBs der Lunge durch den Zerfall von Aerosolen-angehefteten Tochternukliden induziert werden. Bei der Exposition der Mäuse mit 44 kBq/m^3 Radon hingegen konnte keine Schädigung der Niere und Leber nachgewiesen werden, weshalb die gesamte Schädigung in der Lunge wahrscheinlich durch Aerosolen-angeheftete Tochternuklide verursacht wurde. Diese Schlussfolgerung unterstützt die allgemeine Ansicht, dass die gesundheitliche Gefährdung durch eine chronische Radon-Exposition weniger vom Radon selbst als von seinen kurzlebigen radioaktiven Zerfallsprodukten ausgeht (2, 3). Wie viele Tochternuklide an einem Aerosol adhären können, ist von dessen Oberfläche abhängig. Aus diesem Grund wurden die Aerosole, wie sie durch alltägliche Handlungen entstehen in zahlreichen Studien charakterisiert und deren Radioaktivität in Gegenwart von Radon gemessen (264). Welche Dosisanteil bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Expositionsbedingungen von den Aerosolen ausgeht und ob diese mit den Bedingungen im Heilstollen vergleichbar sind, werden Messungen mittels der γ -Spektroskopie von A. Maier

zeigen. Zu diesem Zweck wurde von S. Sternkopf ein mechanisches Lungenmodell entwickelt, welches derzeit von A. Maier optimiert wird und die Isolierung der Aerosole über einen Glasfaserfilter vorsieht (265). Darüber hinaus ist ein direkter Vergleich der physikalisch gemessenen Dosis und der biologisch bestimmten Dosis in der Lunge geplant, sodass zukünftig auch Referenzwerte für die Dosisdeposition zur Verfügung stehen (siehe auch Abschnitt 3.3.5.2).

6.2.1. Limitierungen des Foci-Assays und die Etablierung von Korrekturfaktoren

Über die Dosis-Wirkungsbeziehung von Röntgenstrahlen im Gewebe und die Etablierung von Korrekturfaktoren gelang es aus den detektierten Foci in Zellen der verschiedenen Gewebe von Radon-exponierten Mäusen die Dosis zu berechnen. Mit den Korrekturfaktoren wurde eine bekannte Limitierung für die Anwendung des Foci-Assays nach der Exposition von Zellen mit Hoch-LET Strahlung, zu der auch α -Partikel gezählt werden, aufgegriffen. Aufgrund der Energiedeposition von α -Partikeln entlang ihrer Bahnspur durch die Zellen werden typischerweise LMDS mit komplexen und geclusterten DSBs induziert, sodass auch mehrere DSBs innerhalb eines Focussignals vorliegen können (51-54). Solche Foci wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie in anderen Studien als große und signalintensive Foci beobachtet (52, 114, 119, 120, 143, 160, 161). Nakajima et al. gelang es durch hochauflösende Mikroskopie und anschließender Dekonvolution der aufgenommenen Bilder über die Signalintensität mehrere sub-Foci-Strukturen in einem einzelnen Focussignal in kultivierten Zellen sichtbar zu machen (120). Allerdings war dies erst 8 h nach der Bestrahlung möglich, wo die Focus-Signale im Vergleich zum hier untersuchten Zeitpunkt, direkt nach der Bestrahlung, erfahrungsgemäß größer sind. Da dies nicht möglich war, wurde die Anzahl der DSBs pro Focus über die Größe und Intensität der Foci abgeschätzt. Im Gewebe lagen im Mittel 4 DSBs pro Focus, der innerhalb einer Ionenspurauftritt. Dieser Wert erscheint nicht unwahrscheinlich, wenn nach einer Bestrahlung von kultivierten Zellen mit Eisenionen, die im Vergleich zu α -Partikeln zu einer höheren lokalen Energiedeposition führen, bis zu 20 Substrukturen innerhalb eines Focus festgestellt wurden (120). Dennoch soll dieser Korrekturfaktor im Rahmen von zukünftigen Experimenten mit dem Nachweis des Proteinheterodimers aus KU70/80 überprüft werden, da die vorgenommene Dosiskorrektur besonders von der Anzahl der geclusterten DSBs pro Focus abhängig ist. Das Heterodimer von KU70/80 liegt nur an der Bruchstelle der DNA vor, weshalb es in der Immunfluoreszenz viel kleinere Signale aufweist als γ H2AX und 53BP1, die über mehrere Megabasenpaare um den Bruch vorliegen (71, 87). Neben dem Aspekt der DSB-Cluster könnte diese Färbung zusätzlich helfen einzeln vorliegende Foci, die möglicherweise zu einer Ionenspuraufgehören, als solche Foci zu identifizieren. Dies wäre auch

über den Nachweis von verschiedenen DNA-Schäden, wie Einzelstrangbrüchen und Basenschäden in der unmittelbaren Nähe zum DSB möglich (114).

6.2.2. Übertragbarkeit der Biodosimetrie

Eine naheliegende Frage der Übertragbarkeit dieser Studie mit Wildtyp-Mäusen zu Mäusen mit einem den Patienten entsprechendem Krankheitsbild wurde im Rahmen einer kürzlich durchgeführten Bachelorarbeit adressiert. Dazu wurden von einem Projektpartner im GREWIS-Verbund Mäuse des Krankheitsmodelles Rheumatoider Arthritis (hTNF α -Mäuse) zur Verfügung gestellt. Rheumatoide Arthritis wird im Mausmodell mittels einer Überexpression des humanen TNF α induziert (266). TNF α ist ein Zytokin des Immunsystems, welches bei lokalen und systemischen Entzündungsprozessen auftritt und dessen erhöhtes Vorkommen mit der Ausbildung von Rheumatoider Arthritis beim Menschen assoziiert ist (267), (268). Entsprechend dem Krankheitsbild haben diese Mäuse geschwollene bzw. verformte Gelenke der Pfoten sowie eine verringerte "Griffstärke" (266). Wie D. Wilkens zeigen konnte, ist die im Rahmen dieses Teilprojektes durchgeführte Biodosimetrie an Wildtyp-Mäusen auch auf Mäuse mit einem dem Patienten entsprechendem Krankheitsbild übertragbar (269).

Im nächsten Schritt stellte sich daher die Frage, ob die Strahlenexpositionen von einzelnen Organen im Mausmodell direkt auf den Menschen übertragbar ist. Obwohl sich humane Zellen und Mauszellen nicht in ihrer Fähigkeit zur Erkennung und Markierung von DSBs unterscheiden, könnten physiologische oder morphologische Unterschiede die Strahlenexposition beeinflussen. Übereinstimmend mit den experimentellen Daten hat die Lunge bekanntermaßen auch beim Menschen die höchste Strahlenexposition und damit das höchste Risiko für eine Schädigung. Um die deponierte Dosis zu bestimmen, wurde in verschiedenen Studien sowie von der ICRP ein theoretisches Modell der menschlichen Lunge entwickelt (257-259, 270, 271). Diese Modelle berücksichtigen zahlreiche Parameter, die bei der Dosisdeposition von Radon relevant sind. Gleichzeitig impliziert die große Zahl der Parameter eine gewisse Variabilität und Unsicherheit der Modelle, da viele dieser Parameter auf Abschätzungen oder Annahmen beruhen. Von Sakoda *et al.* wurde die einzige mathematische Modellierung der deponierten Dosis in den Organen von Mäusen sowie Menschen durchgeführt (270, 272). Während für die meisten Organe der Maus und des Menschen eine ähnliche Dosis pro Radonkonzentration und Expositionszeit berechnet wird (270), ist in diesem Modell die deponierte Dosis in der Lunge des Menschen 2,6mal niedriger als in der Mauslunge (272). Angewendet auf die vorgestellten Ergebnisse würde die experimentell bestimmten 19 mGy in der Mauslunge demzufolge einer Dosis von 7 mGy in der Lunge des Menschen entsprechen. Allerdings ist schwer zu beurteilen, wie nahe dieser berechnete Faktor an der Realität liegt, da wegen einer unzureichenden Datenlage viele Annahmen getroffen und Vereinfachungen von

komplexen Sachverhalten vorgenommen wurden. Auch ein naheliegender Abgleich des Modells mit experimentellen Daten für die Maus hilft bei diesem Problem nicht weiter. In der gesamten Lunge der Maus sollen nach Sakoda *et al.* bei typischen Rahmenbedingungen von Tierexperimenten 16,9 nGy pro Bq m^{-3} und h deponiert werden (272). Daraus ergibt sich für eine einstündige Exposition mit 440 kBq/m^3 eine Dosis von 7 mGy. Diese mathematisch bestimmte Dosis ist in der selben Größenordnung wie die experimentell bestimmte Dosis. Aufgrund fehlender Angaben der Schwankungsbreite bei der mathematischen Modellierung lässt sich jedoch keine eindeutige Aussage über die Übereinstimmung der erhaltenen Werte treffen. Darüber hinaus ist unklar, ob die mathematisch angenommenen und experimentellen Rahmenbedingungen tatsächlich übereinstimmen und ob das Modell für die Anwendung einer akuten Exposition geeignet ist. Ein weiterer Dosisvergleich wurde in der kürzlich publizierten Studie von Wang *et al.* durchgeführt. In dieser Studie wurden Ratten entsprechend den Expositionszeiten von Mienenarbeitern exponiert und die DSB-Induktion analysiert. Für Blutzellen aus dem Knochenmark von Ratten, die mit 60 WLM (100 kBq/m^3 über insgesamt 380 h, jeweils 12 h an 6 Tagen der Woche) wurde experimentell eine Dosis von 4 mGy bestimmt (260). Diese lag nach Angabe der Autoren um einen Faktor von 5 höher, als die Dosis, die mittels des mathematischen Modells von Sakoda *et al.* berechnet wurde (260, 270). Der beobachtete Faktor zwischen der experimentell und der mathematisch bestimmten Dosis wurde jedoch nicht diskutiert und ist aufgrund der angesprochenen Gründe schwer zu beurteilen.

Anhand der diskutierten Probleme wird deutlich, dass die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen derzeit nicht eindeutig beantwortet werden kann. Dennoch bietet die vorgenommene Biodosimetrie für verschiedene Organe der Maus eine bisher einzigartige Möglichkeit. Mittels der umfangreichen biologischen Daten zur Verteilung von Radon und dessen Tochternukliden bzw. der Dosisdeposition in der Maus bei definierten physikalischen Rahmenbedingungen können die mathematischen Modelle biologisch verifiziert und entsprechend weiter entwickelt werden. Darauf aufbauend liefern die Resultate einen Anhaltspunkt zur Anpassung und Weiterentwicklung der bestehenden Modelle für die Dosisabschätzung des Menschen.

6.2.3. Abschließende Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Teilprojekt wurde mittels der Foci-Analyse erstmals eine höhere DSB-Induktion und damit eine höhere Dosisdeposition durch Radon in der Lunge biologisch nachgewiesen. Die anderen Organe wurden im Vergleich zur Lunge in einem deutlich geringeren Ausmaß geschädigt. Die verwendete Aktivitätskonzentration von Radon entsprach mit 44 kBq/m^3 einer Einfahrt in den Heilstollen von Bad Gastein (Österreich) oder mit 440 kBq/m^3 den insgesamt 10 Einfahrten innerhalb einer Therapie, sodass die festgestellte Dosis die Therapie-assoziierte

Strahlenexposition widerspiegelt. Das gewonnene detailliertere Verständnis zur inhomogenen Verteilung von Radon im Körper und der damit verbundenen biologische Effekte wird auch bei der Erforschung der bisher ungeklärten therapeutischen Wirkung von Radon bei entzündlichen Erkrankungen helfen. Unabhängig von der therapeutischen Anwendung verdeutlicht eine kürzlich erschienene Veröffentlichung die Relevanz der Radonproblematik. Anlässlich neuer Ergebnisse von epidemiologischen Studien sowie eines dosimetrischen Ansatzes empfiehlt die ICRP eine Verdopplung des assoziierten Risikos von einer Radonexposition (273, 274). Dadurch würde die natürliche jährliche Strahlenbelastung eines Mitglieds der Bevölkerung in Deutschland durch Radon, bei gleichbleibender Exposition, von durchschnittlich 1,1 mSv auf ca. 2 mSv ansteigen (274). Darüber hinaus müssten durch eine Anpassung beispielsweise alle Modelle und Grenzwertberechnungen zur Strahlenexposition oder zur Radonaktivität in Wohnräumen entsprechend geändert werden. Dies sind weitgreifende konzeptionelle Anpassungen im Strahlenschutz und werden daher in Fachkreisen kontrovers diskutiert (274). Im Zuge dieser Diskussion bieten die umfangreichen biodosimetrischen Daten die einzigartige Möglichkeit mathematische Modelle biologisch zu verifizieren und entsprechend weiterzuentwickeln. Damit können aus den vorgestellten Ergebnissen wertvolle Erkenntnisse für die Grundlagenforschung im Bereich der medizinischen Anwendung von Radon sowie allgemein für den Strahlenschutz gewonnen werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Bundesamt für Strahlenschutz (06/2016) Wie hoch ist die natürliche Strahlenbelastung in Deutschland?
2. Darby S, *et al.* (2005) Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *Bmj* 330(7485):223.
3. Palmer HE, Perkins RW, & Stuart BO (1964) The Distribution and Deposition of Radon Daughters Attached to Dust Particles in the Respiratory System of Humans Exposed to Uranium Mine Atmospheres. *Health physics* 10:1129-1135.
4. Darby S, Hill D, & Doll R (2001) Radon: a likely carcinogen at all exposures. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 12(10):1341-1351.
5. Gray A, Read S, McGale P, & Darby S (2009) Lung cancer deaths from indoor radon and the cost effectiveness and potential of policies to reduce them. *Bmj* 338:a3110.
6. Lubin JH (1988) Models for the analysis of radon-exposed populations. *The Yale journal of biology and medicine* 61(3):195-214.
7. UNSCEAR (2000) Sources and Effects of Ionizing Radiation. *Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Vol I: Sources.*
8. Kreuzer M, Fenske N, Schnelzer M, & Walsh L (2015) Lung cancer risk at low radon exposure rates in German uranium miners. *British journal of cancer* 113(9):1367-1369.
9. Menzler S, Schaffrath-Rosario A, Wichmann H-E, & Kreienbrock L (2006) *Abschätzung des attributablen Lungenkrebsrisikos in Deutschland durch Radon in Wohnungen* (Landsberg: ecomed MEDIZIN).
10. Maier A (2015) Entwicklung einer Radonkammer und Messung der Radonlöslichkeit in Gewebe. Dissertation (Technische Universität Darmstadt).
11. Krieger H (2012) *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes* (Springer Spektrum, Wiesbaden) 4., überarb. und erw. Aufl. Ed p 813 S.
12. Schlegel B & Schlegel K (2011) *Polarlichter zwischen Wunder und Wirklichkeit - Kulturgeschichte und Physik einer Himmelserscheinung* (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg).
13. Brenner DJ, *et al.* (2003) Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(24):13761-13766.
14. Curtis SB & Letaw JR (1989) Galactic cosmic rays and cell-hit frequencies outside the magnetosphere. *Adv Space Res* 9(10):293-298.
15. Kraft G (1996) *Radiobiology of Heavy Charged Particles* (GSI).
16. Cucinotta FA (2015) Review of NASA approach to space radiation risk assessments for Mars exploration. *Health physics* 108(2):131-142.
17. Cucinotta FA & Chappell LJ (2011) Updates to astronaut radiation limits: radiation risks for never-smokers. *Radiation research* 176(1):102-114.
18. Kraft G (2001) What we can learn from heavy ion therapy for radioprotection in space. *Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology : official journal of the Italian Association of Biomedical Physics* 17 Suppl 1:13-20.
19. Kraft G, *et al.* (1984) HZE effects on mammalian cells. *Adv Space Res* 4(10):219-226.
20. Gademann G, Hartmann GH, Kraft G, Lorenz WJ, & Wannemacher M (1990) The medical heavy ion therapy project at the Gesellschaft für Schwerionenforschung facility

-
- in Darmstadt. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]* 166(1):34-39.
21. Schulz-Ertner D, *et al.* (2004) Results of carbon ion radiotherapy in 152 patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 58(2):631-640.
 22. Skarsgard LD (1998) Radiobiology with heavy charged particles: a historical review. *Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology : official journal of the Italian Association of Biomedical Physics* 14 Suppl 1:1-19.
 23. Spielberger B, Kramer M, & Kraft G (2003) Three-dimensional dose verification with x-ray films in conformal carbon ion therapy. *Physics in medicine and biology* 48(4):497-505.
 24. Kraft G (1998) Radiotherapy with heavy ions: radiobiology, clinical indications and experience at GSI, Darmstadt. *Tumori* 84(2):200-204.
 25. Mitaroff A, Kraft-Weyrather W, Geiss OB, & Kraft G (1998) Biological verification of heavy ion treatment planning. *Radiation and environmental biophysics* 37(1):47-51.
 26. Fokas E, Kraft G, An H, & Engenhardt-Cabillic R (2009) Ion beam radiobiology and cancer: time to update ourselves. *Biochimica et biophysica acta* 1796(2):216-229.
 27. Mettler FA, Jr., *et al.* (2009) Radiologic and nuclear medicine studies in the United States and worldwide: frequency, radiation dose, and comparison with other radiation sources--1950-2007. *Radiology* 253(2):520-531.
 28. UNSCEAR (2010) Sources and Effects of Ionizing Radiation. *UNSCEAR 2008 Report. Vol I: Sources Medical Radiation Exposures.*
 29. Brenner D, Elliston C, Hall E, & Berdon W (2001) Estimated risks of radiation-induced fatal cancer from pediatric CT. *AJR. American journal of roentgenology* 176(2):289-296.
 30. Mettler FA, Jr., Huda W, Yoshizumi TT, & Mahesh M (2008) Effective doses in radiology and diagnostic nuclear medicine: a catalog. *Radiology* 248(1):254-263.
 31. Berrington de Gonzalez A, *et al.* (2016) Relationship between paediatric CT scans and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: assessment of the impact of underlying conditions. *British journal of cancer* 114(4):388-394.
 32. Pearce MS, *et al.* (2012) Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet* 380(9840):499-505.
 33. Mathews JD, *et al.* (2013) Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. *Bmj* 346:f2360.
 34. Huang WY, *et al.* (2014) Paediatric head CT scan and subsequent risk of malignancy and benign brain tumour: a nation-wide population-based cohort study. *British journal of cancer* 110(9):2354-2360.
 35. Journy N, *et al.* (2015) Are the studies on cancer risk from CT scans biased by indication? Elements of answer from a large-scale cohort study in France. *British journal of cancer* 112(1):185-193.
 36. Krille L, *et al.* (2015) Risk of cancer incidence before the age of 15 years after exposure to ionising radiation from computed tomography: results from a German cohort study. *Radiation and environmental biophysics* 54(1):1-12.
 37. Brenner DJ & Hall EJ (2012) Cancer Risks from CT Scans: Now We Have Data, What Next? *Radiology* 265(2):330-331.
 38. Walsh L, Shore R, Auvinen A, Jung T, & Wakeford R (2014) Risks from CT scans--what do recent studies tell us? *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection* 34(1):E1-5.

39. Journy N, *et al.* (2016) Childhood CT scans and cancer risk: impact of predisposing factors for cancer on the risk estimates. *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection* 36(1):N1-7.
40. Meulepas JM, *et al.* (2016) Confounding of the association between radiation exposure from CT scans and risk of leukemia and brain tumors by cancer susceptibility syndromes. *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection* 36(4):953-974.
41. Bosch de Basea M, *et al.* (2015) EPI-CT: design, challenges and epidemiological methods of an international study on cancer risk after paediatric and young adult CT. *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection* 35(3):611-628.
42. Thierry-Chef I, *et al.* (2013) Assessing organ doses from paediatric CT scans--a novel approach for an epidemiology study (the EPI-CT study). *International journal of environmental research and public health* 10(2):717-728.
43. Mullenders L, Atkinson M, Paretzke H, Sabatier L, & Bouffler S (2009) Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nature reviews. Cancer* 9(8):596-604.
44. Land H, Parada LF, & Weinberg RA (1983) Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 222(4625):771-778.
45. Boyd JA & Barrett JC (1990) Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis. *Pharmacology & therapeutics* 46(3):469-486.
46. Jeggo PA & Lobrich M (2015) How cancer cells hijack DNA double-strand break repair pathways to gain genomic instability. *The Biochemical journal* 471(1):1-11.
47. Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-674.
48. Scholz M (2003) Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues. *Radiation Effects on Polymers for Biological Use*, Advances in Polymer Science, eds Kausch H, Anjum N, Chevotot Y, Gupta B, Léonard D, Mathieu HJ, Pruitt LA, Ruiz-Taylor L, & Scholz M (Springer Berlin Heidelberg), Vol 162, pp 95-155.
49. Hall EJ & Giaccia AJ (2005) *Radiobiology for the Radiologist* (Lippincott Williams & Wilkins).
50. Goodhead DT (1995) Molecular and cell models of biological effects of heavy ion radiation. *Radiation and environmental biophysics* 34(2):67-72.
51. Schipler A & Iliakis G (2013) DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic acids research* 41(16):7589-7605.
52. Goodhead DT (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology* 65(1):7-17.
53. Krieger H (2009) *Grundlagen Der Strahlungsphysik Und Des Strahlenschutzes* (Vieweg+teubner Verlag).
54. Ward JF (1985) Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl* 8:S103-111.
55. Chatterjee A & Schaefer HJ (1976) Microdosimetric structure of heavy ion tracks in tissue. *Radiation and environmental biophysics* 13(3):215-227.
56. Valko M, *et al.* (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(1):44-84.
57. Bassing CH, Swat W, & Alt FW (2002) The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl:S45-55.
58. Ensminger M, *et al.* (2014) DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair. *The Journal of cell biology* 206(1):29-43.

-
59. Jones RM & Petermann E (2012) Replication fork dynamics and the DNA damage response. *The Biochemical journal* 443(1):13-26.
 60. Evans HJ & Scott D (1969) The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustard and its dependence on DNA synthesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 173(1033):491-512.
 61. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, & Dulak J (2016) Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci* 73(17):3221-3247.
 62. Sekhar KR & Freeman ML (2015) Nrf2 promotes survival following exposure to ionizing radiation. *Free radical biology & medicine* 88(Pt B):268-274.
 63. Frankenberg-Schwager M (1990) Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiation and environmental biophysics* 29(4):273-292.
 64. Bakkenist CJ & Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421(6922):499-506.
 65. Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, & Mulhern TD (2001) ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 8(11):1052-1065.
 66. Lee JH & Paull TT (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308(5721):551-554.
 67. de Jager M, *et al.* (2001) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Molecular cell* 8(5):1129-1135.
 68. Horejsi Z, *et al.* (2004) Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene* 23(17):3122-3127.
 69. Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, & Price BD (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(37):13182-13187.
 70. Paull TT & Lee JH (2005) The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell cycle* 4(6):737-740.
 71. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, & Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273(10):5858-5868.
 72. Wang H, Wang M, Wang H, Bocker W, & Iliakis G (2005) Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *Journal of cellular physiology* 202(2):492-502.
 73. Stiff T, *et al.* (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer research* 64(7):2390-2396.
 74. Celeste A, *et al.* (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature cell biology* 5(7):675-679.
 75. Jungmichel S & Stucki M (2010) MDC1: The art of keeping things in focus. *Chromosoma* 119(4):337-349.
 76. Lou Z, *et al.* (2006) MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Molecular cell* 21(2):187-200.
 77. Barja G (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 27(10):595-600.
 78. Gatti M, *et al.* (2012) A novel ubiquitin mark at the N-terminal tail of histone H2As targeted by RNF168 ubiquitin ligase. *Cell cycle* 11(13):2538-2544.
 79. Mattioli F, *et al.* (2012) RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell* 150(6):1182-1195.

80. Botuyan MV, *et al.* (2006) Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127(7):1361-1373.
81. Fradet-Turcotte A, *et al.* (2013) 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* 499(7456):50-54.
82. Zgheib O, Pataky K, Brugger J, & Halazonetis TD (2009) An oligomerized 53BP1 tudor domain suffices for recognition of DNA double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* 29(4):1050-1058.
83. Panier S & Boulton SJ (2014) Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(1):7-18.
84. Mladenov E, Magin S, Soni A, & Iliakis G (2016) DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Seminars in cancer biology* 37-38:51-64.
85. Kanaar R, Hoeijmakers JH, & van Gent DC (1998) Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends in cell biology* 8(12):483-489.
86. Seeber A & Gasser SM (2017) Chromatin organization and dynamics in double-strand break repair. *Current Opinion in Genetics & Development* 43:9-16.
87. Liang F, Romanienko PJ, Weaver DT, Jeggo PA, & Jasin M (1996) Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(17):8929-8933.
88. Lees-Miller SP, Chen YR, & Anderson CW (1990) Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. *Molecular and cellular biology* 10(12):6472-6481.
89. Uematsu N, *et al.* (2007) Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology* 177(2):219-229.
90. Ahnesorg P, Smith P, & Jackson SP (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124(2):301-313.
91. Grawunder U, Zimmer D, Fugmann S, Schwarz K, & Lieber MR (1998) DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Molecular cell* 2(4):477-484.
92. Grawunder U, Zimmer D, Kulesza P, & Lieber MR (1998) Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo. *The Journal of biological chemistry* 273(38):24708-24714.
93. Grawunder U, Zimmer D, & Lieber MR (1998) DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Current biology : CB* 8(15):873-876.
94. Ding Q, *et al.* (2003) Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 23(16):5836-5848.
95. Burma S & Chen DJ (2004) Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA repair* 3(8-9):909-918.
96. Weterings E, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Hoeijmakers JH, & van Gent DC (2003) The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic acids research* 31(24):7238-7246.
97. Valerie K & Povirk LF (2003) Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22(37):5792-5812.
98. Weterings E & Chen DJ (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell research* 18(1):114-124.
99. Meek K, Dang V, & Lees-Miller SP (2008) DNA-PK: the means to justify the ends? *Advances in immunology* 99:33-58.

100. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, & Lieber MR (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108(6):781-794.
101. Wang J, *et al.* (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* 4(5):556-570.
102. Averbek NB, *et al.* (2014) DNA end resection is needed for the repair of complex lesions in G1-phase human cells. *Cell cycle* 13(16):2509-2516.
103. Quennet V, Beucher A, Barton O, Takeda S, & Lobrich M (2011) CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1. *Nucleic acids research* 39(6):2144-2152.
104. Barton O, *et al.* (2014) Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1. *The Journal of cell biology* 206(7):877-894.
105. Biehs R, *et al.* (2017) DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Molecular cell*.
106. Aoufouchi S, *et al.* (2000) Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic acids research* 28(18):3684-3693.
107. Mahajan KN, Nick McElhinny SA, Mitchell BS, & Ramsden DA (2002) Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 22(14):5194-5202.
108. Chowdhury D, *et al.* (2005) gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular cell* 20(5):801-809.
109. Chowdhury D, *et al.* (2008) A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Molecular cell* 31(1):33-46.
110. Douglas P, *et al.* (2010) Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Molecular and cellular biology* 30(6):1368-1381.
111. Kimura H, *et al.* (2006) A novel histone exchange factor, protein phosphatase 2Cgamma, mediates the exchange and dephosphorylation of H2A-H2B. *The Journal of cell biology* 175(3):389-400.
112. Sutherland BM, *et al.* (2001) Clustered DNA damages induced by high and low LET radiation, including heavy ions. *Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology : official journal of the Italian Association of Biomedical Physics* 17 Suppl 1:202-204.
113. Taucher-Scholz G, Heilmann J, & Kraft G (1996) Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in CHO cells after heavy ion irradiation. *Adv Space Res* 18(1-2):83-92.
114. Asaithamby A, Hu B, & Chen DJ (2011) Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(20):8293-8298.
115. Asaithamby A, *et al.* (2008) Repair of HZE-particle-induced DNA double-strand breaks in normal human fibroblasts. *Radiation research* 169(4):437-446.
116. Jakob B, Scholz M, & Taucher-Scholz G (2003) Biological imaging of heavy charged-particle tracks. *Radiation research* 159(5):676-684.
117. Karlsson KH & Stenerlow B (2004) Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions. *Radiation research* 161(5):517-527.
118. Desai N, *et al.* (2005) Immunofluorescence detection of clustered gamma-H2AX foci induced by HZE-particle radiation. *Radiation research* 164(4 Pt 2):518-522.

119. Asaithamby A & Chen DJ (2011) Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation. *Mutation research* 711(1-2):87-99.
120. Nakajima NI, *et al.* (2013) Visualisation of gammaH2AX foci caused by heavy ion particle traversal; distinction between core track versus non-track damage. *PloS one* 8(8):e70107.
121. Rappold I, Iwabuchi K, Date T, & Chen J (2001) Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *The Journal of cell biology* 153(3):613-620.
122. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, & Halazonetis TD (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology* 151(7):1381-1390.
123. Paull TT, *et al.* (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* 10(15):886-895.
124. Stucki M & Jackson SP (2004) MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA repair* 3(8-9):953-957.
125. Rogakou EP, Boon C, Redon C, & Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology* 146(5):905-916.
126. Rothkamm K & Lobrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9):5057-5062.
127. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, & Bonner WM (2002) Quantitative detection of (125)I dU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiation research* 158(4):486-492.
128. Lobrich M, *et al.* (2010) gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell cycle* 9(4):662-669.
129. Rothkamm K, *et al.* (2015) DNA damage foci: Meaning and significance. *Environmental and molecular mutagenesis* 56(6):491-504.
130. Vandevoorde C, *et al.* (2015) EPI-CT: in vitro assessment of the applicability of the gamma-H2AX-foci assay as cellular biomarker for exposure in a multicentre study of children in diagnostic radiology. *International journal of radiation biology* 91(8):653-663.
131. Barnard S, *et al.* (2015) The first gamma-H2AX biodosimetry intercomparison exercise of the developing European biodosimetry network RENEB. *Radiation protection dosimetry* 164(3):265-270.
132. Moquet J, Barnard S, & Rothkamm K (2014) Gamma-H2AX biodosimetry for use in large scale radiation incidents: comparison of a rapid '96 well lyse/fix' protocol with a routine method. *PeerJ* 2:e282.
133. Wojcik A, *et al.* (2016) The RENEB operational basis: complement of established biodosimetric assays. *International journal of radiation biology*:1-5.
134. Horn S, Barnard S, & Rothkamm K (2011) Gamma-H2AX-based dose estimation for whole and partial body radiation exposure. *PloS one* 6(9):e25113.
135. Bonner WM, *et al.* (2008) GammaH2AX and cancer. *Nature reviews. Cancer* 8(12):957-967.
136. Redon CE, *et al.* (2011) gamma-H2AX detection in peripheral blood lymphocytes, splenocytes, bone marrow, xenografts, and skin. *Methods in molecular biology* 682:249-270.
137. Grudzenski S, Raths A, Conrad S, Rube CE, & Lobrich M (2010) Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(32):14205-14210.

138. Asaithamby A & Chen DJ (2009) Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation. *Nucleic acids research* 37(12):3912-3923.
139. Kegel P, Riballo E, Kuhne M, Jeggo PA, & Lobrich M (2007) X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA repair* 6(11):1692-1697.
140. Fricke A (2008) Untersuchungen zur Chromatinstruktur und DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in menschlichen Zellen mittels ionisierender Strahlung. (Technische Universität Darmstadt).
141. Wang Q, *et al.* (2003) Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* 125(11):3192-3193.
142. Friedrich T (2016) Personal Communication.
143. Mirsch J, *et al.* (2015) Direct measurement of the 3-dimensional DNA lesion distribution induced by energetic charged particles in a mouse model tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(40):12396-12401.
144. Reliene R, Fischer E, & Schiestl RH (2004) Effect of N-acetyl cysteine on oxidative DNA damage and the frequency of DNA deletions in atm-deficient mice. *Cancer research* 64(15):5148-5153.
145. Reliene R & Schiestl RH (2006) Antioxidant N-acetyl cysteine reduces incidence and multiplicity of lymphoma in Atm deficient mice. *DNA repair* 5(7):852-859.
146. Frohns A (2013) *Untersuchung der DNA-Schadensantwort in der murinen Retina nach ionisierender Strahlung* (Universitäts- und Landesbibliothek Darmstadt, Darmstadt) pp Online-Ressource.
147. Maier A, *et al.* (2015) Experimental setup for radon exposure and first diffusion studies using gamma spectroscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 362:187-193.
148. Frohns A, Frohns F, Naumann SC, Layer PG, & Lobrich M (2014) Inefficient double-strand break repair in murine rod photoreceptors with inverted heterochromatin organization. *Current biology : CB* 24(10):1080-1090.
149. Solovei I, *et al.* (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137(2):356-368.
150. Durante M & Cucinotta FA (2008) Heavy ion carcinogenesis and human space exploration. *Nature reviews. Cancer* 8(6):465-472.
151. Loeffler JS & Durante M (2013) Charged particle therapy--optimization, challenges and future directions. *Nature reviews. Clinical oncology* 10(7):411-424.
152. Kiefer J (2008) The physical basis for the biological action of heavy ions. *New Journal of Physics* 10(7):075004.
153. Kiefer J & Straaten H (1986) A model of ion track structure based on classical collision dynamics. *Physics in medicine and biology* 31(11):1201-1209.
154. Dingfelder M, *et al.* (2008) Comparisons of calculations with PARTRAC and NOREC: transport of electrons in liquid water. *Radiation research* 169(5):584-594.
155. Emfietzoglou D & Moscovitch M (2003) Secondary electron spectra for fast proton impact on gaseous and liquid water. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 209(0):239-245.
156. Palmans H, *et al.* (2015) Future development of biologically relevant dosimetry. *The British journal of radiology* 88(1045):20140392.
157. Jeon CJ, Strettoi E, & Masland RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(21):8936-8946.
158. Young RW (1985) Cell differentiation in the retina of the mouse. *The Anatomical record* 212(2):199-205.

159. Rube CE, *et al.* (2008) DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(20):6546-6555.
160. Jakob B & Taucher-Scholz G (2006) Interaction of heavy ions with nuclear chromatin: Spatiotemporal investigations of biological responses in a cellular environment. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 245(1):292-297.
161. Neumaier T, *et al.* (2012) Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(2):443-448.
162. Elsässer TC, R; Krämer, M; and Scholz, M. (2008) Impact of track structure calculations on biological treatment planning in ion radiotherapy. *New Journal of Physics* 10 075005.
163. Tommasino F (2014) DNA damage induction and processing following exposure to low and high LET radiation : the role of micrometer-scale clustering in higher-order chromatin structures. (Darmstadt, Techn. Univ., ULB Darmstadt).
164. Chiolo I, *et al.* (2011) Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* 144(5):732-744.
165. Jakob B, *et al.* (2011) DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic acids research* 39(15):6489-6499.
166. Costes SV, *et al.* (2007) Image-based modeling reveals dynamic redistribution of DNA damage into nuclear sub-domains. *PLoS computational biology* 3(8):e155.
167. Jakob B, Splinter J, Durante M, & Taucher-Scholz G (2009) Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(9):3172-3177.
168. Nienhaus K & Nienhaus GU (2016) Where Do We Stand with Super-Resolution Optical Microscopy? *Journal of molecular biology* 428(2 Pt A):308-322.
169. Elsasser T, *et al.* (2010) Quantification of the relative biological effectiveness for ion beam radiotherapy: direct experimental comparison of proton and carbon ion beams and a novel approach for treatment planning. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 78(4):1177-1183.
170. Friedrich T, Scholz U, Elsässer T, Durante M, & Scholz M (2012) Calculation of the biological effects of ion beams based on the microscopic spatial damage distribution pattern. *International Journal of Radiation Biology* 88(1-2):103-107.
171. Scholz M, Kellerer AM, Kraft-Weyrather W, & Kraft G (1997) Computation of cell survival in heavy ion beams for therapy. The model and its approximation. *Radiat Environ Biophys* 36(1):59-66.
172. Friedrich TD, M; Scholz, M. (2013) The Local Effect Model-Principles and Applications
173. Council NR (2006) *Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR VII Phase 2* (The National Academies Press, Washington, DC) p 422.
174. Preston RJ (2003) The LNT model is the best we can do--today. *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection* 23(3):263-268.
175. Upton AC, National Council on Radiation P, & Measurements Scientific C (2003) The state of the art in the 1990's: NCRP Report No. 136 on the scientific bases for linearity in the dose-response relationship for ionizing radiation. *Health physics* 85(1):15-22.
176. Tubiana M (2005) Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: the joint report of the Academie des Sciences (Paris) and of the Academie Nationale de Medecine. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 63(2):317-319.

177. Reliene R, *et al.* (2009) N-acetyl cysteine protects against ionizing radiation-induced DNA damage but not against cell killing in yeast and mammals. *Mutation research* 665(1-2):37-43.
178. Tiwari P, Kumar A, Balakrishnan S, Kushwaha HS, & Mishra KP (2009) Radiation-induced micronucleus formation and DNA damage in human lymphocytes and their prevention by antioxidant thiols. *Mutation research* 676(1-2):62-68.
179. Brand M, *et al.* (2015) Influence of Different Antioxidants on X-Ray Induced DNA Double-Strand Breaks (DSBs) Using gamma-H2AX Immunofluorescence Microscopy in a Preliminary Study. *PloS one* 10(5):e0127142.
180. Miller LF & Rumack BH (1983) Clinical safety of high oral doses of acetylcysteine. *Seminars in oncology* 10(1 Suppl 1):76-85.
181. Kelly GS (1998) Clinical applications of N-acetylcysteine. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 3(2):114-127.
182. Rodenstein D, DeCoster A, & Gazzaniga A (1978) Pharmacokinetics of oral acetylcysteine: absorption, binding and metabolism in patients with respiratory disorders. *Clinical pharmacokinetics* 3(3):247-254.
183. Borgstrom L, Kagedal B, & Paulsen O (1986) Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *European journal of clinical pharmacology* 31(2):217-222.
184. Olsson B, Johansson M, Gabrielsson J, & Bolme P (1988) Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *European journal of clinical pharmacology* 34(1):77-82.
185. Webb WR (1962) Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetyl-cysteine. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 44:330-343.
186. Prescott LF, Park J, Ballantyne A, Adriaenssens P, & Proudfoot AT (1977) Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet* 2(8035):432-434.
187. Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, & Rumack BH (1988) Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985). *The New England journal of medicine* 319(24):1557-1562.
188. Fraternali A, *et al.* (2009) GSH and analogs in antiviral therapy. *Molecular aspects of medicine* 30(1-2):99-110.
189. Millea PJ (2009) N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *American family physician* 80(3):265-269.
190. Tepel M (2003) Acetylcysteine for the prevention of radiocontrast -induced nephropathy. *Minerva cardioangiologica* 51(5):525-530.
191. De Flora S, Grassi C, & Carati L (1997) Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment. *The European respiratory journal* 10(7):1535-1541.
192. Sheffner AL, *et al.* (1966) Metabolic studies with acetylcysteine. *Biochemical pharmacology* 15(10):1523-1535.
193. Arfsten DP, Johnson EW, Wilfong ER, Jung AE, & Bobb AJ (2007) Distribution of radio-labeled N-Acetyl-L-Cysteine in Sprague-Dawley rats and its effect on glutathione metabolism following single and repeat dosing by oral gavage. *Cutaneous and ocular toxicology* 26(2):113-134.
194. Mirsch J (2012) γ H2AX- und 53BP1-Foci Analyse zum biologischen Nachweis niedriger Dosen ionisierender Strahlung im Mausmodell. Masterarbeit (Technische Universität Darmstadt).
195. De Flora S, *et al.* (1985) In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis* 6(12):1735-1745.

196. Kadhim M, *et al.* (2013) Non-targeted effects of ionising radiation--implications for low dose risk. *Mutation research* 752(2):84-98.
197. Morgan WF & Sowa MB (2015) Non-targeted effects induced by ionizing radiation: mechanisms and potential impact on radiation induced health effects. *Cancer letters* 356(1):17-21.
198. Schanz S, *et al.* (2012) Accumulation of DNA damage in complex normal tissues after protracted low-dose radiation. *DNA repair* 11(10):823-832.
199. Klammer H, Mladenov E, Li F, & Iliakis G (2015) Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status. *Cancer letters* 356(1):58-71.
200. Saha S, *et al.* (2014) Increased apoptosis and DNA double-strand breaks in the embryonic mouse brain in response to very low-dose X-rays but not 50 Hz magnetic fields. *J R Soc Interface* 11(100):20140783.
201. RISK-IR
202. Gorrini C, Harris IS, & Mak TW (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature reviews. Drug discovery* 12(12):931-947.
203. Sjodin K, Nilsson E, Hallberg A, & Tunek A (1989) Metabolism of N-acetyl-L-cysteine. Some structural requirements for the deacetylation and consequences for the oral bioavailability. *Biochemical pharmacology* 38(22):3981-3985.
204. Cotgreave IA, Berggren M, Jones TW, Dawson J, & Moldeus P (1987) Gastrointestinal metabolism of N-acetylcysteine in the rat, including an assay for sulfite in biological systems. *Biopharmaceutics & drug disposition* 8(4):377-386.
205. McLellan LI, Lewis AD, Hall DJ, Ansell JD, & Wolf CR (1995) Uptake and distribution of N-acetylcysteine in mice: tissue-specific effects on glutathione concentrations. *Carcinogenesis* 16(9):2099-2106.
206. Patt HM, Tyree EB, Straube RL, & Smith DE (1949) Cysteine Protection against X Irradiation. *Science* 110(2852):213-214.
207. De Flora S, *et al.* (1995) Chemopreventive properties and mechanisms of N-Acetylcysteine. The experimental background. *Journal of cellular biochemistry. Supplement* 22:33-41.
208. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, & Berk M (2013) The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et biophysica acta* 1830(8):4117-4129.
209. Bannai S & Tateishi N (1986) Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *The Journal of membrane biology* 89(1):1-8.
210. Corre I, Niaudet C, & Paris F (2010) Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutation research* 704(1-3):61-67.
211. Barlow C, *et al.* (1999) Loss of the ataxia-telangiectasia gene product causes oxidative damage in target organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(17):9915-9919.
212. Barlow C, *et al.* (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86(1):159-171.
213. Carpenter AE, *et al.* (2006) CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7(10):R100.
214. Jucha A, *et al.* (2010) FociCounter: a freely available PC programme for quantitative and qualitative analysis of gamma-H2AX foci. *Mutation research* 696(1):16-20.
215. Runge R, *et al.* (2012) Fully automated interpretation of ionizing radiation-induced gammaH2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES(R). *International journal of radiation biology* 88(5):439-447.

216. Barber PR, Locke RJ, Pierce GP, Rothkamm K, & Vojnovic B (2007) Gamma-H2AX foci counting: image processing and control software for high-content screening. pp 64411M-64411M-64410.
217. Qvarnstrom OF, Simonsson M, Johansson KA, Nyman J, & Turesson I (2004) DNA double strand break quantification in skin biopsies. *Radiother Oncol* 72(3):311-317.
218. Herbert AD, Carr AM, & Hoffmann E (2014) FindFoci: a focus detection algorithm with automated parameter training that closely matches human assignments, reduces human inconsistencies and increases speed of analysis. *PloS one* 9(12):e114749.
219. Levy N, *et al.* (2006) XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage. *Nucleic acids research* 34(1):32-41.
220. Chou WC, *et al.* (2008) Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair. *EMBO J* 27(23):3140-3150.
221. Azzam EI, Jay-Gerin JP, & Pain D (2012) Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters* 327(1-2):48-60.
222. Lucero H, Gae D, & Taccioli GE (2003) Novel localization of the DNA-PK complex in lipid rafts: a putative role in the signal transduction pathway of the ionizing radiation response. *The Journal of biological chemistry* 278(24):22136-22143.
223. Bollinger CR, Teichgraber V, & Gulbins E (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochimica et biophysica acta* 1746(3):284-294.
224. Paull TT (2015) Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem* 84:711-738.
225. Bhatti S, *et al.* (2011) ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cell Mol Life Sci* 68(18):2977-3006.
226. Chen BP, Li M, & Asaithamby A (2012) New insights into the roles of ATM and DNA-PKcs in the cellular response to oxidative stress. *Cancer Lett* 327(1-2):103-110.
227. Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, & Paull TT (2010) ATM activation by oxidative stress. *Science* 330(6003):517-521.
228. Guo Z, Deshpande R, & Paull TT (2010) ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell cycle* 9(24):4805-4811.
229. Cosentino C, Grieco D, & Costanzo V (2011) ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *EMBO J* 30(3):546-555.
230. Alexander A, *et al.* (2010) ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(9):4153-4158.
231. Watters D, *et al.* (1999) Localization of a portion of extranuclear ATM to peroxisomes. *The Journal of biological chemistry* 274(48):34277-34282.
232. Zhang J, *et al.* (2015) ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS. *Nature cell biology* 17(10):1259-1269.
233. Alexander A & Walker CL (2010) Differential localization of ATM is correlated with activation of distinct downstream signaling pathways. *Cell cycle* 9(18):3685-3686.
234. Ditch S & Paull TT (2012) The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. *Trends Biochem Sci* 37(1):15-22.
235. Itoh K, *et al.* (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications* 236(2):313-322.
236. Hirotsu Y, *et al.* (2012) Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic acids research* 40(20):10228-10239.
237. Singh B, Chatterjee A, Ronghe AM, Bhat NK, & Bhat HK (2013) Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via NRF2 induction is associated with inhibition of oxidative DNA damage in estrogen-induced breast cancer. *BMC cancer* 13:253.

-
238. Kim SB, *et al.* (2012) Targeting of Nrf2 induces DNA damage signaling and protects colonic epithelial cells from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(43):E2949-2955.
239. Dhenaut A, Boiteux S, & Radicella JP (2000) Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle. *Mutation research* 461(2):109-118.
240. Lee EK, *et al.* (2013) Low-dose radiation activates Nrf1/2 through reactive species and the Ca(2+)/ERK1/2 signaling pathway in human skin fibroblast cells. *BMB reports* 46(5):258-263.
241. Dames SA, Mulet JM, Rathgeb-Szabo K, Hall MN, & Grzesiek S (2005) The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *The Journal of biological chemistry* 280(21):20558-20564.
242. Perry JJ & Tainer JA (2011) All stressed out without ATM kinase. *Sci Signal* 4(167):pe18.
243. Lovejoy CA & Cortez D (2009) Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA repair* 8(9):1004-1008.
244. Li M, *et al.* (2014) The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase is required for cellular resistance to oxidative stress independent of DNA double-strand break repair. *Free Radic Biol Med* 76:278-285.
245. Zhou Y, *et al.* (2017) Regulation of the DNA Damage Response by DNA-PKcs Inhibitory Phosphorylation of ATM. *Molecular cell* 65(1):91-104.
246. Maier P, Wenz F, & Herskind C (2014) Radioprotection of normal tissue cells. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]* 190(8):745-752.
247. Kuefner MA, *et al.* (2012) Effect of antioxidants on X-ray-induced gamma-H2AX foci in human blood lymphocytes: preliminary observations. *Radiology* 264(1):59-67.
248. Drubay D, Caer-Lorho S, Laroche P, Laurier D, & Rage E (2015) Mortality from Circulatory System Diseases among French Uranium Miners: A Nested Case-Control Study. *Radiation research* 183(5):550-562.
249. Kreuzer M, *et al.* (2010) Radon and risk of death from cancer and cardiovascular diseases in the German uranium miners cohort study: follow-up 1946-2003. *Radiat Environ Biophys* 49(2):177-185.
250. Villeneuve PJ, Lane RS, & Morrison HI (2007) Coronary heart disease mortality and radon exposure in the Newfoundland fluorspar miners' cohort, 1950-2001. *Radiat Environ Biophys* 46(3):291-296.
251. Falkenbach A, Kovacs J, Franke A, Jorgens K, & Ammer K (2005) Radon therapy for the treatment of rheumatic diseases--review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Rheumatology international* 25(3):205-210.
252. Herold M & Lind-Albrecht G (2008) [Radon within therapeutic strategies of ankylosing spondylitis]. *Wiener medizinische Wochenschrift* 158(7-8):209-212.
253. Franke A & Franke T (2013) Long-term benefits of radon spa therapy in rheumatic diseases: results of the randomised, multi-centre IMuRa trial. *Rheumatology international* 33(11):2839-2850.
254. Hintz L (2016) 53BP1-Foci-Analysen zum biologischen Nachweis Radon-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche im Mausmodell. Masterarbeit (Technische Universität Darmstadt).
255. Schäfer RR (2014) Biodosimetrie in murinen Gewebe nach α -Teilchen-Bestrahlung. Bachelorarbeit (Technische Universität Darmstadt).
256. Harley JH, Jetter ES, & Nelson N (1994) Elimination of radon from the body. *Environment International* 20(5):573-584.

257. Khursheed A (2000) Doses to systemic tissues from radon gas. *Radiation protection dosimetry* 88(2):p. 171-181.
258. Paquet F, *et al.* (2015) ICRP Publication 130: Occupational Intakes of Radionuclides: Part 1. *Annals of the ICRP* 44(2):5-188.
259. ICRP (1994) ICRP Publication 66: Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. *Ann. ICRP* 24 (1-3).
260. Wang J, *et al.* (2016) Establishment of a gamma-H2AX foci-based assay to determine biological dose of radon to red bone marrow in rats. *Scientific reports* 6:30018.
261. Ding D, *et al.* (2016) gamma-H2AX/53BP1/pKAP-1 foci and their linear tracks induced by in vitro exposure to radon and its progeny in human peripheral blood lymphocytes. *Scientific reports* 6:38295.
262. Maier A (2017) Personal Communication.
263. Lukas C, *et al.* (2011) 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nature cell biology* 13(3):243-253.
264. Trassierra CV, Stabile L, Cardellini F, Morawska L, & Buonanno G (2016) Effect of indoor-generated airborne particles on radon progeny dynamics. *Journal of hazardous materials* 314:155-163.
265. Sternkopf S (2016) Dosisbeitrag von Radonzerfallsprodukten in der Lunge. Bachelorarbeit (Goethe Universität Frankfurt am Main).
266. Keffer J, *et al.* (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10(13):4025-4031.
267. Saxne T, Palladino MA, Jr., Heinegard D, Talal N, & Wollheim FA (1988) Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis and rheumatism* 31(8):1041-1045.
268. Di Giovine FS, Nuki G, & Duff GW (1988) Tumour necrosis factor in synovial exudates. *Annals of the rheumatic diseases* 47(9):768-772.
269. Wilkens D (2016) Vergleichende 53BP1-Foci-Analyse Strahlen-induzierter DAN-Doppelstrangbrüche in Wildtyp-Mäusen und hTNFa-Mäusen. Bachelorarbeit (Technische Universität Darmstadt).
270. Sakoda A, *et al.* (2010) Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Inhaled Radon to Calculate Absorbed Doses in Mice, Rats, and Humans. *Journal of Nuclear Science and Technology* 47(8):731-738.
271. Harley NH & Robbins ES (1992) 222Rn Alpha Dose to Organs Other than Lung. *Radiation protection dosimetry* 45(1-4):619-622.
272. Sakoda A, *et al.* (2012) Lung dosimetry of inhaled radon progeny in mice. *Radiat Environ Biophys* 51(4):425-442.
273. ICRP (2010) ICRP Publication 115: Lung Cancer Risk from Radon and Progeny and Statement on Radon. *Ann. ICRP* 40(1).
274. Muller WU, *et al.* (2016) Current knowledge on radon risk: implications for practical radiation protection? radon workshop, 1/2 December 2015, Bonn, BMUB (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit; Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation, Building and Nuclear Safety). *Radiation and environmental biophysics* 55(3):267-280.

8. Anhang

8.1. Makros zur Bestimmung der X,Y,Z-Koordinaten von Zellen und γ H2AX-Foci in Stapelaufnahmen

Die Koordinatenbestimmung der γ H2AX-Foci erfolgte mit dem Makro „Foci Tool“; die der Zellkerne mit dem Macro „Zellen Tool“. Der Code für diese Makros wurde von R. Weimer für das Programm ImageJ geschrieben und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Bei beiden Makros werden per Mausklick im Bild die entsprechenden Pixelwerte (X-, Y-Koordinate) sowie die Bildebene (Z-Koordinate) erfasst und in einem separaten Fenster ausgegeben. Gleichzeitig erscheint im Bild eine Kreismarkierung (Foci Tool) oder eine quadratische Markierung (Zellen Tool) um die ausgegebene Koordinate. Um die Zählung der dicht liegenden Zellkerne in der Retina vereinfachen sowie eine doppelte Zählung der Zellkerne ausschließen, war die Markierung des Zellen Tools in allen Bildebenen sichtbar.

```
A macro "Foci Tool - C0a0L18f8L818f" {  
    getCursorLoc(x, y, z, flags);  
    print("Koordinaten: "+x+" "+y+" "+z+1);  
        setColor(150, 150, 150);  
    drawOval(x-5, y-5, 10, 10);  
        arg="width="+ (10)+ " height="+ (10)+ " x="+x+" y="+y+" oval centered";  
        run("Specify...", arg);  
}
```

```
B macro "Zellen Tool - C037T1d16Z" {  
    getCursorLoc(x, y, z, flags);  
    print("Koordinaten: "+x+" "+y+" "+z+1);  
    Overlay.drawRect(x-5, y-5, 10, 10);  
        setColor(0, 150, 0);  
    Overlay.show;  
}
```

Code 1: Makro zur Ausgabe von Pixelkoordinaten (X,Y,Z) in einer Stapelaufnahme. Mit dem jeweiligen Tool werden bei Mausklick im Bild einer Stapelaufnahme die Pixelwerte (X-, Y-Koordinate) sowie die Focusebene (Z-Koordinate) in einem separaten „Log“-Fenster ausgegeben. Bei Verwendung des „Foci Tools“ wird ein hellgraues Oval eingezeichnet, welches nur in dieser Bildebene sichtbar ist. Im Gegensatz dazu wird bei der Verwendung des „Zellen Tools“ ein hellgraues Quadrat eingezeichnet, welches in allen Bildebenen sichtbar ist. Der Code für die Makros wurde von R. Weimer geschrieben und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

8.2. Physikalische Berechnung der Dosisdeposition von Schwerionen

Das *Local Effect Model* (LEM) wurde von M. Scholz und G. Kraft entwickelt, um die biologischen Effekte einer Bestrahlung mit Schwerionen anhand von biologischen Studien mit konventioneller Röntgenstrahlung (beispielsweise Überlebenskurven) vorherzusagen (171). Dabei wird zugrunde gelegt, dass unabhängig von der Strahlenqualität eine äquivalente, lokale Dosis zum gleichen biologischen Effekt führt. Die Bestimmung der lokalen Dosis bei einer Bestrahlung mit Schwerionen beruht auf dem amorphen Bahnstrukturmodell (162, 169, 170). Es beschreibt die Energiedeposition als Funktion des radialen Abstandes zur Trajektorie des Ions. Lediglich im Zentrum der Bahnstruktur wird eine konstante Energiedeposition angenommen, um die Diffusion erzeugter Radikale zu berücksichtigen. Dieser wird bei den verwendeten Ionen mit einem Radius (R_C) von 5,5 nm (0,8 GeV/u Titan-Ionen), 5,7 nm (1 GeV/u Titan- bzw. Nickel-Ionen) angegeben (142). Die Dichte wurde bei allen Berechnungen als 1 g/cm² angenommen.

Die Energiedeposition (Dosis) als Funktion des radialen Abstandes zum Ionendurchgang ist wie folgt definiert:

$$R_C = 0,0055 \text{ oder } 0,0057 \text{ } (\mu\text{m}) \quad (1)$$

$$R_P = 0,05 \left(\frac{E}{A} \right)^{1,7} \text{ } (\mu\text{m}) \quad (2)$$

E Energie (MeV)
 A Atommasse (u)

$$D_P(r) = \frac{1}{\pi r^2} \left(\frac{LET}{\rho(1 + 2 * \ln(\frac{R_P}{R_C}))} \right) \text{ } (Gy) \quad (3a)$$

ρ Dichte (g/cm²)
 LET Linearer Energietransfer (keV/μm)
 r Radius (μm)
 R_C Core Radius (μm) definiert in Formel 1
 R_P Penumbra Radius (μm) definiert in Formel 2

Um die Energiedeposition in den bei der biologischen Analyse gewählten Kategorien zu berechnen, wurde die Formel 3a nach dr und $d\varphi$ integriert sowie auf die Fläche eines Kreissegmentes normiert. Die resultierende Formel ist:

$$D_p^*(r) = \frac{2 \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)}{\pi (r_2^2 - r_1^2)} \left(\frac{LET}{p(1 + 2 * \ln\left(\frac{R_p}{R_c}\right))} \right) \text{ (Gy)} \quad (3b)$$

- ρ Dichte (g/cm^2)
- LET Linearer Energietransfer ($\text{keV}/\mu\text{m}$)
- r Radius (μm)
- R_c Core Radius (μm) definiert in Formel 1
- R_p Penumbra Radius (μm) definiert in Formel 2

Trotz der inhomogenen Energiedeposition von Ionen kann die mittlere Energie (Dosis), die bei einer Bestrahlung mit einer definierten Fluenz in der Materie deponiert wird, berechnet werden. Sie ist wie folgt definiert:

$$D = 1,602 * 10^{-9} * LET * F * \frac{1}{p} \text{ (Gy)} \quad (4)$$

- ρ Dichte (g/cm^2)
- LET Linearer Energietransfer ($\text{keV}/\mu\text{m}$)
- F Fluenz (cm^{-2})

8.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Johanna Mirsch
Geburtstag: 24. März 1988
Geburtsort: Darmstadt

Promotion

seit 10/2012 Technische Universität Darmstadt
Fachbereich Biologie
Arbeitsgruppe: Strahlenbiologie und DNA-Reparatur, Prof. Dr. M. Löbrich

Studium

10/2010 – 10/2012 Master of Science in *Biomolecular Engineering*
abgeschlossen mit Auszeichnung (Note 1,0),
Technische Universität Darmstadt

10/2007 - 08/2010 Bachelor of Science in Biotechnologie
abgeschlossen mit Auszeichnung (Note 1,2), Hochschule Darmstadt

Schulbildung

08/1998 - 07/2007 Bernhard-Adelung-Schule & Bertolt-Brecht-Schule, Darmstadt
Abschluss: Abitur

08/1994 - 07/1998 Schillerschule in Darmstadt

8.4. Publikationen, Tagungsbeiträge und Auszeichnungen

Publikationen (peer-reviewed)

Mirsch J, Tommasino F, Frohns A, Conrad S, Durante M, Scholz M, Friedrich T, Löbrich M.
"Direct measurement of the 3-dimensional DNA lesion distribution induced by energetic charged particles in a mouse model tissue"
Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Oct 6;112(40):12396-401. PMID: 26392532 [PubMed]

Reichert S, Rödel C, Mirsch J, Harter PN, Tomicic MT, Mittelbronn M, Kaina B, Rödel F.
"Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma"
Radiother Oncol. 2011 Oct;101(1):51-8. PMID: 21852011 [PubMed]

Rödel F, Reichert S, Sprenger T, Gaipf US, Mirsch J, Liersch T, Fulda S, Rödel C.
"The role of survivin for radiation oncology: moving beyond apoptosis inhibition"
Curr Med Chem. 2011;18(2):191-9. Review. PMID: 21110807 [PubMed]

GSI Scientific Report

M. Steinlage, J. Mirsch, R. Schäfer, C. Fournier, M. Löbrich (2014)
"Biodosimetrie of alpha-particles-induced DNA double-strand breaks in murine bone and soft tissue"

M. Steinlage, J. Mirsch, S. Conrad, C. Fournier, G. Taucher-Scholz and M. Löbrich (2013)
"Visualization of DNA double-strand breaks induced by high LET particles and X-rays in murine bones and soft tissues"

J. Mirsch, A. Frohns, A. Maier, M. Scholz, G. Taucher-Scholz, S. Conrad and M. Löbrich (2012)
"Biodosimetry of heavy-ion induced DNA double-strand breaks in murine tissues"

S. Conrad, J. Mirsch, and M. Löbrich (2011)
"Repair of heavy-ion induced DNA double-strand breaks in mice models"

Konferenzbeiträge:

J. Mirsch, N. Lengert, R. Weimer, B. Drossel, M. Löbrich

"Efficient DSB repair after low irradiation doses requires a critical cellular radical level"

Posterpräsentation, 42. Jahrestagung der Radiation Research Society in Hawaii, USA (2016)

L. Hintz, M. Steinlage, R. Schäfer, A. Maier, G. Kraft, C. Fournier, J. Mirsch, M. Löbrich

"Biodosimetry of radon-induced DNA double-strand breaks in mice"

Vortrag, 19. Jahrestagung der GBS in Erlangen (2016)

L. Hintz, M. Steinlage, R. Schäfer, A. Maier, G. Kraft, C. Fournier, J. Mirsch, M. Löbrich

"Biodosimetry of radon-induced DNA double-strand breaks in mice"

Posterpräsentation, 18. Jahrestagung der GBS in Dresden (2015)

J. Mirsch, F. Tommasino, T. Friedrich, A. Frohns, S. Conrad, M. Scholz, M. Löbrich

"Dose delivered by δ -electrons of high-LET radiation decreases with the square of the distance to the ion trajectory"

Posterpräsentation, 15. Internationale Konferenz der Radiation Research in Kyoto, Japan (2015)

J. Mirsch, F. Tommasino, T. Friedrich, A. Frohns, M. Durante, S. Conrad, M. Scholz, M. Löbrich

"Does low dose matter? – Distribution of DNA double strand breaks induced by δ - electrons of high LET radiation"

Posterpräsentation, 17. Jahrestagung der GBS in Tübingen (2014)

J. Mirsch, A. Frohns, M. Scholz, A. Maier, S. Conrad, M. Löbrich

"Repair of DNA double strand breaks induced by δ - electrons of high LET radiation – Does low dose matter?"

Vortrag und Posterpräsentation, Heavy Ion in Therapy and Space Radiation Symposium in Chiba, Japan (2013)

J. Mirsch, F. Tommasino, T. Friedrich, A. Frohns, S. Conrad, M. Scholz and M. Löbrich

"Does low dose matter? – Distribution and repair of DNA double strand breaks induced by δ - electrons of high LET radiation"

Posterpräsentation, 16. Jahrestagung der GBS in Darmstadt (2013)

J. Mirsch, A. Frohns, F. Frohns, G. Taucher-Scholz, S. Conrad, M. Löbrich

"Biodosimetric analysis of the radial dose distribution around heavy ion tracks in mouse tissue"

Posterpräsentation, 15. Jahrestagung der GBS in München (2012)

Auszeichnungen:*Young Investigator Award*

verliehen von der *European Radiation Society* anlässlich der 15. Internationalen Konferenz der Radiation Research in Kyoto, Japan (2014)

NASA Space Radiation Summer School

Teilnahme an der *NASA Space Radiation Summer School*, Brookhaven, USA (2014)

Reisestipendium

verliehen durch die GBS anlässlich der 17. Jahrestagung in Tübingen (2014)

8.5. Eigen- und Fremdbeiträge der Arbeit

Projekt 1: Biodosimetrie (Titan-Ionen)

Für die Experimente wurden die Retina-Explantate von A. Frohns präpariert. Alle weiteren Schritte des Experimentes sowie dessen Analyse wurde ausschließlich von mir vorgenommen. Die physikalische Berechnung der Dosisdeposition wurde mit der Hilfe von T. Friedrich vorgenommen (siehe Anhang, Kapitel 8.2). Weiterhin kam die Idee den analysierten Bereich des Gewebeschnittes in Form von Voxel darzustellen, um die Auflösung der Analyse zu verbessern, von F. Tommasino, T. Friedrich und M. Scholz. Diese Idee wurde basierend auf meinen experimentellen Daten gemeinsam umgesetzt (Abb. 14).

Projekt 2: *LowDose*-Effekt

Die Experimente bei denen HOMS1-Zellen mit H_2O_2 behandelt wurden, wurden von R. Weimer durchgeführt und von mir ausgewertet (Abb. 18). Darüber hinaus unterstützte R. Weimer die Durchführung aller Experimente, da viele Proben gleichzeitig behandelt werden mussten, um deren Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Abgesehen davon wurden alle weiteren Schritte des Experimentes sowie dessen Analyse ausschließlich von mir vorgenommen

Projekt 3: Biodosimetrie (Radon)

Für dieses Projekt habe ich die Experimente geplant und den für deren Durchführung benötigten Tierversuchsantrag beim Regierungspräsidium Darmstadt gestellt. Die Durchführung der Experimente wurde von M. Steinlage bzw. L. Hintz unterstützt, da es sich in der Regel um große und aufwendige Experimente mit mehreren Mäusen handelte. Die Quantifizierung der DSBs bzw. Auswertung der Experimente erfolgte durch R. Schäfer im Rahmen Ihrer Bachelorarbeit (Abb. 23) und von L. Hintz im Rahmen Ihrer Masterarbeit (Abb. 23-25, 27), die von mir betreut wurde. L. Hintz schloss ihre Arbeit im März 2016 ab und setzte Ihre Arbeit an diesem Thema als Doktorandin unter meiner Betreuung fort. In diesem Zeitraum vervollständigte Sie einige Auswertungen (Abb. 25, 27) und führte erste Experimente mit MEF-Zellen durch (Abb. 26). Darüber hinaus wurde von mir unsere technische Assistentin B. Basso eingearbeitet. In Rücksprache mit mir führte sie ebenfalls Färbungen von Gewebe durch und quantifizierte die Anzahl der DSBs (Abb. 23, 28). Obwohl die Quantifizierung der DSBs nicht von mir durchgeführt wurde, oblag mir die Interpretation der Ergebnisse und die entsprechende Weiterentwicklung des Projektes. Darauf aufbauend sowie im Gespräch mit Prof. Löbrich verfasste ich den Antrag unseres Teilprojektes für die Projektverlängerung des Verbundes GREWIS, in der ich meine Ideen umsetzen konnte.

8.6. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 3. Februar 2017

.....
(Johanna Mirsch)

8.7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für die nie endende Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung in dieser Zeit. Weiterhin möchte ich mich für das entgegenbrachte Vertrauen bei der Koordination und Leitung unseres Projektes im Verbund GREWIS bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Bodo Laube möchte ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die Unterstützung und die freundliche Atmosphäre bedanken. Besonderer Dank gilt unseren TAs Bettina, Christel und Conny für ihre Unterstützung im Laboralltag sowie Antonia, Ratna, Monika und Lisa für ihre tolle Unterstützung bei der Durchführung von Strahlzeiten an der GSI bzw. großen Experimenten. Bei Bettina und Lisa möchte ich mich zusätzlich für die zahlreichen Stunden bedanken, in denen sie die Gewebeschnitte der Radonexperimente am Mikroskop auswerteten. In diesem Kontext möchte ich mich auch bei den GREWIS-Partnern für die gute Zusammenarbeit bedanken, sodass die Radonexperimente - trotz der Beteiligung vieler Gruppen - immer reibungslos durchgeführt werden konnten.

Bei Thomas, Francesco und Michael möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Biodosimetrie Projekt bedanken. Besonderer Dank gilt Thomas für seine Bereitschaft auch am Wochenende und zu fortgeschrittener Stunde noch meine Fragen zu beantworten und physikalische Zusammenhänge zu erklären.

Bei Nicor möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im *LowDose*-Projekt bei der Etablierung der computergestützten Software bedanken, obwohl du zwischenzeitlich wahrscheinlich auch keine Foci mehr sehen konntest.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Korrekturlesern, die dafür gesorgt haben, dass diese Arbeit weniger unsinnige Sätze und Rechtschreibfehler enthält! Vielen Dank!!!

Ein besonders großes Dankeschön möchte ich an Lucie und Ratna richten. Vielen Dank, dass ihr immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Probleme hattet und mich bei deren "Lösung" unterstützt habt. Weiterhin möchte ich mich bei Anke und Thomas für die guten Gespräche bedanken, die mir häufig geholfen haben so manche Sachen auch mal aus einem anderen Blickwinkel zusehen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden für ihre umfassende Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Promotion. Bei meiner Mutter und Tim möchte ich mich für ihre Geduld mit mir bedanken, ihr Vertrauen in mich und dafür, dass sie immer hinter mir stehen und mich auffangen.

