

Aus dem  
Bundesamt für Strahlenschutz, Neuherberg  
Fachbereich Strahlenschutz und Gesundheit  
(Präsident: W. König)

Angefertigt unter der Leitung von Dr. U. Rössler

Vorgelegt über Prof. Dr. M. Stangassinger  
Lehrstuhl für Physiologie am Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Nachweis geringer strahleninduzierter DNA-Schäden  
mittels automatisierter Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

**Vanessa Schulz**

aus Ratingen

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Stangassinger
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Hirschberger

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meinen Eltern  
In Liebe und Dankbarkeit

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1	DNA und DNA-Schäden .....	3
2.1.1	Der Aufbau der DNA .....	3
2.1.2	Modifikationen der Chromatinstruktur.....	5
2.1.3	Schädigung der DNA.....	7
2.1.3.1	Quellen von DNA-Schäden .....	7
2.1.3.2	Auswirkungen ionisierender Strahlung auf die DNA.....	9
2.1.3.3	DNA-Doppelstrangbrüche.....	10
2.1.4	Die DNA-Schadensantwort in eukaryotischen Zellen.....	11
2.1.5	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in eukaryotischen Zellen.....	14
2.2	Gamma-H2AX.....	17
2.2.1	Das Histon H2AX und seine Modifikation .....	17
2.2.2	Die Phosphorylierung von H2AX und seine Rolle in der DNA-Schadensantwort.....	19
2.2.3	Darstellung und Quantifizierung von $\gamma$ H2AX: Technische Möglichkeiten zur Auswertung von $\gamma$ H2AX-Foci.....	23
<b>3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
4.1	Materialien und Geräte .....	26
4.1.1	Chemikalien und Reagenzien .....	26
4.1.2	Zellkulturmedien und Zusätze .....	27
4.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	27
4.1.4	Antikörper.....	28
4.1.5	Lösungen und Puffer .....	28
4.1.6	Vollautomatisches Bildanalyse-System .....	29
4.1.7	Geräte.....	30
4.2	Methoden .....	31

4.2.1	Gewinnung von humanem Vollblut .....	31
4.2.2	Zellbiologische Methoden .....	31
4.2.2.1	Gewinnung von primären Lymphozyten durch Ficoll-Dichtegradienten- Zentrifugation .....	31
4.2.2.2	Kryokonservierung von primären Lymphozyten .....	33
4.2.2.3	Auftauen und Kultivierung von primären Lymphozyten .....	33
4.2.3	Bestrahlung von Zellen mit ionisierender Strahlung .....	34
4.2.3.1	Bestrahlung von Zellen mit einer <sup>137</sup> Cs-Quelle .....	34
4.2.3.2	Bestrahlung von Zellen mit einer Röntgenquelle .....	34
4.2.4	Inkubation und Fixierung von primären Lymphozyten.....	35
4.2.5	Aufbringen von primären Lymphozyten auf Objektträger.....	36
4.2.5.1	Zentrifugieren der Zellen auf Objektträger („Zytospin“).....	36
4.2.5.2	Einbettung von Zellen in Agarose .....	37
4.2.5.3	Auftropfen von Zellen .....	37
4.2.6	Immunfluoreszenzfärbung.....	38
4.2.7	Quantifizierung von $\gamma$ H2AX-Foci .....	39
4.2.8	Untersuchungsmaterial von Strahlentherapiepatienten .....	40
4.2.9	Statistische Methoden und Auswertung .....	41
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
5.1	Optimierung der vollautomatischen Quantifizierung von $\gamma$ H2AX-Foci in Lymphozyten mit der Software Metafer4 von MetaSystems .....	42
5.1.1	Methodische Optimierungen .....	42
5.1.1.1	Optimierung der Inkubationsbedingungen .....	42
5.1.1.2	Optimierung der Fixierung von Lymphozyten auf Objektträgern.....	43
5.1.2	Optimierung der Messeinstellungen von Metafer4 für eine vollautomatische Quantifizierung von $\gamma$ H2AX.....	45
5.1.3	Optimierung durch die Auswahl unterschiedlich hoch auflösender Objektive .....	54
5.1.4	Vergleich der Messeinstellungen 3-1-5 und 5-1-10 in verschiedenen Dosisbereichen.....	56
5.1.5	Ermittlung von Nachweisgrenzen des für die Quantifizierung von $\gamma$ H2AX ptimierten Bildanalysesystems Metafer.....	59

5.1.5.1	Nachweis von $\gamma$ H2AX im Dosisbereich von 0,1 bis 10 Gy .....	59
5.1.5.2	Nachweis von $\gamma$ H2AX im Dosisbereich von 0,01 bis 2 Gy .....	63
5.2	Nachweis kleiner strahleninduzierter DNA-Schäden mittels der $\gamma$ H2AX-Analyse in Lymphozyten von different strahlenempfindlichen Strahlentherapiepatienten .....	65
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>71</b>
6.1	Quantifizierung von DNA-Schäden anhand von $\gamma$ H2AX-Foci .....	71
6.2	Diskussion der methodischen Optimierungen anhand der Testung von bestrahlten Lymphozyten .....	72
6.2.1	Optimierung der Inkubationsbedingungen .....	72
6.2.2	Optimierung der Fixierung der Testzellen auf Objektträgern .....	73
6.3	Optimierung der vollautomatischen Quantifizierung von $\gamma$ H2AX-Foci mit dem Bildanalyzesystem Metafer.....	74
6.3.1	Vorteile eines höher auflösenden Objektivs.....	74
6.3.2	Vergleichende Betrachtung der publizierten Untersuchungen über die manuelle und automatische Quantifizierung von $\gamma$ H2AX-Foci .....	75
6.4	Nachweis kleiner strahleninduzierter DNA-Schäden mittels der $\gamma$ H2AX-Analyse in Lymphozyten von different strahlenempfindlichen Strahlentherapiepatienten .....	82
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>11</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>12</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>114</b>

# 1 Einleitung

Die genetische Information eukaryotischer Lebewesen wird durch die spezifische Abfolge der Basenpaare innerhalb der DNA (*deoxyribonucleic acid*) gespeichert. Die Erbsubstanz unterliegt jedoch permanenten Angriffen durch exogene und endogene Noxen, die in der Lage sind, ihre molekulare Struktur zu verändern und auf diese Weise ihre Stabilität zu gefährden. Ionisierende Strahlung oder bestimmte Chemikalien, fehlerhaft replizierte DNA sowie Produkte des intrazellulären Metabolismus, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), erzeugen DNA-Schäden vielfältiger Natur. Die induzierten Läsionen können zytotoxische oder auch mutagene Eigenschaften besitzen und die Produktion, Struktur und Funktion zellulärer Proteine beeinflussen. Kommt es in einer Zelle durch Schädigung der DNA zum Verlust der genetischen Stabilität, sind Mutationen, neoplastische Transformationen oder der Zelltod mögliche Folgen. In multizellulären Organismen kann die Fehlfunktion oder maligne Transformation von Zellen u.a. die Entstehung von Krebserkrankungen begünstigen oder auch in einer Immundefizienz resultieren (Abraham, 2001). Unter den verschiedenen Typen von DNA-Schäden, die innerhalb einer Zelle auftreten können, sind DNA-Doppelstrangbrüche (DNA double-strand breaks, DNA-DSBs) die schwerwiegendsten. Ihre Reparatur ist problematisch und kann, sollte sie fehlerhaft ablaufen, zum Zelltod führen oder die Entstehung von Mutationen mit höchst divergierenden funktionellen Auswirkungen begünstigen.

Eine neuartige Methode, mit der DNA-Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden können, ist der so genannte  $\gamma$ H2AX-Assay. Er beruht auf der Detektion des Histons H2AX, welches nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen phosphoryliert und dann als  $\gamma$ H2AX bezeichnet wird. Dabei bilden sich durch Akkumulation dieser induzierten Proteinvariante an den DNA-Doppelstrangbrüchen subnukleäre Strukturen aus, die mikroskopisch nach Fluoreszenzfärbung als distinkte Punkte oder so genannte „ $\gamma$ H2AX-Foci“ zu erkennen sind und somit quantifiziert werden können (Rogakou et al., 1999). Da die Zahl der  $\gamma$ H2AX-Foci mit der Menge der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche korreliert, ist es möglich, durch das Auszählen der Foci die Anzahl der Doppelstrangbrüche in Zellen zu ermitteln.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den  $\gamma$ H2AX-Assay als neuartige und besonders sensitive Methode zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen so zu optimieren, dass in Zukunft eine größere Zahl von Proben relativ rasch und mit einer hohen Reproduzierbarkeit untersucht werden kann. In Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Strahlenschutz (Bundesamt Für Strahlenschutz (Bfs)) sollte daher die  $\gamma$ H2AX-Analyse möglichst automatisiert etabliert und auf ihre Eignung zur Detektion sehr geringer DNA-Schäden untersucht werden. Als bekanntermaßen schädigendes Agens wurde zur Induktion von Doppelstrangbrüchen ionisierende Strahlung (Photonenstrahlung) eingesetzt. Da der Nachweis von  $\gamma$ H2AX an humanen Lymphozyten sowohl in der Literatur einschlägig beschrieben ist (Löbrich et al., 2005; Sak et al., 2007; Redon et al., 2008; Rube et al., 2008), als auch am Bfs labortechnisch gut etabliert werden konnte, sollte an diesem humanen Zellsystem die Methode optimiert und sensitiviert werden. Dabei bestand das Fernziel darin, den Zeitaufwand, ausgerichtet auf einen hohen Probendurchsatz, zu minimieren und die hohe Variabilität der manuellen Probenauswertung zu eliminieren. Dazu wurde eine effiziente und effektive Automatisierung der Probenanalyse an einem vollautomatischen Bildanalysesystem angestrebt.

Zusätzlich zur Ermittlung der Sensitivitätsgrenze der Methode bei vollautomatischer Probenauswertung durch das Bildanalysesystem Metafer sollte die Sensitivität des  $\gamma$ H2AX-Assays anhand eines praktischen Anwendungsbeispiels untersucht werden. Dabei wurde geprüft, ob mit Hilfe des Nachweises von  $\gamma$ H2AX die Auftrennung von Lymphozyten in zwei Subpopulationen möglich ist, wobei sich die verwendeten Zellen bei identischer Noxe nur durch geringe Abweichungen in den induzierten DNA-Schäden bzw. deren Reparaturaufwendungen voneinander unterscheiden sollten. Dazu wurde der  $\gamma$ H2AX-Assay an einem Probenkollektiv von klinisch deutlich strahlenempfindlichen bzw. klinisch nicht strahlenempfindlichen Strahlentherapiepatienten angewandt und vollautomatisch an dem für die Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci optimierten Bildanalysesystem ausgewertet.

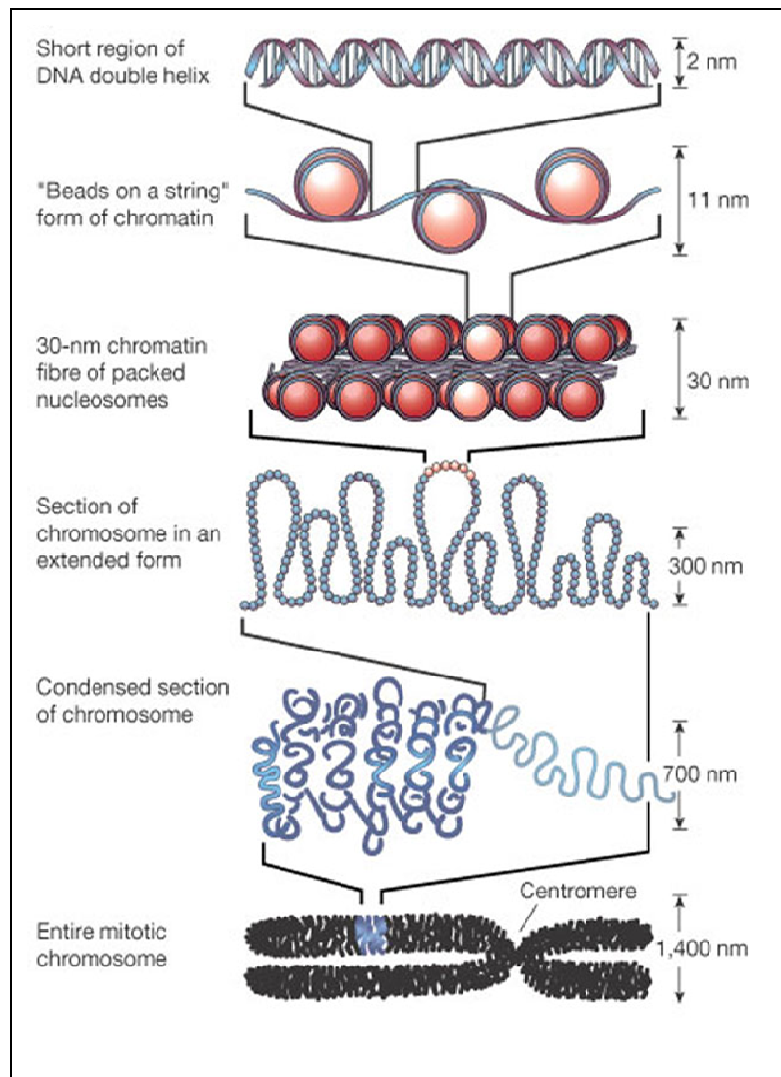


## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 DNA und DNA-Schäden**

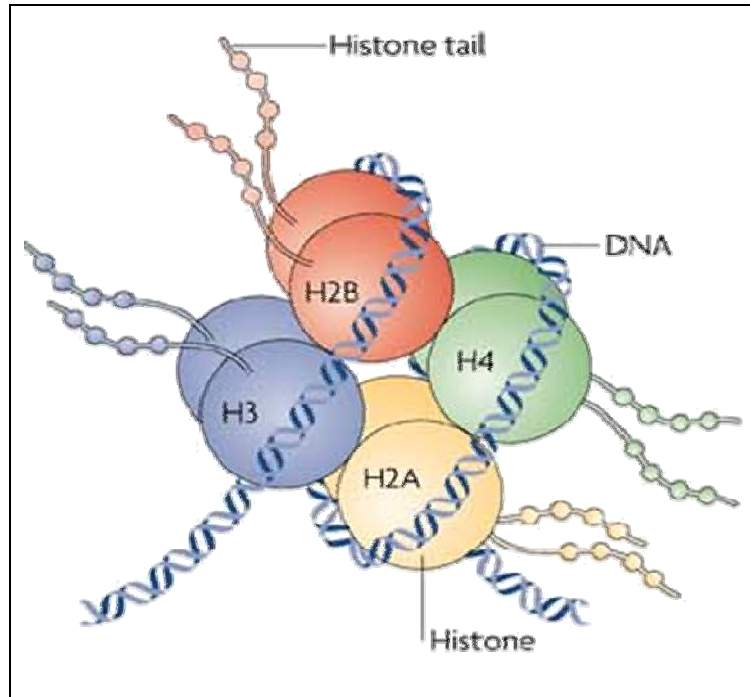
#### **2.1.1 Der Aufbau der DNA**

In Eukaryoten liegt die DNA hoch kondensiert vor, so dass sie in Form des Chromatins im Zellkern Platz findet. Die kleinste Untereinheit des Chromatins bilden die Nukleosome (Luger et al., 1997; Kornberg und Lorch, 1999). In diesen 100 kDa großen Proteinkomplexen (Luger, 2003) sind 146 Basenpaare der DNA 1,7-mal in einer linksgängigen superhelikalen Windung um ein zentrales Histon-Oktamer gewunden (Kornberg, 1974; Noll, 1974) (s. Abb. 2.2). Dieses setzt sich wiederum aus je 2 Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammen (Luger et al., 1997). Dabei sind zwei H2A-H2B Dimere und ein H3-H4 Tetramer zu einem Histon-Oktamer zusammengefügt. Jedes dieser sog. Core-Histone weist eine flexible N-terminale Domäne auf, die über die beiden superhelikalen Windungen der DNA des Nukleosoms herausragt. Histon-Histon Interaktionen innerhalb der nukleosomalen DNA werden von einer C-terminalen Domäne vermittelt (Pruss et al., 1995). Die einzelnen Nukleosome werden durch 10-60 DNA-Basenpaare sog. Linker-DNA verbunden, was eine perlenschnurartige Struktur ergibt (s. Abb. 2.1). Diese wird zu einer stärker kondensierten Faser aufgefaltet und durch die Bindung eines Linker-Histons, welches der Histonfamilie H1 angehört (Hansen, 2002; Redon et al., 2002), zum Nukleosomen-Core stabilisiert. In weiteren Kondensationsschritten entstehen die 100-400 nm dicken Inter- oder Metaphase-Chromosomstrukturen.



**Abbildung 2.1 Die Organisation der DNA innerhalb der Chromatinstruktur (nach Felsenfeld und Groudine, 2003)**

Die kleinste Untereinheit der DNA mit der niedrigsten Stufe der Organisation ist das Nucleosom, in dem zwei superhelikale Windungen der DNA um ein Histon-Oktamer gewunden sind. Die Nucleosome werden miteinander durch kurze Bereiche der Linker-DNA verbunden. In der nächsten Stufe der Verpackung der DNA wird die Nucleosomen-Kette zu einer Faser mit 30 nm Durchmesser, dann zu Strukturen höherer Ordnung aufgefaltet. In Form der Chromosomen liegt die Chromatinfaser maximal verdichtet vor.



**Abbildung 2.2 Schematischer Aufbau eines Nucleosoms (nach Tsankova et al., 2007)**

Ein Nucleosom setzt sich aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammen, um die die DNA 1,7-mal gewunden ist. Die N-terminalen Histondenenden ragen über das Nucleosom hinaus und sind das Ziel posttranslationaler Histonmodifikationen.

### 2.1.2 Modifikationen der Chromatinstruktur

Die Verpackung des eukaryotischen Genoms in Form hoch verdichteten Chromatins ermöglicht nicht nur seine Unterbringung im begrenzten Raum des Zellkerns, sondern kontrolliert auch alle DNA-vermittelten Prozesse innerhalb des Nucleus. Diese Kontrolle wird durch die Organisation der DNA in Form der Chromatinfaser erreicht (Peterson und Laniel, 2004), welche sie für Faktoren, die die Gentranskription, DNA-Replikation und DNA-Reparatur einleiten, unzugänglich macht (Foster und Downs, 2005; Altaf et al., 2007). Der Zugang zur Nukleotid-Basensequenz für Replikations-, Transkriptions- und Reparaturproteine wird erst durch Struktur verändernde Umgestaltungen am Chromatin ermöglicht. Diese Modifikationen können auf drei Wegen erreicht werden: kovalente Histon-Modifikationen, ATP-abhängige Chromatin-Umformungen und der Austausch von Histonvarianten in der Chromatinfaser (Berger, 2002; Lydall und Whitehall, 2005; Saha et al., 2006).

Besonders die posttranslationalen Histonmodifikationen spielen eine wichtige Rolle in nahezu allen nukleären Prozessen, die die genomische DNA betreffen, z.B. auch in der Reparatur beschädigter DNA (Peterson und Cote, 2004; Thiriet und Hayes, 2005; Van Attikum und Gasser, 2005). Zu ihnen zählen Acetylierungen und Methylierungen von Lysin und Arginin, Phosphorylierungen von Serin und Threonin sowie die Ubiquitinierung von Lysin (Peterson und Laniel, 2004). Durch das Einfügen dieser funktionellen Gruppen wird die Ladung spezifischer Aminosäurereste verändert, so dass Histon-Histon- und Histon-DNA-Interaktionen beeinflusst werden können. Darüber hinaus dienen solche kovalenten Histonmodifikationen auch als Signal für das Binden verschiedener (Reparatur-)Proteinkomplexe. Die Zielregionen dieser posttranslationalen Modifikationen sind 20-35 Reste lange N-terminale Histonenden, die reich an basischen Aminosäuren sind und über die Oberfläche der Nucleosome herausragen. Eine Besonderheit des Histons H2A ist eine zusätzliche, ca. 37 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne, die ebenfalls das Nucleosom überragt. Solche Histonenden beeinflussen aber weder die Struktur noch die Stabilität der einzelnen Nucleosome signifikant, jedoch spielen sie eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Auffaltung einzelner Abschnitte der Chromatinfaser zu Strukturen höherer Ordnung (Peterson und Laniel, 2004). Im Gegensatz zu den N- bzw. C-terminalen Bereichen dient die globuläre Domäne der Core-Histone der Vermittlung von Histon-Histon-Interaktionen innerhalb des Oktamers und interagiert mit den beiden Windungen der nucleosomalen DNA.

Innerhalb der DNA-Reparatur übernehmen spezifische Histonmodifikationen essentielle Funktionen als „Bindungsplattformen“ für wichtige Reparatur- bzw. Signalproteine. Die Modifikationen signalisieren dabei nicht nur das Vorhandensein eines Schadens: Durch den gezielten Einsatz spezieller Modifikationen wird auch der Schadenstyp charakterisiert und somit die Rekrutierung ausgewählter Reparaturfaktoren gesteuert (Alt et al., 2007).

Unter den verschiedenen Histonmodifikationen spielt die Phosphorylierung eine elementare Rolle in der DNA-Schadensantwort. Sie erleichtert verschiedenen Reparaturproteinen den Zugang zu DNA-Strangbrüchen, signalisiert diese der Zelle und fördert die chromosomale Stabilität. Insbesondere die Phosphorylierung des Serins 139 am C-terminalen Bereich des Histons H2AX, einer Subfamilie der H2A-Familie, nimmt

eine herausragende Stellung unter den posttranslationalen Histonmodifikationen im Rahmen der DNA-Schadensantwort ein.

### **2.1.3 Schädigung der DNA**

Die DNA einer Zelle unterliegt kontinuierlich einer Vielzahl von Einflüssen, die ihre molekulare Struktur verändern können. Dabei kann zwischen intrazellulären Prozessen des Stoffwechselgeschehens sowie exogenen Einwirkungen unterschieden werden (s. Abb. 2.3). Obwohl einige Schäden, wie z.B. der DNA-Doppelstrangbruch, gezielt von Zellen induziert werden, um z.B. die Diversität von Genen zu erhöhen, überwiegen die nicht programmiert ablaufenden und somit potentiell schädlichen Veränderungen an der Erbsubstanz. Werden solche DNA-Schäden nicht oder falsch repariert, kann dies genetische oder genomische Instabilität, Veränderungen in der zellulären Identität und Funktion, den Zelltod oder - in multizellulären Organismen - neoplastische Transformationen zur Folge haben (Shiloh, 2003).

#### **2.1.3.1 Quellen von DNA-Schäden**

DNA kann durch endogene und exogene Ursachen geschädigt werden. Ein wichtiges Beispiel für endogen schädigende Agenzien sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Sie stellen aufgrund ihres hohen Redoxpotentials eine Hauptquelle endogener Schäden dar (Imlay und Linn, 1988; Ames und Gold, 1991). ROS fallen als Nebenprodukte der mitochondrialen Atmungskette (Wei, 1998), aber auch bei inflammatorischen Reaktionen (Pero et al., 1996) an. Sie schädigen die DNA in vielfältiger Weise, u.a. können sie sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche generieren (Mello Filho et al., 1984; Halliwell und Aruoma, 1991).

Die DNA wird darüber hinaus auch spontan geschädigt (Lindahl, 1993), beispielsweise durch Deaminierungen der exozyklischen Aminogruppen, woraus Basenfehlpaarungen resultieren. Ebenso finden spontan ablaufende Depurinierungen statt, wobei es zur Hydrolyse der glykosidischen Bindung zwischen Base und Zucker kommt. Dies führt

zum Verlust von genetischer Information. Des Weiteren sind Basenfehlpaarungen im Verlauf der Replikation und anschließende Fehler bei der Korrektur eine endogene Ursache für DNA-Schäden. Dabei kommt es zum Einbau falscher Basen, was DNA-Strangbrüche zur Folge haben kann.

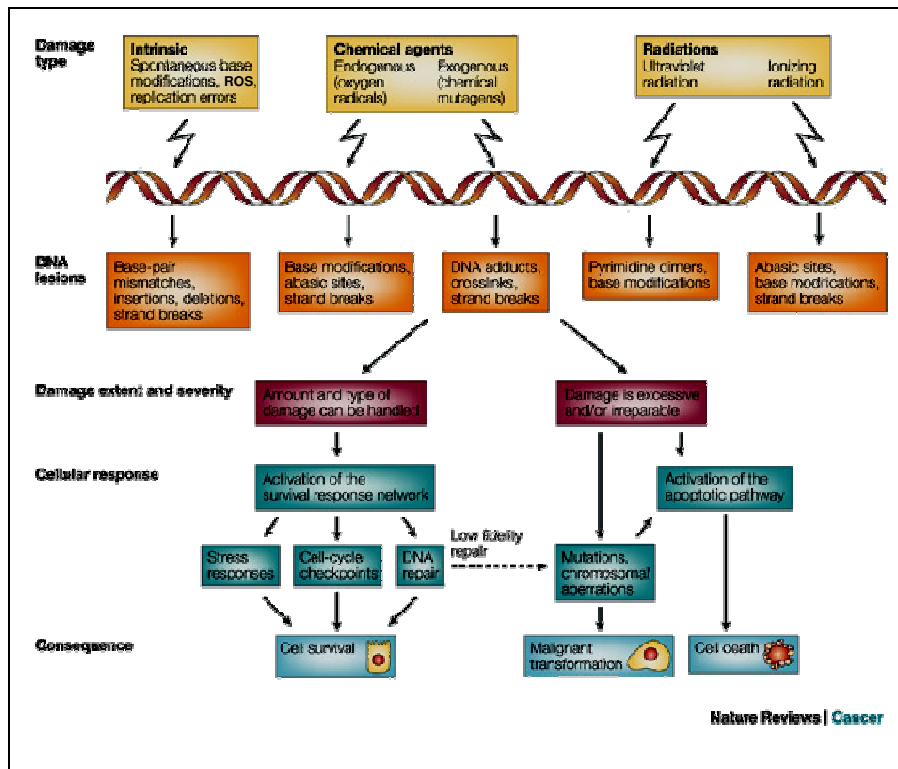


Abbildung 2.3 Zelluläre Antworten auf DNA-Schäden (modifiziert, nach Shiloh 2003)

DNA-schädigende Faktoren verursachen verschiedene Arten von DNA-Schäden, mit denen die Zelle wiederum auf unterschiedliche Weise umgeht. Je nach Schwere und Art der Schädigung variieren die Schadensantworten der Zelle, was entweder ihr Überleben ermöglicht, zum Zelltod führt oder in malignen Entartungen resultiert.

Zu den exogen DNA-schädigenden Einflüssen gehören verschiedene genotoxische Chemikalien und Substanzen, aber auch ionisierende Strahlung (z.B. Röntgen- und Gammastrahlung). Die natürliche Strahlenbelastung eines Individuums resultiert aus dem Ultraviolettanteil des Sonnenlichts, kosmischer Strahlung, die die Erdoberfläche erreicht, der Strahlung radioaktiver Substanzen, die natürlich im Erdboden und Gestein vorkommen sowie durch deren Inkorporation über die Nahrung und Atemluft.

### 2.1.3.2 Auswirkungen ionisierender Strahlung auf die DNA

Die biologische Wirkung von ionisierender Strahlung beruht auf Anregungen oder Ionisationen im Gewebe, wobei es zu Wechselwirkungen mit der DNA als kritischem Angriffspunkt kommt. Dabei unterscheidet man zwischen der direkten und der indirekten Strahlenwirkung der ionisierenden Strahlung (Goodhead, 1994; Nikjoo et al., 1997). Hochenergetische Teilchenstrahlung oder Sekundärelektronen üben eine direkte Strahlenwirkung auf biologische Materie aus und führen dabei direkt zu chemischen Veränderungen, wie z.B. dem Aufbrechen kovalenter Bindungen des DNA-Strangs. Indirekte Strahlenwirkungen, die bei Röntgen- oder Gammastrahlung auftreten, beruhen hingegen auf chemischen Sekundärprozessen, die durch die Absorption der Strahlung in direkter Nähe des geschädigten Moleküls ausgelöst werden. Da Zellen zu etwa 80% aus Wasser bestehen, sind Wassermoleküle die häufigsten Reaktionspartner der energiereichen Strahlung. Dabei treffen Photonen auf Wassermoleküle und ionisieren diese, wobei ein Elektron und ein ionisches Radikal ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ) entstehen. Das ionische Radikal weist aufgrund des ungepaarten Elektrons eine positive Ladung auf, ist hoch reaktiv, aber kurzlebig. Es reagiert daher mit anderen Wassermolekülen in unmittelbarer Umgebung, was zur Bildung von freien Hydroxylradikalen ( $\text{OH}\cdot$ ) führt. Wenn solche Hydroxylradikale im Abstand von nur wenigen Nanometern zur DNA entstehen, können sie dort chemische Veränderungen hervorrufen und DNA-Schäden induzieren (Chatgililoglu und O'Neill, 2001). Zu solchen strahlungsinduzierten Läsionen gehören DNA-Doppelstrangbrüche, Einzelstrangbrüche, Basenschäden, Schäden am Zucker-Rückgrat, DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen (sog. „*Crosslinks*“) sowie alkalilabile Stellen (Powell und Mcmillan, 1990). Obwohl der DNA-Einzelstrangbruch im Vergleich mit dem Doppelstrangbruch die weitaus häufiger auftretende strahleninduzierte Läsion darstellt (Powell und Mcmillan, 1990), ist die schädigende Auswirkung der Doppelstrangbrüche drastischer (Hoeijmakers, 2001; Van Gent et al., 2001).

### 2.1.3.3 DNA-Doppelstrangbrüche

Ein DNA-Doppelstrangbruch resultiert aus dem Bruch der kovalenten Bindungen des Zucker-Phosphat-Rückgrats beider Stränge der DNA-Doppelhelix in enger Nachbarschaft, wodurch die Watson-Crick Basenpaarung unterbrochen wird. Unter den verschiedenen Typen von DNA-Schäden, die innerhalb einer Zelle auftreten können, sind DNA-Doppelstrangbrüche besonders gefährlich, da sie zum Zelltod führen oder die Entstehung von Krebs begünstigen können, wenn ihre Reparatur unterbleibt oder fehlerhaft abläuft (Khanna und Jackson, 2001). Bereits ein Doppelstrangbruch kann den Tod einer Zelle bewirken (Olive, 1998), wenn er essentielle Gene inaktiviert oder den programmierten Zelltod (Apoptose) einleitet (Rich et al., 2000). Trotz ihrer potentiell hohen Schädigung werden Doppelstrangbrüche auch gezielt in Zellen induziert. Auf diese Weise wird ein Austausch der genetischen Information zur Erhöhung der genetischen Diversität erreicht.

Zum größten Teil werden Doppelstrangbrüche aber ungewollt generiert, z.B. durch physikalische Faktoren wie Röntgenstrahlung (Olive et al., 1990; Olive und Banath, 1993) und Gammastrahlung (Ostling und Johanson, 1987; Vijayalaxmi et al., 1993), sowie durch UV-Strahlung (Gedik et al., 1992; Arlett et al., 1993; Green et al., 1994) oder durch chemische Substanzen (Povirk et al., 1977). Wie bereits erwähnt, spielen auch reaktive Sauerstoffspezies eine Rolle (Ma et al., 2005). Schließlich können auch im Verlauf der DNA-Replikation Doppelstrangbrüche entstehen, z.B. wenn Replikationsgabeln blockiert werden (Cox et al., 2000).

Im Vergleich zum DNA-Einzelstrangbruch, bei dem es nur in einem der beiden Stränge der Doppelhelix zum Kontinuitätsverlust kommt, stellt die Reparatur des Doppelstrangbruchs eine besondere Schwierigkeit dar. Zum einen, weil es dabei zum Verlust der komplementären Sequenz beider DNA-Stränge kommen kann, was die Wiederherstellung der ursprünglichen genetischen Information erschwert. Zum anderen können sich die beiden freigesetzten DNA-Enden räumlich voneinander separieren, was die Reparatur der DNA zusätzlich beeinträchtigt.

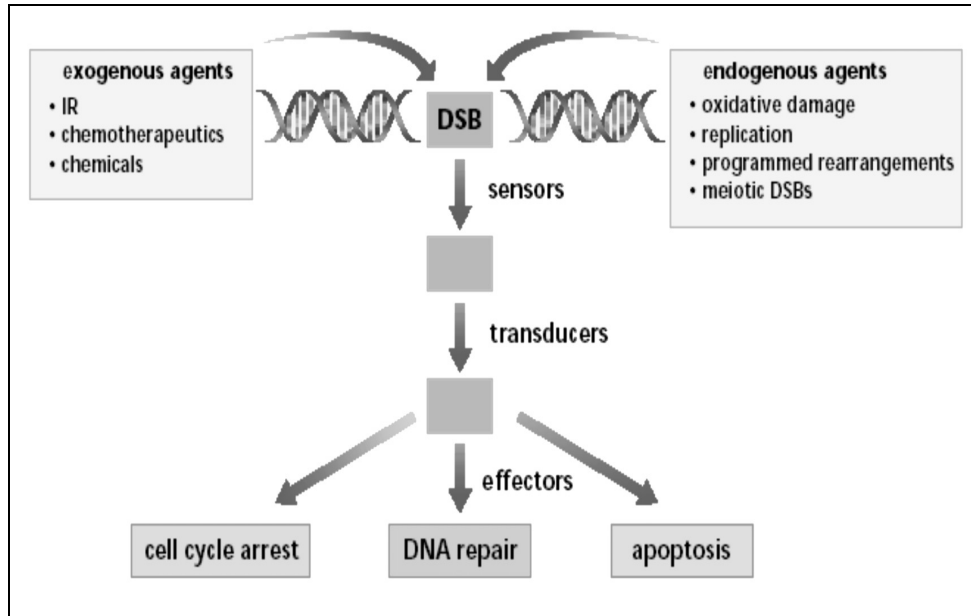
Werden Doppelstrangbrüche nicht oder fehlerhaft repariert, können sie durch direkte oder verzögerte chromosomale Umgestaltungen wie Translokationen, Inversionen oder Deletionen zu Krebsentstehung führen (Hoeijmakers, 2001; Van Gent et al., 2001).



Solche chromosomalen Aberrationen stellen eine der wichtigsten biologischen Folgen von ionisierender Strahlung dar (Obe et al., 2002). Experimentelle Studien haben bewiesen, dass DNA-Doppelstrangbrüche eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung solcher Chromosomenaberrationen sind (Natarajan und Obe, 1984; Obe et al., 1992; Bryant, 1998). Ihre fehlerhafte Wiederverknüpfung kann zu Verlust, zum Austausch oder der Amplifikation von chromosomalem Material führen. Diese Vorgänge können die Tumorentstehung begünstigen, wenn z.B. die entfernte Chromosomenregion für ein Tumorsuppressor-Gen kodiert oder die amplifizierte Region für Proteine mit onkogenem Potential kodieren (Khanna und Jackson, 2001).

#### **2.1.4 Die DNA-Schadensantwort in eukaryotischen Zellen**

Das Überleben von Lebewesen hängt von der exakten Transmission der genetischen Information von einer Zelle an ihre Folgegenerationen ab. Für den Ablauf solcher Erbgut-Übertragungen ist nicht nur extreme Genauigkeit in der DNA-Replikation und der Chromosomenverteilung unerlässlich, sondern auch die Fähigkeit, spontane und programmierte DNA-Schäden zu überleben und die Anzahl der vererblichen Mutationen zu minimieren. Um diese Genauigkeit zu erreichen, haben sich in eukaryotischen Zellen komplexe und hoch konservierte Mechanismen entwickelt, die die Chromosomenstruktur überwachen und die Reparatur sowie den weiteren Ablauf des Zellzyklus koordinieren (Jackson, 2002; Bassing und Alt, 2004). Diese Mechanismen werden in ihrer Gesamtheit als DNA-Schadensantwort bezeichnet, welche sich aus Zellzyklus-Kontrollpunkten (sog. „Checkpoints“) sowie verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen zusammensetzt. Solche Zellzyklus-Kontrollpunkte, die das Genom auf das Vorhandensein von DNA-Schäden kontrollieren und die Progression des Zellzyklus steuern, sind als Signaltransduktionskaskaden zu verstehen. Innerhalb dieser Signalwege werden Sensoren, Transduktoren und Effektoren unterschieden (Khanna und Jackson, 2001) (s. Abb.2.4), die durch die Aktivierung der Zellzyklus-Checkpoints koordiniert werden (Bartek und Lukas, 2001; Pearce und Humphrey, 2001).



**Abbildung 2.4** Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort (nach Khanna und Jackson, 2001)

Exogene und endogene Einflüsse können DNA-Doppelstrangbrüche induzieren, die dann von Sensorproteinen erkannt werden. Diese leiten das Signal über eine Signalkaskade an Transduktorproteine weiter, was zu einer Verstärkung des Signals und der spezifischen Aktivierung von nachgeschalteten Effektorproteinen führt. Je nach Zellzyklusphase oder Schwere des DNA-Schadens wird auf diese Weise der Zellzyklus-Arrest mit anschließender Reparatur eingeleitet oder die Zelle durch Apoptose aus dem Zellverband eliminiert.

Kommt es zur endogenen oder exogenen Schädigung der DNA, wird die DNA-Schadensantwort von Sensorproteinen initiiert und das Schadenssignal durch Phosphorylierungsreaktionen über Transduktorproteine zu den Effektorproteinen weitergeleitet (s. Abb. 2.4). Die Effektoren, zu denen Zellzyklusinhibitoren sowie die Komponenten der DNA-Reparaturmechanismen zählen, führen dann die von den Transduktoren übermittelten Signale aus. Kommt es auf diese Weise zur Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren, wird der Eintritt der geschädigten Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus verhindert, was der Zelle Zeit verschafft, den DNA-Doppelstrangbruch mit Hilfe verschiedener Reparaturmechanismen (s. Kapitel 2.1.5) zu reparieren, bevor er durch eine replikative DNA-Polymerase vervielfältigt wird. Ist der Schaden jedoch zu schwerwiegend, wird die Zelle durch Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose) eliminiert (Lowndes und Murguia, 2000; Zhou und Elledge, 2000; Khanna und Jackson, 2001; Shiloh, 2003). Zellzyklus-Kontrollpunkte existieren am Übergang

von der G1- in die S-Phase (G1/S-Checkpoint), innerhalb der S-Phase (intra-S-Checkpoint), am Übergang von der G2-Phase in die Mitose (G2/M-Checkpoint) sowie innerhalb der Mitose.

Die Identität der DNA-Schadenssensoren und Transduktorproteine sowie deren hierarchische Anordnung innerhalb der Signaltransduktionskaskaden der DNA-Schadensantwort wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Als mögliche Sensorproteine werden z.Z. der MRN-Komplex, bestehend aus Mre11 (*meiotic recombination protein 11*), Rad50 und Nbs1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*), der Rad17-RFC (*replication factor C*) Komplex sowie der Rad9-Rad1-Hus1 Komplex in Betracht gezogen (Iliakis et al., 2003; Petrini und Stracker, 2003; Paull und Lee, 2005; Niida und Nakanishi, 2006; Lavin und Kozlov, 2007).

In Säugtieren nehmen bei der frühen Signaltransduktion drei einander sehr ähnliche Proteinkinasen eine zentrale Rolle ein: ATM (*ataxia telangiectasia mutated protein*), ATR (*ATM and Rad3-related*) und die DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). Sie gehören zur Familie der Phosphatidylinositol-3 Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKKs) und zählen damit zu den Serin-/ Threonin-Proteinkinasen. Durch die Phosphorylierung von Schlüsselproteinen der verschiedenen Signalwege übersetzen sie das DNA-Schadenssignal der Sensorproteine in biochemische Modifikationen. Auf diese Weise wird das initiale Signal an die Effektorproteine weitergeleitet. ATM ist eine der ersten Kinasen, die nach der Induktion von Doppelstrangbrüchen aktiviert wird und somit für eine unmittelbare schnelle Phase in der DNA-Schadensantwort verantwortlich ist. ATR hingegen greift erst zu einem späteren Zeitpunkt in die Phosphorylierung von Schlüsselproteinen ein und hält auf diese Weise den phosphorylierten Status verschiedener Substrate aufrecht (Shiloh, 2003). Da in erster Linie ATM durch DNA-Doppelstrangbrüche in einen aktiven Zustand versetzt wird, (Zhou und Elledge, 2000; Nyberg et al., 2002), gilt sie als zentrale Kinase der DNA-Schadensantwort in Säugtieren (Shiloh, 2003; Uziel et al., 2003).

### 2.1.5 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in eukaryotischen Zellen

Ist ein Doppelstrangbruch reparabel, existieren in eukaryotischen Zellen zwei Hauptreparaturwege, um die durchtrennten DNA-Stränge wieder zu vereinigen: die Homologe Rekombination (HR) und die Nicht-homologe Endverknüpfung (*non homologous end-joining*, NHEJ) (Haber, 2000; Khanna und Jackson, 2001; Jackson, 2002), (Übersicht in Abb. 2.5).

Das Grundprinzip der Homologen Rekombination beruht auf der Tatsache, dass eine identische Kopie der zellulären DNA vorhanden ist und diese unbeschädigte DNA als Vorlage für die Neusynthese und Reparatur des geschädigten DNA-Stranges dienen kann. Wegen dieser Vorgehensweise, homologe Sequenzen als Vorlage für den Reparaturprozess zu nutzen, können entstandene Lücken im DNA-Strang aufgefüllt werden, wodurch es bei der Homologen Rekombination seltener zu Informationsverlust in Form von Deletionen kommt (Paques und Haber, 1999). Die HR ist ein präziser und weitestgehend fehlerfreier Reparaturweg, der aber nur eingeschlagen werden kann, wenn DNA-Bruchenden eine ausreichende Anzahl von Homologien zu einem anderen DNA-Strang aufweisen. Darüber hinaus müssen die homologen Bereiche in unmittelbarer Nähe des Bruchs vorliegen, weshalb die HR in höheren Eukaryoten nur in der S- und G2-Phase des Zellzyklus stattfinden kann (Burma et al., 2006). Im Einzelnen wird im Verlauf der Homologen Rekombination der DNA-Doppelstrangbruch von einem Sensorprotein wie dem Mre11-Rad50-Nbs1 Komplex (MRN-Komplex) erkannt, welcher die nukleolytische Prozessierung der Bruchenden vermittelt, so dass einzelsträngige 3'-Überhänge entstehen (Abb. 2.5, I). An diese bindet das Einzelstrang-Bindeprotein RPA (*replication protein A*). Die Rekombinase Rad51 ersetzt mit Hilfe von BRCA2 (*breast cancer susceptibility gene 2*) das RPA an den einzelsträngigen Überhängen (II), wonach es mit Unterstützung durch Komponenten der Rad52-Epistasisgruppe zur Stranginvasion des Nukleoprotein-Filaments in den DNA-Doppelstrang der ungeschädigten Schwesterchromatide kommt. Das 3'-Ende der geschädigten DNA wird unter Zuhilfenahme der Matrize des ungeschädigten Stranges durch die Polymerase I verlängert (III). Nach Ligation der offenen DNA-Enden durch die Ligase I kommt es zur Auflösung der sog. Doppel-Holliday-Struktur (IV).

Die Nicht-homologe Endverknüpfung basiert hingegen auf der direkten Verknüpfung freier DNA-Enden (Paques und Haber, 1999; Lieber et al., 2003), wobei dieser Vorgang unabhängig von dem Vorhandensein homologer DNA-Sequenzen abläuft, die als Matrize für den Reparaturvorgang dienen könnten. Aufgrund dessen weist das NHEJ eine höhere Fehlerrate als die Homologe Rekombination auf und verursacht häufiger Mikrodeletionen. Trotzdem ist die Nicht-homologe Endverknüpfung in höheren Eukaryoten der bevorzugte Reparaturweg zur Wiederverknüpfung von Doppelstrangbrüchen (Iliakis et al., 2004; Löbrich und Jeggo, 2005). Sie läuft in allen Phasen des Zellzyklus ab (Rothkamm et al., 2003; Burma et al., 2006), vorzugsweise jedoch in der G1-Phase (Moore und Haber, 1996; Takata et al., 1998). Die zentrale Kinase des NHEJ ist die DNA-abhängige Protein-Kinase (DNA-PK) bzw. deren katalytische Untereinheit (DNA-PK<sub>cs</sub>). Bei der Nicht-homologen Endverknüpfung bindet das Ku70/Ku80-Heterodimer nach der Induktion von Doppelstrangbrüchen an die freien Bruchenden (V). Auf diese Weise wird die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PK<sub>cs</sub>) rekrutiert (VI). Diese bildet dann mit dem Ku70/Ku80-Heterodimer das aktive DNA-PK-Holoenzym. Die Bindung der DNA-PK an Doppelstrangbrüche aktiviert ihre Serin-/ Threonin-Kinaseaktivität und induziert ihre Autophosphorylierung. Neben anderen DNA-Reparaturfaktoren aktiviert die DNA-PK den XRCC4/LigaseIV-Komplex, welcher die Bruchenden ligiert (VII).

Ein anderer Protein-Komplex, zu dem in humanen Zellen die Proteine Mre11, Rad50 und Nbs1 gezählt werden (MRN-Komplex), scheint an verschiedenen Abläufen beider Mechanismen beteiligt zu sein (Petrini, 1999).

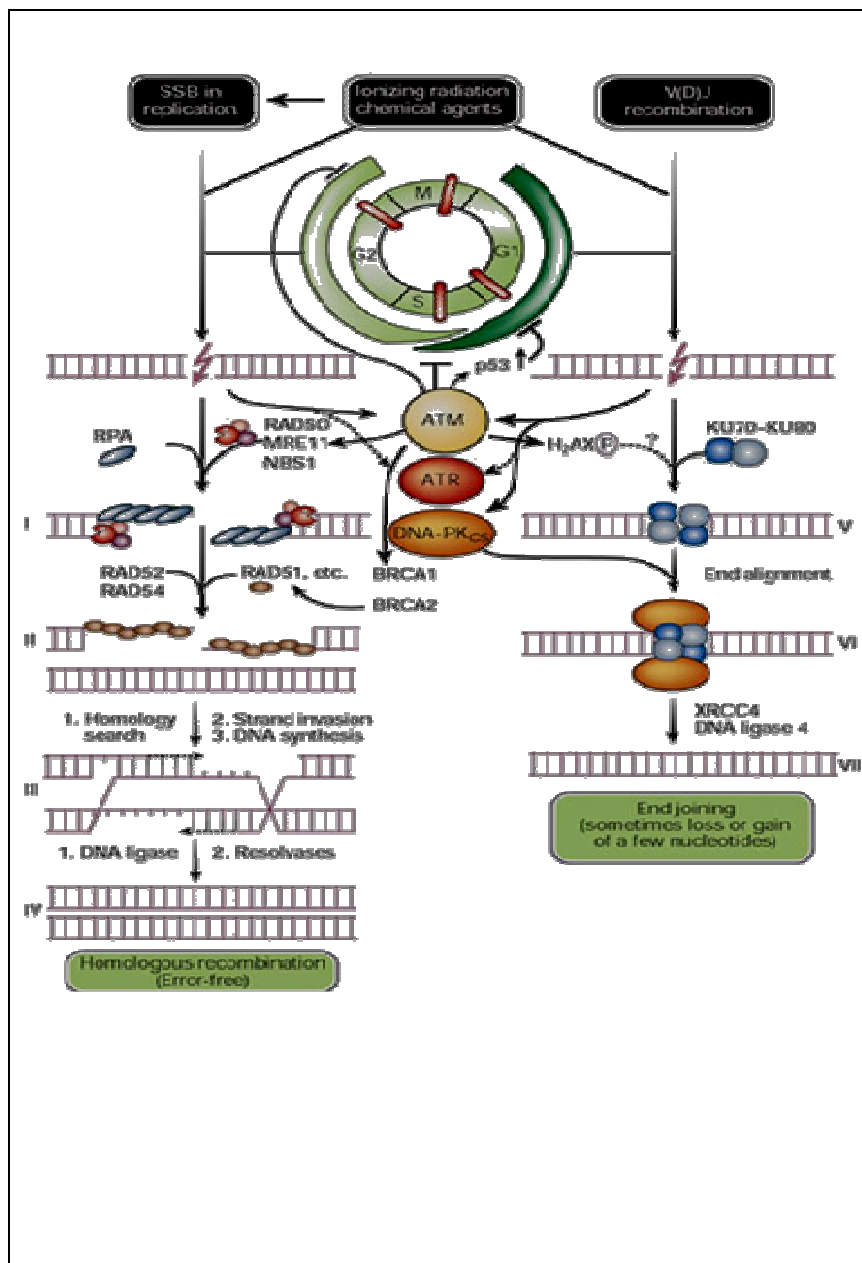


Abbildung 2.5 DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen (nach Hoeijmakers, 2001)

Übersicht über die Homologe Rekombination (links) und die Nicht-homologe Endverknüpfung (rechts).

## 2.2 Gamma-H2AX

### 2.2.1 Das Histon H2AX und seine Modifikation

Im Jahr 1980 wurden erstmals durch Gelelektrophoresen zwei neue Proteinkomponenten aus verschiedenen tierischen und menschlichen Zellen identifiziert, die der Histon-Familie H2A zugeordnet werden konnten (West und Bonner, 1980). Dabei handelte es sich um die beiden Subfamilien H2AZ und H2AX. Die verschiedenen Mitglieder der Histonfamilien H4, H3 und H2B unterscheiden sich nur in wenigen Aminosäuren, wohingegen die H2A-Familie in die 3 Subfamilien H2A1-H2A2, H2AZ und H2AX gegliedert werden kann (Redon et al., 2002). Das herausragende Merkmal, das H2AX von den anderen beiden Mitgliedern der H2A Familie unterscheidet, ist eine hoch konservierte Aminosäuresequenz am C-terminalen Histonende, bestehend aus Serin, Glutamin und Glutaminsäure (Ser-Gln-Glu), die als SQE-Motif bezeichnet wird (Mannironi et al., 1989). In Säugetierzellen nimmt das Serin in diesem Motif die Position 139 ein.

Knapp 20 Jahre nach dem erstmaligen Nachweis von H2AX konnte belegt werden, dass diese Histonvariante nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen posttranslational modifiziert wird. Wie durch Massenspektrometrie belegt wurde, handelt es sich dabei um die phosphorylierte Form des Histons H2AX ( $\gamma$ -H2AX) (Rogakou et al., 1998). Diese Proteinvariante lässt sich nicht nur in Säugetierzellen, sondern auch in *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* und *Saccharomyces cerevisiae* als Antwort auf ionisierende Strahlung und andere Doppelstrangbruch induzierende Agenzien nachweisen (Rogakou et al., 1999) und gilt daher als hoch konservierte induzierte Proteinvariante innerhalb der eukaryotischen Evolution (Takahashi und Ohnishi, 2005). Die Phosphorylierung von H2AX, welches gleichmäßig innerhalb des Chromatins verteilt zu sein scheint (Mannironi et al., 1989), gilt als einer der frühesten Schritte in der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche (Modesti und Kanaar, 2001; Stiff et al., 2004). Es lässt sich bereits eine Minute nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung nachweisen und verläuft proportional zur Höhe der Strahlenbelastung (Rogakou et al., 1998). Hunderte bis tausende  $\gamma$ H2AX Moleküle werden pro DNA-Doppelstrangbruch gebildet, was bedeutet, dass ein einzelner

Doppelstrangbruch zur Modifikation einer ganzen Chromatindomäne führt, die sich über einen Bereich von mehreren Megabasenpaaren DNA erstreckt (Rogakou et al., 1999). Diese starke Akkumulation von  $\gamma$ H2AX-Molekülen an den Doppelstrangbrüchen führt dazu, dass sie mit Hilfe eines geeigneten Antikörpers immunfluoreszenzmikroskopisch als distinkte Punkte bzw. so genannte „ $\gamma$ H2AX-Foci“ sichtbar gemacht werden können (Rogakou et al., 1999). Auch andere Proteine, die in der DNA-Schadensantwort involviert sind, z.B. die Reparaturfaktoren Rad50 und Rad51, Nbs1 oder das Produkt des Tumorsuppressor-Gens BRCA1, akkumulieren in Form von Foci in unmittelbarer Nähe von Doppelstrangbrüchen (Paull et al., 2000; Celeste et al., 2003).

Die Phosphorylierung von H2AX ist jedoch nicht nur auf die Doppelstrangbruch-Reparatur nach Einwirkung von ionisierender Strahlung beschränkt. Vielmehr scheint sie eine generelle zelluläre Antwort auf viele Prozesse zu sein, in deren Verlauf es zur Generierung von Doppelstrangbruch-Intermediaten kommt (Modesti und Kanaar, 2001). Außer ionisierender Strahlung führen auch andere exogene Faktoren, wie z.B. ultraviolettes Licht (Ward und Chen, 2001; Halicka et al., 2005), Hitze (Takahashi et al., 2004; Kaneko et al., 2005), ein niedriger pH-Wert (Xiao et al., 2003) und eine Vielzahl von Chemikalien (Banath und Olive, 2003) zur Bildung von  $\gamma$ H2AX. Auch im Verlauf von programmierten DNA-Reorganisationsprozessen wie der mitotischen Rekombination (Mahadevaiah et al., 2001) und der somatischen Rekombination in lymphoiden Zellen (Chen et al., 2000) lässt sich das phosphorylierte Histon nachweisen. Ebenso ist  $\gamma$ H2AX während der apoptotischen DNA-Fragmentierung (Rogakou et al., 2000) und Alterungsprozessen (Sedelnikova et al., 2004) nachweisbar. Mitunter kann  $\gamma$ H2AX unabhängig von Doppelstrangbrüchen auftreten, wie z. B. an blockierten Replikationsgabeln als Folge eines Replikations-Arrests (Ward und Chen, 2001; Ewald et al., 2007).



### 2.2.2 Die Phosphorylierung von H2AX und seine Rolle in der DNA-Schadensantwort

Einer der ersten Schritte in der Antwort von Säugetierzellen auf DNA-Doppelstrangbrüche ist die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 in unmittelbarer Nähe des Schadens (Modesti und Kanaar, 2001). Diese Phosphorylierung wird von den Enzymen ATM (Burma et al., 2001; Fernandez-Capetillo et al., 2002), ATR (Ward und Chen, 2001; Furuta et al., 2003) und der DNA-PK (Park et al., 2003; Stiff et al., 2004) katalysiert. Diese drei Proteine sind Serin- /Threonin-Kinasen, deren Substrate eine Konsensus-Sequenz, bestehend aus Serin oder Threonin, Glutamin und Glutaminsäure (SQE Motif), aufweisen (Anderson und Lees-Miller, 1992; Bannister et al., 1993; Kim et al., 1999; Rathbun et al., 1999). Im C-terminalen Histonenende von H2AX liegt das Serin 139, welches als Substrat für die  $\gamma$ -Phosphorylierung fungiert, in einem solchen SQE Motif (Rogakou et al., 1998).

Die Phosphorylierung des Histons H2AX wurde bereits früh mit der Reparatur von DNA-Strangbrüchen in Zusammenhang gebracht (Rogakou et al., 1999). Für diese Hypothese sprach die Tatsache, dass  $\gamma$ H2AX bereits eine Minute nach ionisierender Bestrahlung in unmittelbarer Nähe der DNA-Doppelstrangbrüche nachweisbar ist (Rogakou et al., 1998; Rogakou et al., 1999). Funktional betrachtet wird diskutiert, ob das modifizierte Histon als epigenetisches Signal wirkt, das von Proteinen erkannt wird, die dann an das Phosphorylierungsepitop des Histonenendes binden. Auch eine indirekte Rekrutierung von Reparaturproteinen durch Modifikation der lokalen Chromatinstruktur wird für möglich gehalten (Rogakou et al., 1999).

$\gamma$ H2AX-Foci kolokalisieren mit Proteinen, die in die DNA-Schadensantwort involviert sind und ebenfalls in Form von Foci an DNA-Doppelstrangbrüchen akkumulieren (Paull et al., 2000). Zu diesen Proteinen gehören z.B. das Produkt des Tumorsupressor-Gens BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene 1*), 53BP1 (*p53-binding protein*), MDC1 (*mediator of DNA damage-checkpoint 1*), Rad51 und der MRN-Komplex (Paull et al., 2000; Schultz et al., 2000; Goldberg et al., 2003; Stewart et al., 2003; Bekker-Jensen et al., 2006).

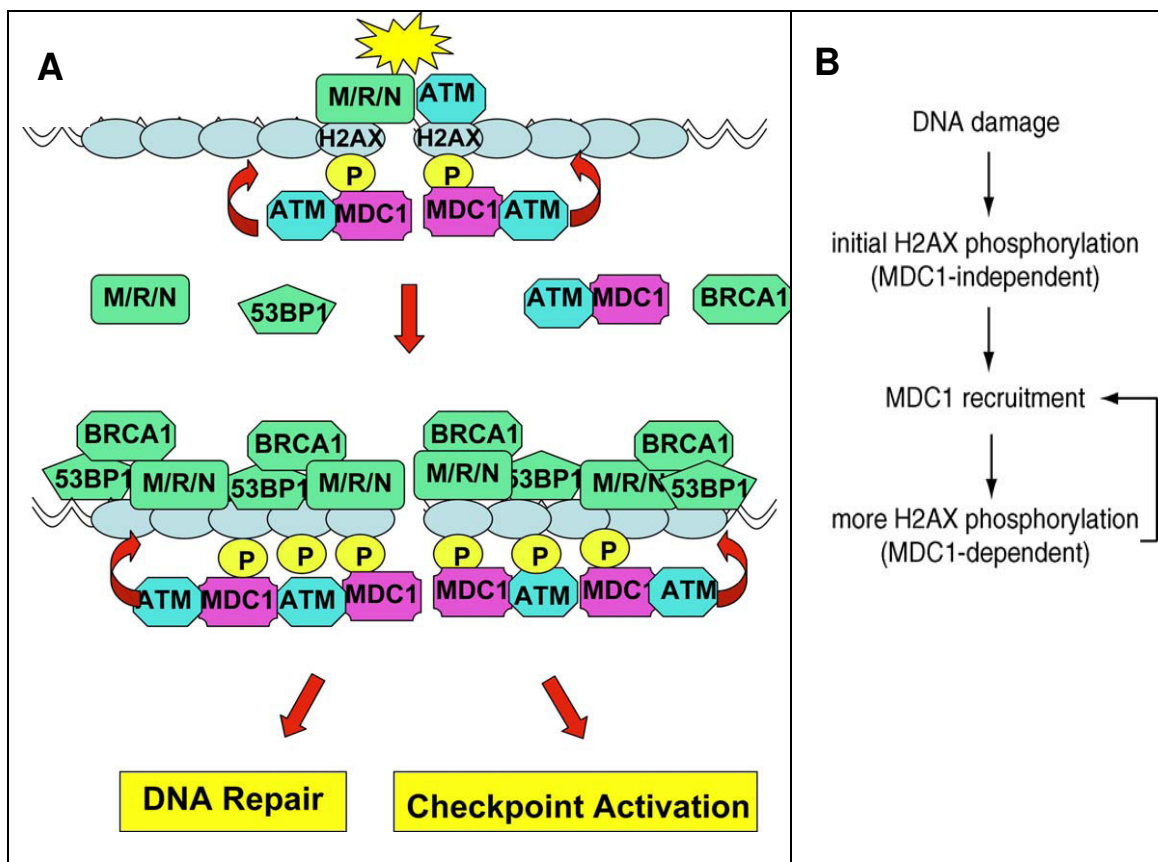
Wegen des sehr frühen Auftretens von  $\gamma$ H2AX nach der Induktion von Doppelstrangbrüchen noch vor den anderen Reparaturfaktoren (Paull et al., 2000), der Abhängigkeit einiger dieser später auftretenden Foci von der vorausgehenden Phosphorylierung von H2AX (Paull et al., 2000; Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002) und der Interaktion zwischen  $\gamma$ H2AX und wichtigen Checkpoint-Proteinen wie Nbs1, 53BP1 und MDC1 (Kobayashi et al., 2002; Stewart et al., 2003; Ward et al., 2003; Xu und Stern, 2003), wurde die Bildung von  $\gamma$ H2AX als notwendiger erster Schritt bei der Rekrutierung von DNA-Reparaturfaktoren angesehen.

Neuere Studien belegen jedoch, dass  $\gamma$ H2AX zwar für eine maximale Effizienz der beiden DSB-Reparaturwege (Homologe Rekombination und Nicht-homologe Endverknüpfung) notwendig ist (Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002; Xie et al., 2004), für die DNA-Schadensantwort selbst aber entbehrlich zu sein scheint (Celeste et al., 2002; Celeste et al., 2003; Kang et al., 2005). Da die Rekrutierung von Reparatur- bzw. Signalfaktoren unabhängig von  $\gamma$ H2AX abläuft (Celeste et al., 2003), geht man inzwischen davon aus, dass  $\gamma$ H2AX nicht das primäre Signal der DNA-Schadensantwort ist. Vielmehr scheint es der Aufkonzentrierung bzw. Retention von weiteren Proteinen an DNA-Doppelstrangbrüchen zu dienen (Celeste et al., 2003). Auf diese Weise könnte  $\gamma$ H2AX als eine Art „Plattform“ für die konzentrierte Ansammlung von DNA-Checkpoint- und Reparaturproteinen fungieren. Ein zweistufiges Modell, das sich aus einer initialen,  $\gamma$ H2AX-unabhängigen Rekrutierung von Reparatur- bzw. Signalproteinen zu Doppelstrangbrüchen und einer  $\gamma$ H2AX vermittelten Akkumulation und Retention dieser Faktoren distal des Schadens zusammensetzt, wäre denkbar (Celeste et al., 2003).

Unklar bleibt in diesem Modell jedoch, welche Proteine an der initialen Erkennung und Signalisierung von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind, wie es zur Rekrutierung und nachfolgender Akkumulation von Proteinen der DNA-Schadensantwort an den Seiten der freien DNA-Enden kommt und welche Rolle die Phosphorylierung von H2AX dabei spielt. In einem neu entwickelten Modell (s. Abb. 2.6 A) geht man davon aus, dass der MRN-Komplex einer der wichtigsten DNA-Schadenssensoren ist (Petrini und Stracker, 2003; Lee und Paull, 2005; Paull und Lee, 2005; Lavin, 2007) und somit die initiale Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen vermittelt. Er bindet an freie

DNA-Enden (Lee und Paull, 2005) und führt anschließend zur Rekrutierung und Aktivierung von ATM (Falck et al., 2005; Lee und Paull, 2005; You et al., 2005; Dupre et al., 2006). Eines der Substrate dieser zentralen Kinase der DNA-Schadensantwort ist das Histon H2AX. Zu diesem frühen Zeitpunkt kommt es aber nur proximal der Läsion zur Phosphorylierung dieses Histons. Die Ausbreitung der Phosphorylierung von H2AX in Bereiche, die weit distal des Strangbruchs liegen, wird von MDC1, einem der wichtigsten Moleküle zur Erkennung von  $\gamma$ H2AX in höheren Eukaryoten (Stucki und Jackson, 2006), vermittelt. Es bindet direkt an das phosphorylierte Histon (Stucki et al., 2005; Lou et al., 2006) und führt auf diese Weise zur Akkumulation und Retention vieler Proteine der DNA-Schadensantwort an Doppelstrangbrüchen (Lukas et al., 2004; Bekker-Jensen et al., 2005). Dabei fungiert MDC1 einerseits als Signalamplifizierer der ATM-vermittelten DNA-Schadensantwort, indem es die Akkumulation von aktiver ATM an den Seiten der DNA-Doppelstrangbrüche herbeiführt. Somit werden weitere ATM-abhängige Phosphorylierungen von H2AX und anderen Proteinen der DNA-Schadensantwort begünstigt, was letztendlich in der Aktivierung von DNA-Schadenskontrollpunkten und der DNA-Reparatur resultiert (Lou et al., 2006). Andererseits fungiert MDC1 auch als Adapterprotein für die Akkumulation von weiteren Molekülen des MRN-Komplexes, fördert deren Retention am Strangbruch (Lukas et al., 2004; Stucki und Jackson, 2006; Chapman und Jackson, 2008) und steigert auf diese Weise erneut die Rekrutierung und Aktivierung von ATM. Durch Förderung der Akkumulation sowohl der ATM-Kinase als auch einer Vielzahl ihrer Substrate in der Nähe des DNA-Schadens beschleunigt MDC1 also die Phosphorylierung dieser Proteine durch ATM. Eine Folge dieser starken Aufkonzentrierung von aktiver ATM an Doppelstrangbrüchen, vermittelt durch MDC1, ist die Ausbreitung der Phosphorylierung von H2AX in Bereiche, die weit distal des initialen Bruchs liegen (Lou et al., 2006; Stucki und Jackson, 2006). Man vermutet, dass die starke Phosphorylierung von H2AX Veränderungen in der lokalen Chromatinstruktur bewirkt und wiederum direkt oder indirekt die Akkumulation von ATM-Substraten an den Seiten der DNA-Brüche fördert (Bassing und Alt, 2004; Lou et al., 2006).

Die Phosphorylierung von H2AX gliedert sich also in eine initiale MDC1-unabhängige Phase und - nach der Rekrutierung von MDC1 zu den DNA-Bruchstellen - eine MDC1-abhängige Phase, die in einem positiven Feedback-Mechanismus zur Amplifizierung des DNA-Schadenssignals führt (Lou et al., 2006; Stucki und Jackson, 2006) (s. Abb. 2.6 B).



**Abbildung 2.6** Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort (**A:** nach Lou et al., 2006; **B:** nach Stucki und Jackson, 2006)

**A:** Die Erkennung von DNA-Schäden erfolgt durch Schadenssensoren wie den MRN-Komplex, was die Rekrutierung und Aktivierung von ATM zur Folge hat. ATM phosphoryliert H2AX und andere Proteine der DNA-Schadensantwort in direkter Nähe des Strangbruchs. MDC1 bindet an  $\gamma$ H2AX und fördert die Akkumulation aktiver ATM. Auf diese Weise kommt es zur Ausbreitung der H2AX-Phosphorylierung innerhalb des Chromatins über Megabasenpaare hinweg. **B:** Flussdiagramm einer möglichen MDC1-abhängigen positiven Feedback-Schleife, die die DNA-Schaden induzierte Phosphorylierung von H2AX über weite Chromatin-Regionen hinweg erklären könnte. Dabei verläuft die initiale Bildung von  $\gamma$ H2AX MDC1-unabhängig mit dem MRN-Komplex als Schadenssensor und Aktivator von ATM. Die Ausbreitung der Phosphorylierung des Histons in distal des Schadens gelegene Bereiche verläuft dagegen MDC1-abhängig.

### 2.2.3 Darstellung und Quantifizierung von $\gamma$ H2AX: Technische Möglichkeiten zur Auswertung von $\gamma$ H2AX-Foci

Zur Identifizierung und zur quantitativen Erfassung von  $\gamma$ H2AX wurden Antikörper entwickelt, die spezifisch gegen die phosphorylierte Form des Proteins gerichtet sind. Mit Hilfe solcher Antikörper lassen sich - in Kombination mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern – die an den Doppelstrangbrüchen akkumulierenden  $\gamma$ H2AX-Moleküle mikroskopisch als so genannte „Foci“ sichtbar machen (Rogakou et al., 1999). Die Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX kann dabei auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen: Zum einen durch Messung der Gesamtintensität von  $\gamma$ H2AX-Fluoreszenzsignalen über die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) und zum anderen durch Auszählen der  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zellkern. Bei der letztgenannten Methode werden dreidimensionale Schnittbilder der Zellkerne an Laser-Scanning- oder Epifluoreszenzmikroskopen angefertigt. Auf diese Weise entstehen Aufnahmen von Zellen, anhand derer nach Zusammenfügen aller Einzelaufnahmen eine Quantifizierung der Foci per Auge möglich ist. Diese Art der Analyse erfordert jedoch ein hohes Maß an Routine und Erfahrung, um konstante Ergebnisse zu liefern und ist darüber hinaus sehr zeitaufwendig. Ein hoher Probendurchsatz, wie er z.B. mit der FACS-Methode erzielt werden kann, ist mit dieser Art der Auswertung nicht zu erreichen. Darüber hinaus ist die Festlegung von Kriterien, nach denen ein Fluoreszenzsignal als Focus definiert und gezählt wird, sehr subjektiv und kann von Betrachter zu Betrachter variieren.

Neue Entwicklungen in der Automatisierung von Bildanalysesystemen bieten die Möglichkeit, DNA-Schäden zeitsparend und mit einer verbesserten Reproduzierbarkeit zu quantifizieren. Die ersten automatisierten Bildanalysesysteme wurden in den 90er Jahren etabliert und fanden insbesondere in der biologischen Dosimetrie und dem Populationsmonitoring Anwendung (Weber et al., 1992; Blakely et al., 1995; Bocker et al., 1995; Huber et al., 1995). Inzwischen konnte die automatische Bildanalyse auf neue Anwendungsbereiche, wie z.B. die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) (Theodosiou et al., 2007; Alpar et al., 2008), die Detektion von Mikrokernen (Bocker et al., 1996; Varga et al., 2004) und die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) (Bocker et al., 1999; Frieauff et al., 2001) erweitert werden.

Die Detektion von fluoreszenzmarkierten  $\gamma$ H2AX-Foci mit Hilfe eines semi- oder vollautomatischen Systems wird in einigen Laboren bereits erfolgreich eingesetzt. Dabei werden sowohl Aufnahmen von Laser-Scanning- (Böcker und Iliakis, 2006) als auch von Epifluoreszenzmikroskopen (Costes et al., 2006) ausgewertet.

Die Firma MetaSystems (Altlusheim) entwickelte ein leistungsstarkes Bildanalyse-System (Metafer), das ursprünglich zur automatischen Detektion von Chromosomen, die sich in der Metaphase befinden, entwickelt wurde, um beispielsweise Dizen-trische Chromosomen zu analysieren. Die Erweiterung der Moduleinheiten führte zur Weiterentwicklung von Metafer4, einer Software, die unter anderem die Quantifizierung des Comet Assays, einer Einzelzellgelelektrophorese, ermöglicht („CometScan“). Diese Programmeinheit eignet sich möglicherweise auch für die Auswertung der Foci, wie sie im  $\gamma$ H2AX-Assay generiert werden.

### **3 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den  $\gamma$ H2AX-Assay in Kooperation mit dem Bundesamt für Strahlenschutz zunächst an Einzelzellen (Lymphozyten) zu etablieren. Des Weiteren wurde eine Automatisierung der Probenanalyse an dem vollautomatischen Bildanalysesystem Metafer angestrebt, um die Auswertung des Assays zu objektivieren und ferner die Möglichkeit zu schaffen, eine größere Probenanzahl mit einer hohen Reproduzierbarkeit zu untersuchen.

In einem nächsten Schritt sollte dann die Eignung des  $\gamma$ H2AX-Tests für die Detektion von sehr geringen strahleninduzierten DNA-Schäden beurteilt werden. Dazu wurden zum einen die Sensitivitätsgrenzen der Methode bei vollautomatischer Probenauswertung durch das für die Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci optimierte Bildanalysesystem ermittelt. Zum anderen wurde im Rahmen eines praktischen Anwendungsbeispiels untersucht, ob es möglich ist, in einem Probenkollektiv von Strahlentherapiepatienten klinisch unterschiedlich strahlenempfindliche Individuen unter Verwendung des  $\gamma$ H2AX-Assays auf molekularer Ebene zu ermitteln. Das eingesetzte Probenmaterial der different strahlenempfindlichen Patienten unterschied sich dabei maximal hinsichtlich kleiner strahleninduzierter DNA-Schäden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien und Geräte

Die nachfolgenden Kapitel (4.1.1–4.1.7) geben einen Überblick zur Material- und Geräteausstattung der anschließenden Untersuchung.

#### 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

##### Bezeichnung

Agarose (2. Schicht)

Agarose, low-melting (1.Schicht)

Biocoll Separating Solution (Ficoll)

(Dichte 1,077 g/ml)

Glycin

Hoechst-Farbstoff 33342

(Lagerung: -20°C)

Natriumchlorid (NaCl)

Paraformaldehyd (PFA)

Rinderserumalbumin (BSA)

Triton-X-100

Trypanblau (0,5%)

Türks-Lösung

Vectashield Eindeckmedium

##### Bezugsquelle

Amresco, Solon

Serva, Heidelberg

Biochrom, Berlin

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Fluka, Buchs (Schweiz)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Biochrom, Berlin

Merck, Darmstadt

Linaris, Westheim-Bethingen



#### 4.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

<b><u>Bezeichnung</u></b>	<b><u>Bezugsquelle</u></b>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	PAA Laboratories, Cölbe
RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin	Biochrom, Berlin

#### 4.1.3 Verbrauchsmaterialien

<b><u>Bezeichnung</u></b>	<b><u>Bezugsquelle</u></b>
Alkoholtupfer Alco-Prep Medium	neoLab, Heidelberg
Deckgläser (24x50 mm)	IDL, Nidderau
Einwegkanülen, steril (0,9/38 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf Reaktionsgefäß (ERG) (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen für Zellkultur (15 und 50 ml)	Nunc, Wiesbaden
Filterkarten für Zytospin (für Winkelkammer Ø 6,2 mm)	Hettich, Tuttlingen
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nunc, Wiesbaden
Leucosep-Röhrchen mit Filter (50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Objektträger für Agarose-Einbettung (mit Cello-Einleger)	Menzel, Braunschweig
Objektträger für Zytospin, Super Frost Plus	Menzel, Braunschweig
Objektträger-Boxen	neoLab, Heidelberg
Parafilm	neoLab, Heidelberg
S-Monovette K-EDTA mit steriler Einwegkanüle (9 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zyto-Winkelkammern (30 mm <sup>2</sup> Fläche)	Hettich, Tuttlingen

#### 4.1.4 Antikörper

##### Bezeichnung

$\gamma$ -H2AX Antikörper  
Anti-Phospho-Histone H2A.X  
(clone JBW301, mouse monoclonal IgG<sub>1</sub>)  
(Lagerung: -20°C, in Aliquots zu 3  $\mu$ l)

##### Bezugsquelle

Biomol, Hamburg

fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper Jackson Immuno, Suffolk (UK)  
(Cy3 goat anti mouse)  
(Lagerung: -80°C, in Aliquots zu 5  $\mu$ l)

#### 4.1.5 Lösungen und Puffer

##### Bezeichnung

Antikörperpuffer für die  
Immunfluoreszenzfärbung  
(Verdünnung 1:500)  
  
(primärer und sekundärer  
Antikörper)

##### Herstellung

2  $\mu$ l Antikörper  
in 998  $\mu$ l Blocklösung

Blocklösung

1 g BSA  
0,15 g Glycin  
in 100 ml PBS

Fixierlösung (2 bzw. 4%ig)  
(Lagerung: -20°C)

2 bzw. 4 g PFA  
in 100 ml PBS  
  
- auf einer Heizplatte bei ca. 72°C rühren, bis die  
Flüssigkeit klar wird und das PFA vollständig gelöst ist  
- abkühlen lassen und in 10 ml Falcon-Röhrchen  
aliquotieren

Kryomedium für  
Lymphozyten

RPMI 1640  
50% FCS  
10% DMSO

Lösung zur Anfärbung der Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff 33342	1 µg Hoechst-Farbstoff 33342 pro ml PBS
Lymphozyten-Medium	RPMI 1640 20% FCS
Lyse-Puffer	750 µl Triton X-100 in 500 ml PBS
Natriumchlorid-Lösung (0,9%ig)	0,9 g Natriumchlorid in 100 ml Aqua dest.
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Triton-X-Lösung für Deckgläser	1 % Triton-X in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Trypanblau-Färbelösung	40 µl Trypanblau in 140 µl PBS

#### 4.1.6 Vollautomatisches Bildanalyzesystem

<u>Bezeichnung</u>	<u>detaillierte Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
40x Objektiv	Plan-Neofluar (40x/0,75)	Zeiss, Göttingen
63x Objektiv	Achroplan (63x/0,80)	Zeiss, Göttingen
CCD-Kamera	M1	JAI, Stemmer Imaging, Puchheim
Computer		DELL, Langen
DAPI-Filter	Filtersatz 02	Zeiss, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2	Zeiss, Göttingen
Quecksilber Kurzbogenlampe	HBO 103	Zeiss, Göttingen
Rhodamin-Filter	Filtersatz 15	Zeiss, Göttingen
Software Metafer 4	(Version 3.1.2)	MetaSystems, Altlußheim

#### 4.1.7 Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>detaillierte Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Autoklav		Tuttnauer Systec, Wettenberg
Bestrahlungsanlage $^{137}\text{Cs}$	HWM-D-2000	Gammacell, Ottawa (Kanada)
Bestrahlungsanlage Röntgenquelle	Isovolt 420	Seifert, Ahrensburg
Brutschrank	Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Dosimeter Röntgenquelle (1 cm <sup>3</sup> Messkammer)	Unidos Dosimeter	PTW, Freiburg
Einfrierbox	Nalgene® Cryo1°C Freezing Container „Mr. Frosty”	Nalgene, Wiesbaden
Eismaschine	AF10	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills
Eppendorf-Pipette, variabel (0-10 µl)		Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipette, variabel (20-200 µl)		Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipette, variabel (100-1000 µl)		Eppendorf, Hamburg
Färbekammer für Objektträger		Carl Roth, Karlsruhe
Flüssigstickstofftank	Cryoson WAN-70	Cryoson, Schöllkrippen
Gefrierschrank (-20°C)		Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80°C)		Sanyo, München
Heizblock	BT 130-2	HLC, Bovenden
Kältefalle	Typ 12500	MEDAX, Kiel
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	Mikromat Duo	AEG, Nürnberg
Präzisionswaage	BP 310P	Sartorius, Göttingen
Spannplatten mit Ring		Hettich, Tuttlingen
Sterilwerkbank	Lamin Air HL 2448	Heraeus, Hanau
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge für ERGs	Sigma 1 K15	Sigma, Deisenhofen
Vortex-Mixer		neoLab, Heidelberg
Wasserbad		Köttermann, Uetze- Hänigsen
Zählkammer (modifiziert nach Neubauer)		neoLab, Heidelberg
Zentrifuge (Zellkultur)	5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zytozentrifuge	Rotofix 32 A (8-fach Rotor)	Hettich, Tuttlingen

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Gewinnung von humanem Vollblut

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde von einer gesunden weiblichen und einer gesunden männlichen Person mittleren Alters (30-40 Jahre) Blut mittels eines S-Monovetten K-EDTA Blutabnahmesystems gewonnen. Die Blutabnahme erfolgte nach Venenstauung und Hautdesinfektion an der rechts- oder linksseitigen Vena mediana cubiti. Das antikoagulierte Vollblut diente als Ausgangsmaterial für die Isolierung von primären Lymphozyten. Die Lagerung der gewonnenen Proben bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei Raumtemperatur (RT).

### 4.2.2 Zellbiologische Methoden

#### 4.2.2.1 Gewinnung von primären Lymphozyten durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Isolierung der peripheren Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) - zu denen Lymphozyten und Monozyten gezählt werden - von den übrigen Bestandteilen des Blutes (Plasma, Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten)

wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit dem Separationsmedium Ficoll (Biocoll Separating Solution) durchgeführt. Aufgrund seiner spezifischen Dichte von 1,077 g/ml ist es damit möglich, Blut durch Zentrifugation in seine einzelnen zellulären Bestandteile ihrer Dichte entsprechend aufzutrennen. Hierzu wurden 15 ml Ficoll in ein Leucosep-Röhrchen mit integriertem Trennfilter gefüllt und 1 min bei 1000 x g (RT) zentrifugiert. Durch diesen Vorgang kommt das Separationsmedium unterhalb des Trennfilters zu liegen. Jeweils 9 ml des antikoagulierten Blutes wurden in die auf diese Weise vorbehandelten Leucosep-Röhrchen gegeben und 10 min bei 1000 x g (RT) zentrifugiert. Durch die Zentrifugation sammeln sich in der obersten Schicht Blutplasma und Thrombozyten, darunter reichern sich die PBMCs über einer Ficoll-Schicht an. Unter dem Trennfilter folgt auf eine weitere Schicht Ficoll die Zellfraktion der Erythrozyten und Granulozyten. Das Blutplasma wurde vorsichtig abgesaugt und der verbleibende weißliche Lymphozytenring mit 9 ml RPMI-Medium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach 10minütiger Zentrifugation (250 x g, RT) wurden die Waschschrte 2x mit jeweils 5 ml RPMI wiederholt. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt fand eine erste Bestimmung der Zellzahl zur Abschätzung des zum Einfrieren der Zellen benötigten Kryomedium Volumens statt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte anhand einer Lebend/Tot-Färbung mit Hilfe einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer (Kammertiefe 0,1 mm). Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau verdünnt und in eine Zählkammer nach Neubauer transferiert. Unter einem Lichtmikroskop wurden anschließend die lebenden Zellen ausgezählt. Die Zellzahl von 4 Großquadraten wurde bestimmt und der daraus errechnete Mittelwert mit dem Faktor  $10^5$  multipliziert, um die Gesamtzellzahl pro ml zu errechnen. Mit weiteren 20 µl der Zellsuspension fand eine zweite Berechnung der Zellzahl durch spezifische Anfärbung der Lymphozyten und Lyse der Erythrozyten mit Türks-Lösung in einer Verdünnung von 1:10 statt. Die Auszählung der Zellen erfolgte in der oben beschriebenen Weise ebenfalls mit Hilfe einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer.

#### **4.2.2.2 Kryokonservierung von primären Lymphozyten**

Für die Kryokonservierung wurden die Lymphozyten nach dem letzten Zentrifugationsschritt in einer Dichte von ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in kaltem Kryomedium (s. Kapitel 4.1.5) aufgenommen. Während die Zellsuspension auf Eis gekühlt wurde, fand eine zweite Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau, wie unter 4.2.2.1 beschrieben, statt. Im Anschluss wurden Aliquots der Zellsuspension auf Eis in Kryoröhrchen überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Box über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in einen Flüssigstickstofftank überführt und darin bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **4.2.2.3 Auftauen und Kultivierung von primären Lymphozyten**

Zum Auftauen der Zellen wurde die gewünschte Menge an Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut. Möglichst schnell nach Verflüssigung der Zellsuspension wurde diese in vorgelegtes Lymphozyten-Medium (s. Kap. 4.1.5) überführt und die Zellen abzentrifugiert ( $244 \times g$ , 6 min, RT). Anschließend wurde das Pellet je nach Menge der Zellen in 1-3 ml Lymphozyten-Medium aufgenommen und die Zellzahl mit einer Türks-Färbung (s. Kapitel 4.2.2.1) bestimmt.

Die Kultivierung der primären Lymphozyten fand unter Zugabe von 1 ml Lymphozyten-Medium pro 500.000 Zellen über Nacht im Brutschrank statt ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Am nächsten Morgen wurde die Zellzahl ein weiteres Mal mit einer Türks-Färbung bestimmt und das Medium abzentrifugiert ( $244 \times g$ , 6 min, RT).

Für das Aufbringen der Lymphozyten auf Objektträger durch Zentrifugation („Zytospin“, s. Kapitel 4.2.5.1) wurde das Zellpellet in einer Dichte von 250.000 Zellen/100  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium aufgenommen. Anschließend wurden je 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße (ERGs) überführt. Sollten die Lymphozyten in Agarose eingebettet oder auf Objektträger aufgetropft werden, wurden die Zellen in einer Dichte von 100.000 Zellen/10  $\mu\text{l}$  NaCl-Lösung (0,9%ig) aufgenommen und in ERGs pipettiert. Bis zur Durchführung der Bestrahlung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

### **4.2.3 Bestrahlung von Zellen mit ionisierender Strahlung**

Um Doppelstrangbrüche und damit auch die Phosphorylierung des Histons H2AX in primären Lymphozyten zu induzieren, wurden die Zellen in dieser Arbeit ionisierender Strahlung ausgesetzt. Dabei wurden Versuche mit Bestrahlungsdosen von 10 mGy bis 2 Gy an einer Röntgenquelle, Versuche mit Bestrahlungsdosen von 100 mGy bis 10 Gy an einer  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle durchgeführt.

#### **4.2.3.1 Bestrahlung von Zellen mit einer $^{137}\text{Cs}$ -Quelle**

In einem Dosisbereich von 100 mGy bis 10 Gy fanden die Bestrahlungen von Zellen an der  $^{137}\text{Cs}$ -Bestrahlungsanlage HWM-D-2000 des Helmholtz Zentrums München, wie von Gomolka et al. (2005) beschrieben, statt. Die Dosisleistung dieses Gerätes beträgt 0,6 Gy/min (Stand: Januar 2008), so dass die Zellen bei einer minimalen applizierten Dosis von 100 mGy 10 Sekunden, bei einer maximalen Dosis von 10 Gy 16,6 Minuten bestrahlt wurden. Der Transport der Proben sowie die Bestrahlung selbst erfolgten in ERGs auf Eis in einem Probenrondell aus Kunststoff.

#### **4.2.3.2 Bestrahlung von Zellen mit einer Röntgenquelle**

In einem Dosisbereich von 10 mGy bis 2 Gy wurden die Bestrahlungen von Zellen an der Röntgenröhre Isovolt 420 des BfS durchgeführt. Die Dosisleistung dieses Geräts und der Anodenstrom (mA) variierten versuchsbedingt (Einzelheiten zu den Bestrahlungsparametern s. Tab. 4.1). Die in beiden Versuchen verwendete Röhrenspannung betrug 220 kV bei einer Filterung mit 4 mm Aluminium und 0,5 mm Kupfer. Die Dosimetrie wurde bei Raumtemperatur mit einem Unidos Dosimeter durchgeführt. Bei dieser Versuchsanordnung ist es nicht möglich, die Zellen während der Bestrahlung auf Eis zu lagern; daher wurde sie bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden mit Hilfe von Schaumgummi-Schablonen in stehender Position im Strahlengang fixiert. Der Transport der Zellen erfolgte auf Eis.



**Tabelle 4.1 Einzelheiten zu den beiden mittels einer Röntgenquelle durchgeführten Bestrahlungsversuchen**

Versuch 1	Dosis	mA	Abstand	Bestrahlungszeit (min)	Dosisleistung (mGy/min)
	10 mGy	2	max. (1,92 m)	1,6	6,69
	50 mGy	8	max. (1,92 m)	2	24,8
	100 mGy	15	max. (1,92 m)	2,2	45,5
	500 mGy	16	1 m	2,9	172,3
	1 Gy	16	1 m	5,8	172,4
	2 Gy	16	1 m	11,4	175,4
Versuch 2	Dosis	mA	Abstand	Bestrahlungszeit (min)	Dosisleistung (mGy/min)
	10 mGy	2	max. (1,92 m)	1,6	6,3
	50 mGy	8	max. (1,92 m)	2	25
	100 mGy	15	max. (1,92 m)	2,2	46
	500 mGy	16	1 m	2,9	172,6
	1 Gy	16	1 m	5,8	172,4
	2 Gy	16	1 m	11,7	171

#### 4.2.4 Inkubation und Fixierung von primären Lymphozyten

Nach der Bestrahlung wurden die Proben im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Dabei variierte die Inkubationszeit je nach Versuch von 30 min bis zu 24 h. Bei Lymphozyten, die auf Objektträger zentrifugiert werden sollten („Zytospin“, s. Kapitel 4.2.5.1), wurde nach Ablauf der Inkubationszeit zu den 100 µl Zellsuspension 100 µl der 4%igen Paraformaldehyd-Fixierlösung ins ERG pipettiert. Nach 15 minütiger Inkubation (RT) wurde die Fixierlösung mit einer Tischzentrifuge für Eppendorf-Gefäße abzentrifugiert (300 x g, 5 min, RT) und die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen.

Sollten die Lymphozyten in Agarose eingebettet oder aufgetropft werden, fand die 15 minütige Zellfixierung erst nach dem Aufbringen der Proben auf die Objektträger in Küvetten mit 2%iger Flixierlösung statt.

#### 4.2.5 Aufbringen von primären Lymphozyten auf Objektträger

##### 4.2.5.1 Zentrifugieren der Zellen auf Objektträger („Zytospin“)

Mit Hilfe eines Zytospins können Zellen ohne zusätzliches Einbettungsmedium als Einschichtpräparat auf einen Objektträger zentrifugiert werden. Durch eine spezielle Zytospin-Apparatur (s. Abb. 4.1), bestehend aus Spannplatte mit Ring, Glasobjektträger, Filterpapier und Winkelkammer, ist es möglich, Zellen auf einen definierten zentralen Bereich des Objektträgers aufzubringen. Die Restflüssigkeit wird dabei durch ein Filterpapier absorbiert. Die einzelnen Teile der Zytospin-Apparatur werden so zusammengesetzt, dass der Auslass des Plastikaufsatzes und das Loch im Filterpapier kongruent sind.

Die fertig zusammengesetzte Zytospin-Apparatur wurde in die Zytozentrifuge eingelegt und die Winkelkammern mit 100 µl Zellsuspension (Zelldichte ca. 250.000 Zellen) befüllt. Nach der Zentrifugation (500 x g, 5 min, RT) wurden die Objektträger aus den Spannplatten entnommen und bis zur weiteren Bearbeitung in PBS befüllten Küvetten gelagert.

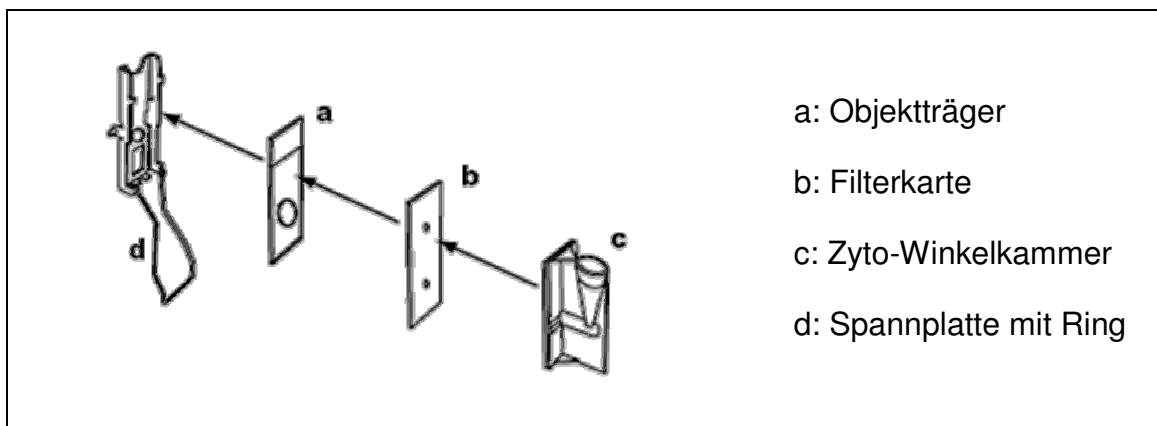


Abbildung 4.1 Aufbau einer Zytospin-Apparatur (nach Thermo Electron Corporation, USA)

#### **4.2.5.2 Einbettung von Zellen in Agarose**

Für die Einbettung von primären Lymphozyten in Agarose wurden die verwendeten Objektträger mit einer 0,1%igen Agaroseschicht überzogen. Hierzu wurden 0,01 g Agarose (low melting) in 10 ml NaCl-Lösung (0,9%ig) gelöst und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen im Wasserbad bei 50°C 10 min zum quellen gebracht. Anschließend wurde die Agarose in der Mikrowelle kurz aufgekocht und gelöst (Vortex-Mixer). Nach 3-maliger Wiederholung dieser Schritte wurde die Agarose in Eppendorf-Cups portioniert und bei 50°C bis zur Verwendung flüssig gehalten. Die mit Aqua dest. abgespülten Objektträger wurden zuerst bei 46°C und nach dem Aufbringen von 200 µl Agarose mittels eines Spatels bei abgeschalteter Heizplatte über Nacht getrocknet.

Um ein späteres Ablösen der zweiten Agaroseschicht von den Objektträgern bei Abnahme des Deckglases zu vermeiden, wurden diese mit Triton-X-Lösung (s. Kapitel 4.1.5) beschichtet und anschließend in aufrechter Position luftgetrocknet.

Die zweite Schicht Agarose (0,5%ig) wurde in gleicher Weise wie die 0,1%ige Agarose hergestellt und im Thermomixer bis zur Verwendung flüssig gehalten. Je 10 µl der unbestrahlten bzw. bestrahlten Zellsuspension wurden mit 100 µl Agarose suspendiert, auf den Objektträger (mit Cello-Einleger für die Agarose-Einbettung) aufgetragen und mit einem Triton-X behandelten Deckglas abgedeckt. Nach 5 minütigem Aushärten auf der Kälteplatte wurden die Deckgläser entfernt, so dass die Zellen in 2%iger Paraformaldehydlösung in Küvetten fixiert werden konnten.

#### **4.2.5.3 Auftropfen von Zellen**

Bei dieser Methode wurden 10 µl der Zellsuspension mittig aus geringer Höhe auf einen Objektträger getropft und anschließend luftgetrocknet. Danach wurden die Zellen in Küvetten, befüllt mit 2%iger Paraformaldehydlösung (Fixierlösung), fixiert.

#### 4.2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Nach dem Aufbringen der primären Lymphozyten auf Objektträger durch Zentrifugation, Agarose-Einbettung oder Auftropfen, der Zellfixierung mit Paraformaldehyd und der darauf folgenden Lagerung der Objektträger in PBS, wurden die Lymphozytenzellkerne 3x5 min in mit Lyse-Puffer (s. 4.1.5) befüllten Küvetten permeabilisiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten in speziellen Immunfluoreszenz-Färbekammern. Hier wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch 3-maliges waschen (je 10 min) mit Blocklösung (s. 4.1.5) (1,5 ml/OT) abgesättigt. Jeweils 75 µl des Primärantikörper-Puffers (s. 4.1.5) wurden anschließend auf die Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas über Nacht in den Färbekammern bei 4°C auf den Objektträgern belassen.

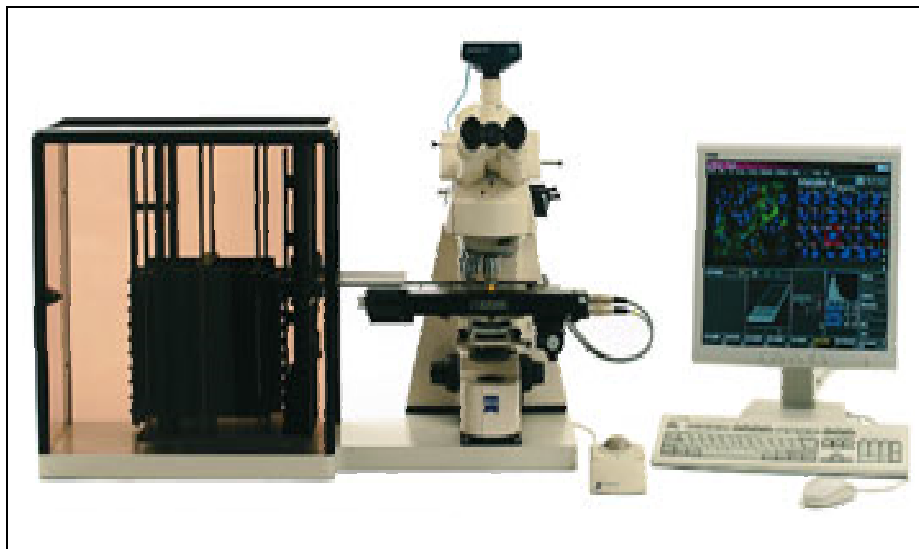
Im Anschluss an die 24stündige Inkubation wurden die Objektträger in Küvetten 5 min in PBS, 10 min in Lyse-Puffer und 5 min in PBS gewaschen, bevor die Zellen 7 min in der Färbekammer mit je 1,5 ml Blocklösung/OT permeabilisiert wurden. Ab diesem Zeitpunkt fanden alle Arbeitsschritte im Dunkeln statt. Die Objektträger wurden anschließend mit dem Antikörperpuffer für den Sekundärantikörper (s. 4.1.5) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 45 min erfolgten jeweils 2 Waschschrte in Küvetten mit Lyse-Puffer (je 5 min) und PBS (10 und 7 min). Dann wurden die Zellen 2 min mit der Lösung zur Anfärbung der Zellkerne (Hoechst-Farbstoff 33342) (s. 4.1.5) in Küvetten inkubiert. Nach 2 weiteren Waschvorgängen mit PBS (je 2 min) wurden die Zellen mit 10 µl Vectashield Eindeckmedium überschichtet.

Die Objektträger wurden in lichtundurchlässigen Boxen, die mit feuchtem Zellstoff und Parafilm ausgelegt wurden, bei 4°C gelagert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte innerhalb einer Woche, um Intensitätsverluste der Fluoreszenzsignale zu vermeiden.

#### 4.2.7 Quantifizierung von $\gamma$ H2AX-Foci

Die computervermittelte Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Fluoreszenzsignalen erfolgte durch das vollautomatische System der Firma MetaSystems, bestehend aus einem Computer, der Software Metafer4 (Version 3.1.2), einer CCD-Kamera, einem Epifluoreszenzmikroskop und einem externen Objektträger-Wechsler. Dieser ermöglicht die Analyse von bis zu 80 Objektträgern. Das System wird im Detail von Schunck et al. (2004) beschrieben.

Für die Detektion der mit Hoechst-Farbstoff 33342 fluoreszenzmarkierten Zellkerne wurde ein DAPI-Filter (Filtersatz 02, Anregung: G 365, Strahlteiler: FT 395, Emission: LP 420) verwendet. Die Anregung der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierten  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte durch einen Rhodamin-Filter (Filtersatz 15, Anregung: BP 546/12, Strahlteiler: FT 580, Emission: LP 590). Außerdem wurden zwei unterschiedlich hoch auflösende Objektive - ein 40x Objektiv (Plan-Neofluar, 40x/0,75) und ein 63x Objektiv (Achromplan, 63x/0,80) - eingesetzt.



**Abbildung 4.2** Das vollautomatische Bildanalysesystem Metafer (aus Schunck et al., 2004)

Links im Bild ist der externe Objektträger-Wechsler abgebildet, der die Analyse von bis zu 80 Objektträgern ermöglicht. In der Mitte befindet sich das Epifluoreszenzmikroskop und rechts davon ist die Software Metafer4 auf dem Bildschirm dargestellt (Abbildung ohne PC).

#### 4.2.8 Untersuchungsmaterial von Strahlentherapiepatienten

Das Deutsche Krebsforschungszentrum Heidelberg hat in den Jahren 2005 bis 2008 in Kooperation mit verschiedenen Forschungseinrichtungen – darunter auch das Bundesamt für Strahlenschutz – eine Studie zu dem Thema „Molekulare Biomarker für zelluläre und klinische Strahlenempfindlichkeit“ durchgeführt (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, FuE Vorhaben StSch 4467). Im Rahmen dieses Projektes wurde an einem Kollektiv von klinisch strahlenempfindlichen und dazu passenden klinisch unauffälligen Strahlentherapiepatienten mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich bzw. Mammatumoren die Assoziation der klinischen Reaktion auf die Bestrahlung mit verschiedenen zellulären Biomarkern untersucht. Die Charakterisierung der Patienten als strahlenempfindlich bzw. strahlenunempfindlich erfolgte bereits in einer vorangegangenen Studie (Bundesumweltministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, 2005). Dabei erfolgte die Beurteilung der klinischen Strahlenempfindlichkeit an der Haut im Bestrahlungsfeld sowie zusätzlich auch an der Schleimhaut von Mund und Rachen im Fall von Bestrahlungen im Kopf-Hals-Bereich. Die Klassifikation der akuten Nebenwirkungen erfolgte prospektiv nach den Kriterien der RTOG (*Radiation Therapy Oncology Group*) bzw. EORTC (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) (Cox et al., 1995).

Primäre Lymphozyten aus dem Vollblut der klinisch strahlenempfindlichen und klinisch nicht strahlenempfindlichen Strahlentherapiepatienten wurden zentral an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Münster isoliert und kryokonserviert an die verschiedenen Forschungseinrichtungen verschickt. Nach dem Auftauen des Probenmaterials und Inkulturnahme der Zellen über Nacht (s. Kapitel 4.2.2.3) wurden die Lymphozyten der Strahlentherapiepatienten am BfS in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 5 Gy ( $^{137}\text{Cs}$ -Quelle) auf Eis bestrahlt und anschließend für 24 h unter Zugabe von 1 ml Lymphozyten-Medium pro 500.000 Zellen in Falcon-Röhrchen (15 ml) im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Nach Abstoppen der zellulären Reparaturprozesse mit 4%iger Paraformaldehyd-Fixierlösung, dem Zentrifugieren der Zellen auf Objektträger und Immunfluoreszenzfärbung wurden die anonymisierten Proben an Metafer4 gemessen.

#### 4.2.9 Statistische Methoden und Auswertung

Die Beschreibung der Daten umfasst die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM). Pro Objektträger wurden 200-300 Zellkerne ausgewertet, wobei in jedem Versuch pro Datenpunkt 2-4 Parallelproben angefertigt wurden. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Versuche 2-3-mal unabhängig voneinander wiederholt.

Die Ergebnisse aus Kapitel 5.2 wurden in einem Einzelversuch ermittelt. Pro Objektträger wurden dabei 300 Zellkerne mit Metafer4 analysiert. Der Gruppenvergleich des Restschadens mit Prüfung auf Signifikanz wurde mittels des Wilcoxon Rangsummen-Tests durchgeführt. Die ROC-Analyse (*Receiver Operation Characteristic*) wurde nach der in SAS 9.0 implementierten Routine (PROC LOGISITIC) erstellt. Als Kriterium für den Wert, der die Gruppen Strahlenempfindliche bzw. nicht Strahlenempfindliche am besten trennt („*cut-off point*“), wurde der maximale Youden-Index gewählt. Die Konfidenzintervalle für die Sensitivität und Spezifität wurden nach der Methode von Pearson und Clopper berechnet. Die p-Werte wurden sowohl für die kontinuierliche Größe „Restschaden“ in einem logistischen Modell als auch für die am *cut-off point* klassifizierte Größe ermittelt. Als Gütemaß für die Eignung des Tests zur Differenzierung von zwei Gruppen (Diskriminationsgüte) wurde die Fläche unter der ROC-Kurve („*area under the curve*“, AUC), herangezogen und nach Hosmer und Lemeshow (2000) bewertet. Dabei erfolgt die Klassifizierung des AUC-Wertes nach folgenden Kriterien:

AUC: 0,5 - <0,6: keine Trennung möglich  
0,6 - <0,8: akzeptable Trennung  
0,8 - <0,9: ausgezeichnete Trennung  
≥ 0,9 : hervorragende Trennung

Alle Berechnungen wurden mit der Software Excel 2003 (Microsoft) durchgeführt.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Optimierung der vollautomatischen Quantifizierung von $\gamma$ H2AX-Foci in Lymphozyten mit der Software Metafer4 von MetaSystems**

Bevor die Auswertung des  $\gamma$ H2AX-Assays automatisiert werden konnte, wurden sowohl das verwendete Inkubationsprotokoll als auch die Methode zur Fixierung von Lymphozyten auf Objektträgern im Hinblick auf den Einsatz des Bildanalyse-Systems Metafer4 optimiert. Die Etablierung einer vollautomatischen Foci-Quantifizierung konnte daraufhin unter optimalen Versuchsbedingungen erfolgen.

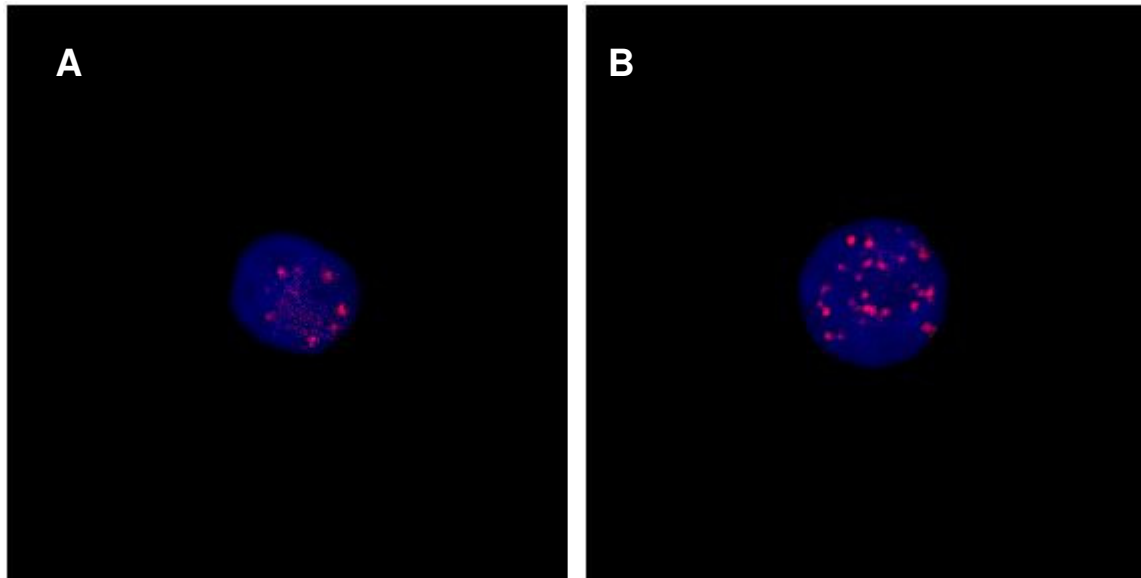
#### **5.1.1 Methodische Optimierungen**

##### **5.1.1.1 Optimierung der Inkubationsbedingungen**

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zur immunzytochemischen Anfärbung von  $\gamma$ H2AX stammt aus dem Institut für Strahlenbiologie des Helmholtz Zentrums München. Zur Überprüfung der Methode erfolgte die Foci-Quantifizierung in Vorversuchen zunächst manuell an Aufnahmen, die am Laser-Scanning-Mikroskop des Helmholtz Zentrums München angefertigt wurden. Später sollten diese Ergebnisse mit Daten verglichen werden, die am Epifluoreszenzmikroskop mit der Software Metafer4 generiert wurden. Bei Verwendung des ursprünglichen Protokolls fiel dabei in bestrahlten Zellen eine deutliche Abschwächung der Signalintensität der am Fluoreszenzmikroskop sichtbaren  $\gamma$ H2AX-Foci im Vergleich zu den mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie erzeugten Bildern auf. Das ursprüngliche auf die Auswertung am Laser-Scanning-Mikroskop ausgerichtete Immunfluoreszenz-Protokoll sieht eine Inkubationszeit von 2 Stunden für den gegen  $\gamma$ H2AX gerichteten Primärantikörper vor. Durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 Stunden konnte eine deutliche Intensitätssteigerung der  $\gamma$ H2AX-Foci erzielt werden, was zu einer Verbesserung der Signalerkennung am Epifluoreszenzmikroskop führte (s. Abb. 5.1).



Daher wurden die Zellen in allen folgenden Versuchen 24 Stunden lang mit dem primären Antikörper inkubiert.



**Abbildung 5.1  $\gamma$ H2AX-Foci in primären humanen Lymphozyten 30 min nach Bestrahlung mit 1 Gy ( $^{137}\text{Cs}$ -Quelle), gemessen mit Metafer4 am Fluoreszenzmikroskop**

A: Lymphozyt nach 2stündiger Inkubation des Primärantikörpers. B: Lymphozyt nach 24stündiger Inkubation des Primärantikörpers. Blau: Kernfärbung mit Hoechst-Farbstoff 33342. Pink:  $\gamma$ H2AX-Foci.

### 5.1.1.2 Optimierung der Fixierung von Lymphozyten auf Objektträgern

In dieser Arbeit wurde der Nachweis von  $\gamma$ H2AX ausschließlich an primären Lymphozyten durchgeführt. Diese Zellen sind Suspensionszellen und wachsen daher nicht adhären auf Objektträgern, sondern bilden lockere Aggregate im Nährmedium. Suspensionszellen können mit verschiedenen Techniken auf Objektträgern fixiert werden. In dieser Arbeit wurden drei Methoden ausgewählt und im Hinblick auf ihre Eignung zur Zellfixierung für eine automatische  $\gamma$ H2AX-Quantifizierung beurteilt: 1. Einbettung der Zellen in Agarose, 2. Auftropfen der Zellen auf Objektträger, 3. Aufbringen der Zellen durch Zentrifugation („Zytospin“).

Die Beurteilung der einzelnen Methoden erfolgte anhand des Zeitaufwandes, der für die Zellfixierung nötig ist, und der erzielten Zelldichte pro Fläche, welche entscheidend für

die Dauer der Messung mit Metafer ist. Ebenso wurde bewertet, ob sich die Zellkerne überlagern und ob sie, hervorgerufen durch die Einbettung in ein Medium, in unterschiedlichen Fokusebenen liegen. Die beiden letztgenannten Punkte können zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, wenn  $\gamma$ H2AX-Foci automatisch quantifiziert werden. Die Resultate dieser Versuche sind in der Tabelle 5.1 zusammengefasst.

**Tabelle 5.1 Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Fixierung von Suspensionszellen auf Objektträgern und Beurteilung im Hinblick auf ihre Eignung für eine Automatisierung der Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX in Lymphozyten**

Methode zur Fixierung von Lymphozyten auf Objektträgern	Zeitfaktor	Zelldichte pro Fläche	Überlagerung der Zellkerne	Zellen liegen in verschiedenen Fokusebenen	Schwierigkeiten im Hinblick auf die Automatisierung
Agarose-Einbettung	↑	gering	nein	ja	- Zelldichte/Fläche zu gering - wegen des Einbettungsmediums Agarose liegen die Zellen in unterschiedlichen Fokusebenen
Zellen aufgetropft	↓	hoch	ja	nein	- Zellkerne überlagern sich
„Zytospin“	↑↓	hoch	nein	nein	

Da das Aufzentrifugieren von Zellen (Zytospin) zwischen der Agarose-Einbettung und dem Auftropfen eine Mittelstellung in Bezug auf den Zeitfaktor einnimmt, mit dieser Methode eine hohe Zelldichte im Verhältnis zur Fläche erzielt werden kann, es zu keiner Überlagerung der einzelnen Zellkerne kommt und die Zellen nicht in verschiedenen Fokusebenen auf dem Objektträger liegen, wurden die Lymphozyten in allen folgenden Versuchen per Zentrifugation fixiert.

### 5.1.2 Optimierung der Messeinstellungen von Metafer4 für eine vollautomatische Quantifizierung von $\gamma$ H2AX

Das Programm Metafer4 wurde ursprünglich von der Firma MetaSystems entwickelt, um Chromosomen zu analysieren. In einem zusätzlichen Programmmodul, „MetaScan“, wurde die Möglichkeit eröffnet, Zellen bzw. Zellkerne anhand von Größe und Form zu erkennen und zu scannen, um anschließend Messparameter an den so selektierten Zellen auszutesten. Auf diese Weise können z.B. DNA-Schäden in der Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet-Assay“) ermittelt und quantifiziert werden (Schunck et al., 2004).

Die zentrale Komponente des vollautomatischen Bildanalyse-Systems ist die Software Metafer4 (s. Abb. 5.2). Sie wird am Bundesamt für Strahlenschutz bereits zur Auswertung des Comet Assays eingesetzt (Rössler et al., 2006). Damit das Programm  $\gamma$ H2AX-Foci in Lymphozyten-Zellkernen detektieren bzw. quantifizieren kann, müssen Schwellenwerte festgelegt werden, anhand derer die Software in der Lage ist, fluoreszenzmarkierte  $\gamma$ H2AX-Signale zu erkennen. Ein Focus wird in Metafer4 über seine Fläche, seine minimale Distanz zum nächsten Fluoreszenzsignal und über die Intensität des Fluoreszenzsignals, mit der sich der Focus vom Hintergrund unterscheidet, definiert. Für die rechnerische Identifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci durch die Software müssen daher Schwellenwerte festgelegt werden, auf deren Grundlage Metafer4 Fluoreszenzsignale als Hintergrund oder  $\gamma$ H2AX-Focus einstuft. Diese Erkennung basiert demnach auf einem Schwellenwert für die Größe des Spots (*Absolute Spot Area*, [1/100  $\mu\text{m}^2$ ]), der minimalen Distanz zwischen zwei Spots (*Minimum Spot Distance*, [1/10  $\mu\text{m}$ ]) und der minimalen Intensität des Fluoreszenzsignals, ab der ein Focus als solcher erkannt wird (*Minimum Spot Intensity*, [%]). Die 3 Schwellenwerte, die in ihrer Kombination einen Focus definieren, werden in Metafer4 als so genannter „Classifier“ bezeichnet und können unter dem Menüpunkt „Classifier Setup“ bzw. „Feature Setup“ generiert werden (s. Abb. 5.3).

Sind diese Einstellungen vorgenommen worden, ist das System in der Lage, eine frei wählbare Anzahl von Zellkernen innerhalb eines zu definierenden Bereichs des Objektträgers zu detektieren und diese anschließend, nach automatischem Filterwechsel,

auf das Vorhandensein von  $\gamma$ H2AX-Foci zu untersuchen. In einer Bildgalerie wird jede Zelle einzeln mit einer durchlaufenden Nummer versehen und unter Angabe der von der Software detektierten Foci abgespeichert. In dieser Galerie von Einzelzellen können Aufnahmen markiert werden, auf denen mehr als eine Zelle abgebildet ist oder Bilder selektiert werden, die andere Fehlerquellen bezüglich der Foci-Quantifizierung aufweisen (z.B. unspezifische Bindung des Antikörpers). Diese Zellen werden manuell ausgeschlossen und gehen damit nicht in die Auswertung ein. Die im Anschluss an die Messung exportierten Daten können in der Software MS-EXCEL weiter bearbeitet werden.

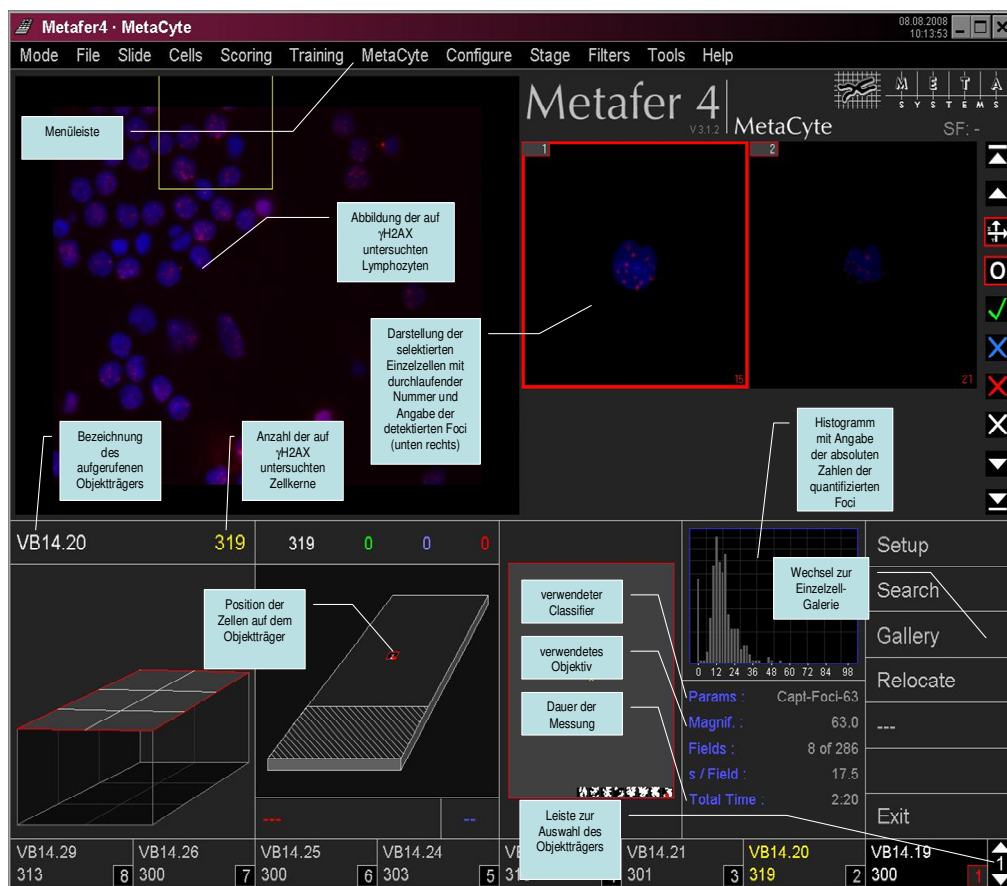
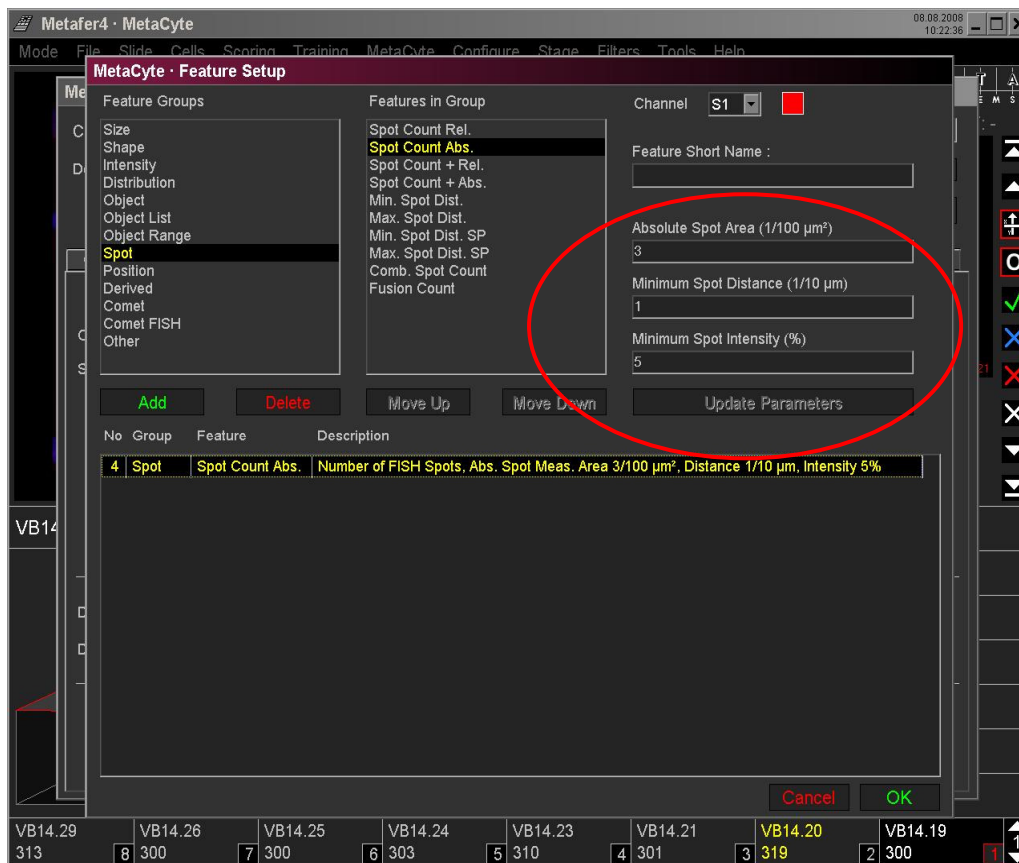


Abbildung 5.2 Bildschirmoberfläche der Software Metafer4 mit Erläuterungen zu einzelnen wichtigen Punkten



**Abbildung 5.3** Bildschirmoberfläche des Menüpunktes „Feature Setup“ der Software Metafer4 zur Erstellung eines Classifiers

Unter dem Punkt „Spot“ und „Spot Count Absolute“ können die Parameter, über die ein Spot (ein  $\gamma$ H2AX-Focus) charakterisiert wird, modifiziert werden. Ein Focus wird durch die Parameter *Absolute Spot Area*, *Minimum Spot Distance* und *Minimum Spot Intensity* definiert. Die Werte sind frei wählbar und untereinander frei kombinierbar, müssen aber  $\geq 1$  sein.

Da zu Beginn der Anpassung von Metafer4 an eine automatische  $\gamma$ H2AX-Quantifizierung in primären Lymphozyten keine Erfahrungswerte darüber vorlagen, mit welchen Einstellungen sinnvolle Messergebnisse erzielt werden können, wurde eine Funktion des Programms genutzt, die es ermöglicht, so genannte „Trainingsdatensätze“ zu erstellen. Dabei werden von der Software zunächst einzelne Bildausschnitte aufgenommen und die Zellen, die sich in den Bildsektoren befinden, unter vorher festgelegten Classifier-Parametern analysiert und in Galeriebildern abgelegt. Die so erstellten Trainingsdatensätze können anschließend wieder ins Programm eingelesen und im Menüpunkt „Training“ (s. Menüleiste in Abb. 5.2) nach Modifikation eines oder mehrerer Schwellenwerte erneut gemessen werden. Die 2. Messung erfolgt dabei an den gleichen Zellen wie die erste. Diese Analysen finden also nicht

fluoreszenzmikroskopisch, sondern digital an einem zuvor erstellten Datensatz von Zellfeldern statt. Die erhaltenen Informationen über die unter den neuen Parametern detektierten Foci werden erneut in der Einzelzell-Bildgalerie dargestellt und können exportiert werden. Der Vorteil dieser Art der Messung liegt darin, dass die Fluoreszenzsignale nicht durch Mehrfachmessungen reduziert werden und die Detektion der  $\gamma$ H2AX-Signale immer an den gleichen Zellen vorgenommen werden kann, was einen direkten Vergleich der Ergebnisse zulässt. Das Ziel bei Verwendung der Trainingsfunktion war die Ermittlung geeigneter Messparameter, auf deren Grundlage dann eine sinnvolle  $\gamma$ H2AX-Foci-Quantifizierung aufbauen sollte.

Zu diesem Zweck wurden primäre humane Lymphozyten mit 1 Gy ( $^{137}\text{Cs}$ -Quelle) bestrahlt und  $\gamma$ H2AX nach einer Inkubationszeit von 30 min sowohl in den bestrahlten als auch in unbestrahlten Lymphozyten immunzytochemisch detektiert. Anschließend wurden von den Zellen Trainingsdatensätze mit Metafer4 aufgenommen. Ausgehend von drei empirisch festgelegten Schwellenwerten wurden verschiedene Variationen der Parameter an den Trainingsdatensätzen untersucht. In die Auswertung gingen jeweils 200 Zellen pro Objektträger ein. Als Grundlage für die Beurteilung der erhaltenen Messwerte dienten die Mittelwerte der einzelnen Messungen (durchschnittliche Anzahl der Foci/Zellkern, s. Tab. 5.2 und 5.3) und die Darstellung dieser Ergebnisse als absolute Zahlen in Form eines Histogramms (s. Abb. 5.4 und 5.5). Aus Experimenten mit Photonenstrahlung (Röntgen- und Gammastrahlung) geht hervor, dass ca. 35 Doppelstrangbrüche pro Gy pro Zelle erzeugt werden (Ward, 1994; Rothkamm und Löbrich, 2003). Dieser Richtwert wurde für die Beurteilung der von Metafer4 quantifizierten mittleren Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci herangezogen. In den unbestrahlten Kontroll-Lymphozyten ist dagegen nur eine geringe Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Foci zu erwarten. Insbesondere Versuche, die bereits bei unbestrahlten Lymphozyten eine hohe Anzahl von Foci zeigten, wurden nicht ausgewertet, da in der Regel versuchsbedingte Probleme zugrunde lagen.

Empirisch wurden zunächst folgende Ausgangseinstellungen festgelegt: der Schwellenwert  $10/100 \mu\text{m}^2$  für die absolute Spot-Fläche,  $5/10 \mu\text{m}$  für die minimale Spot-Distanz und 20 % für die minimale Spot-Intensität. Zur Vereinfachung wird im Weiteren die Reihenfolge der Parameter eingehalten und auf die Angabe der

Bezeichnungen der einzelnen Einstellungen verzichtet (für die oben genannten Schwellenwerte ergibt sich demnach die Classifier-Kurzbezeichnung 10-5-20).

Im ersten Schritt der Schwellenwert-Optimierung wurde ausgehend von den empirisch festgelegten Parametern 10-5-20 eine Messung an einem zuvor generierten Trainingsdatensatz von ca. 200 mit 1 Gy  $^{137}\text{Cs}$  bestrahlten primären Lymphozyten durchgeführt. Da der erhaltene Mittelwert von 8,4 Foci/Zellkern (D'adda Di Fagagna et al.) unter diesem Classifier sehr niedrig ausfiel, wurde in der nächsten Trainingsdatensatz-Messung je einer der 3 Schwellenwerte mit dem Ziel der Sensitivierung der Foci-Detektion verändert und die Auswirkungen dieser Modifikation auf die mittlere Anzahl der Foci pro Zellkern beurteilt. Die Ergebnisse dieser Schwellenwert-Optimierung an bestrahlten Lymphozyten sind in der Tab. 5.2 zusammengefasst bzw. in Form von Histogrammen in der Abb. 5.4 dargestellt. Auf diese Weise wurde versucht, durch Variation der Parameter Messergebnisse in 1 Gy bestrahlten Zellen zu erzielen, die dem in der Literatur angegebenen Wert von ca. 35 Doppelstrangbrüchen pro Zellkern pro Gy (Ward, 1994; Rothkamm und Löbrich, 2003) nahe kommen. Dabei konnte mit der Grundeinstellung 10-5-20 die geringste (8,4) und mit der sensitivsten Einstellung (1-1-1) die höchste durchschnittliche Anzahl (35,1)  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci detektiert werden. Beim Vergleich der Histogramme der mit den einzelnen Classifiern ermittelten absoluten Zahlen (Foci/Zellkern) ist bei den Schwellenwerten 10-5-20 die geringste, unter Verwendung der sehr sensitiven Messeinstellung 1-1-1 die stärkste Streuung innerhalb der Ergebnisse zu erkennen (Abb. 5.4).

In einem weiteren Schritt wurden ausgewählte Messeinstellungen (die Classifier 10-5-20, 1-1-1, 3-1-5 und 5-1-10) an einem Trainingsdatensatz von nicht bestrahlten Lymphozyten erprobt (s. Tab. 5.3 und Abb. 5.5). Die in unbestrahlten Zellen ermittelten Ergebnisse waren für die Beurteilung des Grundschadens (= Anzahl der  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci endogenen Ursprungs) der Zellen wichtig. Dieser sollte möglichst gering sein, da hohe Ausgangswerte an Grundschäden die Sensitivität der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen, induziert durch ionisierende Strahlung, reduzieren (Sedelnikova und Bonner, 2006). Darüber hinaus sollte vermieden werden, dass durch zu sensitive Messeinstellungen unspezifische Strukturen, die nicht einem  $\gamma\text{H2AX}$ -Focus

zuzurechnen sind, durch die Software als solche erfasst und somit quantifiziert werden. Mit dem Classifier 10-5-20 (empirisch festgelegter, wenig sensitiver Ausgangswert) konnten in unbestrahlten primären Lymphozyten in einem weiteren Trainingsdatensatz von ca. 200 Zellen im Mittel 2,3 Foci/ZK detektiert werden, wohingegen mit der sensitivsten Messeinstellung 1-1-1 durchschnittlich 16,2 Foci/ZK quantifiziert wurden. Dieser sehr hohe Grundschaden reduzierte sich auf 14,2 durch Erhöhung der Spot-Größe und der minimalen Intensität des Fluoreszenzsignals (Classifier 3-1-5). Durch eine weitere Anhebung der Schwellenwerte (Classifier 5-1-10) wurden im Durchschnitt nur noch halb so viele  $\gamma$ H2AX-Foci von Metafer4 in den unbestrahlten Lymphozyten detektiert (durchschnittlich 6,5 Foci/ZK) wie mit den Parametern 3-1-5.

Im Vergleich mit anderen Messeinstellungen sind die empirisch festgelegten Schwellenwerte 10-5-20 nicht sensitiv genug für eine effektive Detektion von  $\gamma$ H2AX. Da mit dem Classifier 1-1-1 in den 1 Gy bestrahlten Lymphozyten zwar die höchste mittlere Anzahl an Foci pro Zellkern detektiert werden konnte (35,1), der mit dieser Einstellung ermittelte Grundschaden in unbestrahlten Zellen aber mit 16,2 Foci/ZK sehr hoch war, wurden diese Parameter als nicht geeignet für die Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX in primären Lymphozyten angesehen. Der Classifier 3-1-5 weist eine ausreichende Sensitivität zur Detektion von  $\gamma$ H2AX-Foci in 1 Gy bestrahlten Zellen auf (21,3 Foci/ZK). Die auf diese Weise generierten Messergebnisse zeigen aber im Histogramm eine relativ breite Streuung. Ebenso wie unter Verwendung des Classifiers 1-1-1 kommt es unter Anwendung der Schwellenwerte 3-1-5 in unbestrahlten Zellen zur Detektion vieler (14,2) - möglicherweise unspezifischer -  $\gamma$ H2AX-Foci. Mit den Parametern 5-1-10 konnten im Vergleich zum Classifier 3-1-5 in bestrahlten Lymphozyten zwar weniger Foci pro Zellkern detektiert werden (11,2), dafür ist die Streuung der Werte im Histogramm weniger stark ausgeprägt und in den unbestrahlten Zellen der ermittelte Grundschaden mit 6,5 Foci/ZK deutlich geringer als beim sensitiveren Classifier 3-1-5. Da die Schwellenwerte 3-1-5 und 5-1-10 die grundlegenden Ansprüche an einen Classifier für die Detektion von  $\gamma$ H2AX-Foci in primären Lymphozyten erfüllen, wurden sie in weiteren Versuchen an bestrahlten und unbestrahlten Lymphozyten verglichen. Des Weiteren wurde untersucht, ob durch die Verwendung eines höher auflösenden Objektivs die Erkennung und anschließende Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci durch die Software verbessert werden kann.



## ERGEBNISSE

**Tabelle 5.2 Vergleich der unter verschiedenen Classifiern in einem Trainingsdatensatz von bestrahlten Zellen erhaltenen mittleren Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zellkern**

In die Messung gingen 200 mit 1 Gy ( $^{137}\text{Cs}$ ) bestrahlte Lymphozyten nach 30 min Inkubationszeit ein. Die Analyse erfolgte unter Verwendung eines 40x Objektivs.

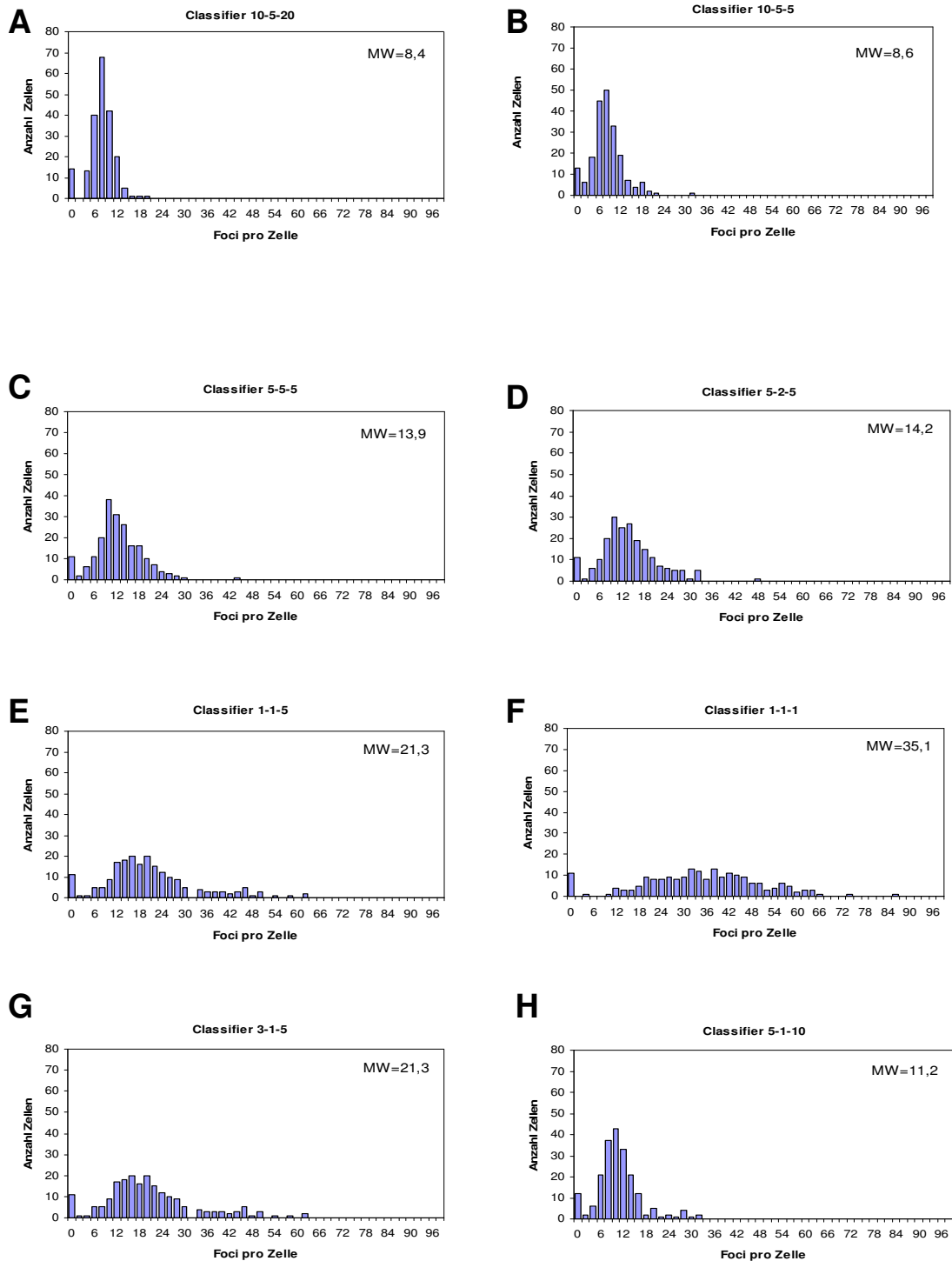
Schwellenwerte	<i>Absolute Spot Area</i> (1/100 $\mu\text{m}^2$ )	<i>Minimum Spot Distance</i> (1/10 $\mu\text{m}$ )	<i>Minimum Spot Intensity</i> (%)	Mittelwert der Foci/Zellkern	dargestellt in Abb.:
10-5-20	10	5	20	8,4	5.4 A
10-5-5	10	5	5	8,6	5.4 B
5-5-5	5	5	5	13,9	5.4 C
5-2-5	5	2	5	14,2	5.4 D
1-1-5	1	1	5	21,3	5.4 E
1-1-1	1	1	1	35,1	5.4 F
3-1-5	3	1	5	21,3	5.4 G
5-1-10	5	1	10	11,2	5.4 H

**Tabelle 5.3 Vergleich der unter verschiedenen Classifiern in einem Trainingsdatensatz von unbestrahlten Zellen erhaltenen mittleren Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zellkern**

In die Messung gingen 200 unbestrahlte Lymphozyten nach 30 min Inkubationszeit ein. Die Analyse erfolgte unter Verwendung eines 40x Objektivs.

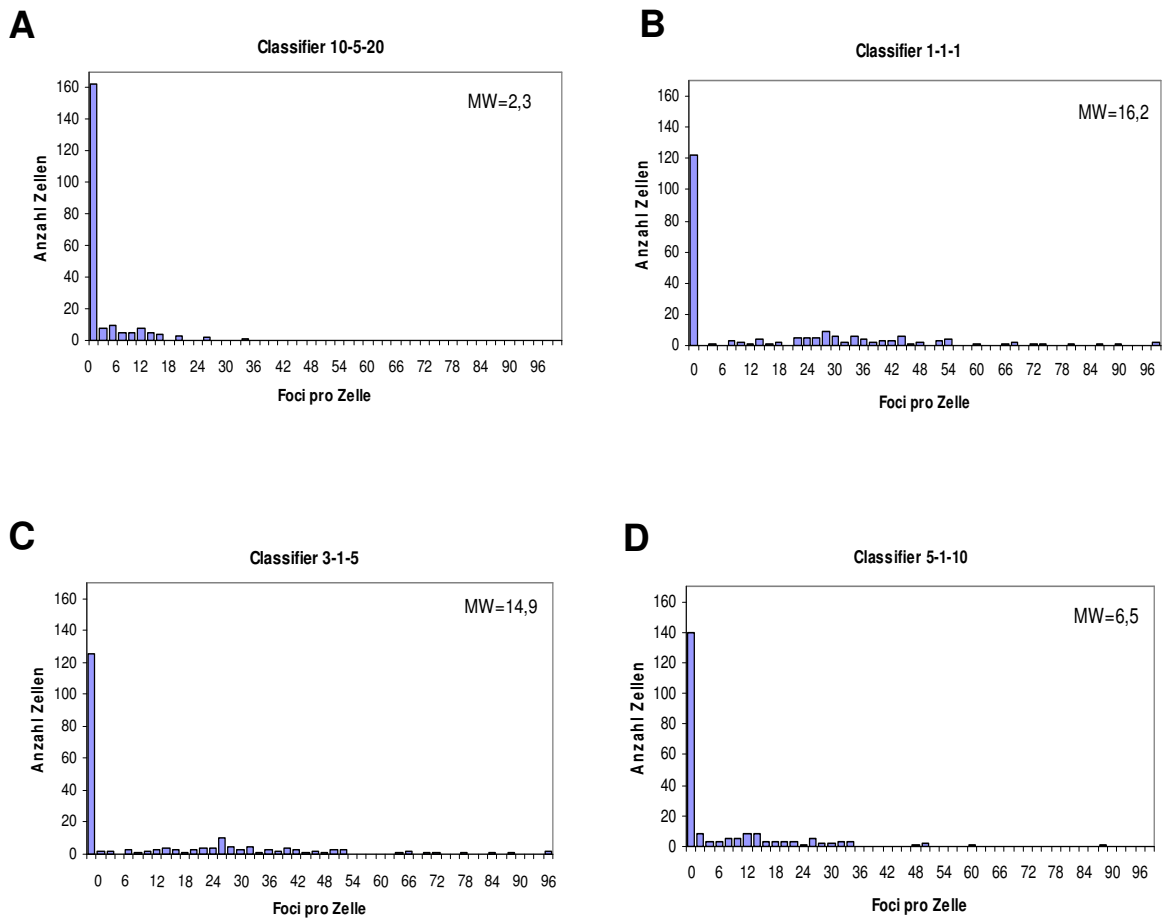
Schwellenwerte	<i>Absolute Spot Area</i> (1/100 $\mu\text{m}^2$ )	<i>Minimum Spot Distance</i> (1/10 $\mu\text{m}$ )	<i>Minimum Spot Intensity</i> (%)	Mittelwert der Foci/Zellkern	dargestellt in Abb.:
10-5-20	10	5	20	2,3	5.5 A
1-1-1	1	1	1	16,2	5.5 B
3-1-5	3	1	5	14,9	5.5 C
5-1-10	5	1	10	6,5	5.5 D

## ERGEBNISSE



**Abbildung 5.4 Vergleich der Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Foci in 1 Gy bestrahlten Lymphozyten ( $^{137}\text{Cs}$ ) nach 30minütiger Inkubation in Abhängigkeit vom Classifier**

Zur Ermittlung geeigneter Parameter für die Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci durch Metafer4 wurden 200 Lymphozyten mit einem Trainingsdatensatz auf die unter den verschiedenen Messeinstellungen ermittelte Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Fluoreszenzsignalen untersucht. Angegeben wird die Anzahl der Zellen (absolute Zahlen) mit n Foci pro Zellkern sowie der errechnete Mittelwert (MW). Die Messung erfolgte unter Verwendung eines 40x Objektivs.



**Abbildung 5.5 Vergleich der Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Foci in unbestrahlten Kontrollzellen nach 30minütiger Inkubation in Abhängigkeit vom Classifier**

4 der Classifier, die an 1 Gy bestrahlten Lymphozyten untersucht wurden (Abb. 5.4), wurden an 200 unbestrahlten Zellen mit einem Trainingsdatensatz auf die unter den verschiedenen Messeinstellungen ermittelte Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Fluoreszenzsignalen untersucht. Angegeben wird die Anzahl der Zellen (absolute Zahlen) mit n Foci pro Zellkern sowie der errechnete Mittelwert (MW). Die Messung erfolgte unter Verwendung eines 40x Objektivs.

### 5.1.3 Optimierung durch die Auswahl unterschiedlich hoch auflösender Objektive

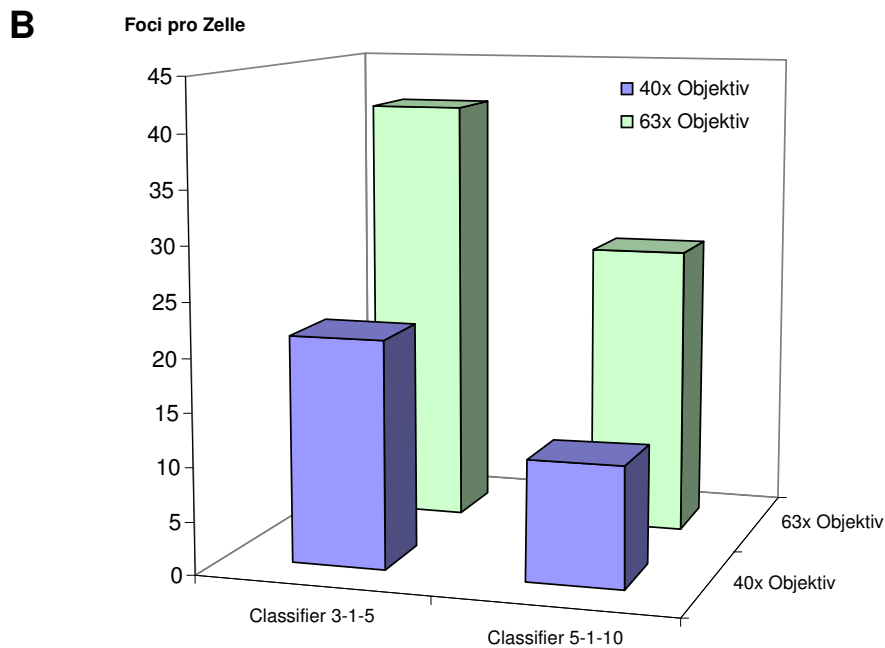
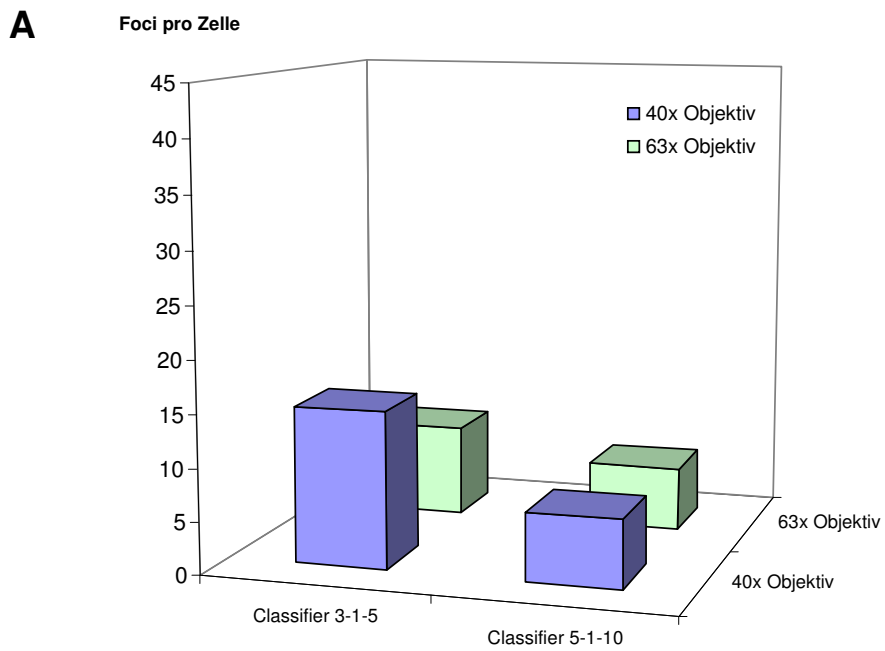
Um zu prüfen, ob die Verwendung unterschiedlich hoch auflösender Objektive einen Einfluss auf die Detektion von  $\gamma$ H2AX-Foci durch die Software Metafer4 hat, wurde ein Trainingsdatensatz von 1 Gy bestrahlten und unbestrahlten Lymphozyten mit einem 63x Objektiv unter Verwendung der Classifier 3-1-5 und 5-1-10 aufgenommen. Die erhaltenen Daten wurden den Ergebnissen des mit einem 40x Objektiv generierten Trainingsdatensatzes aus dem Kapitel 5.1.2 (Tab. 5.2 und 5.3) gegenübergestellt. Diesen Vergleich gibt die Abb. 5.6 wieder.

In unbestrahlten Lymphozyten (Abb. 5.6 A) zeigt sich bei Verwendung eines 40x oder 63x Objektivs kein deutlicher Unterschied in den ermittelten Ergebnissen. Mit den Schwellenwerten 3-1-5 wird aber unabhängig vom verwendeten Objektiv, wie schon in Kapitel 5.1.2 beschrieben, insgesamt ein höherer Grundschaden in nicht bestrahlten Zellen detektiert als mit den Parametern 5-1-10.

In den mit 1 Gy bestrahlten Lymphozyten ( $^{137}\text{Cs}$ ) werden unter Verwendung des 63x Objektivs sowohl mit dem Classifier 3-1-5 als auch mit dem weniger sensitiven Classifier 5-1-10 durchschnittlich nahezu doppelt so viele Foci detektiert wie mit dem 40x Objektiv (Abb. 5.6 B). Auch in diesem Versuch können mit den Schwellenwerten 3-1-5 mehr  $\gamma$ H2AX-Foci in primären Lymphozyten detektiert werden als mit dem Classifier 5-1-10, was die in der Abb. 5.4 dargestellten Ergebnisse bestätigt.

Ein weiterer Faktor, der durch die Wahl der Objektivauflösung beeinträchtigt wird, ist die Dauer der Messung, die pro Objektträger nötig ist, um die gewünschte Anzahl von Zellkernen auf  $\gamma$ H2AX-Fluoreszenzsignale zu untersuchen. Diese wird von der Software unter dem Punkt „Total time“ angegeben (s. Abb. 5.2) und verringerte sich bei Verwendung eines 40x Objektivs um den Faktor 1,5-2 gegenüber solchen Messungen, die mit einem 63x Objektiv durchgeführt wurden.

Um qualitativ hochwertige Ergebnisse zu erzielen, wurde in alle folgenden Versuchen ein 63x Objektiv verwendet.



**Abbildung 5.6** Mittlere Anzahl der unter Verwendung eines 40x bzw. 63x Objektivs detektierten  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zellkern in bestrahlten bzw. unbestrahlten primären Lymphozyten nach 30 minütiger Inkubation

Die Messung erfolgte an Trainingsdatensätzen von jeweils ca. 200 Zellen. Vordere Reihen: Messergebnisse mit 40x Objektiv. Hintere Reihen: Messergebnisse mit 63x Objektiv. Verglichen werden außerdem die unterschiedlich sensitiven Classifier 3-1-5 und 5-1-10. **A:** Unbestrahlte Kontrollzellen. **B:** 1Gy bestrahlte Zellen ( $^{137}\text{Cs}$ ).

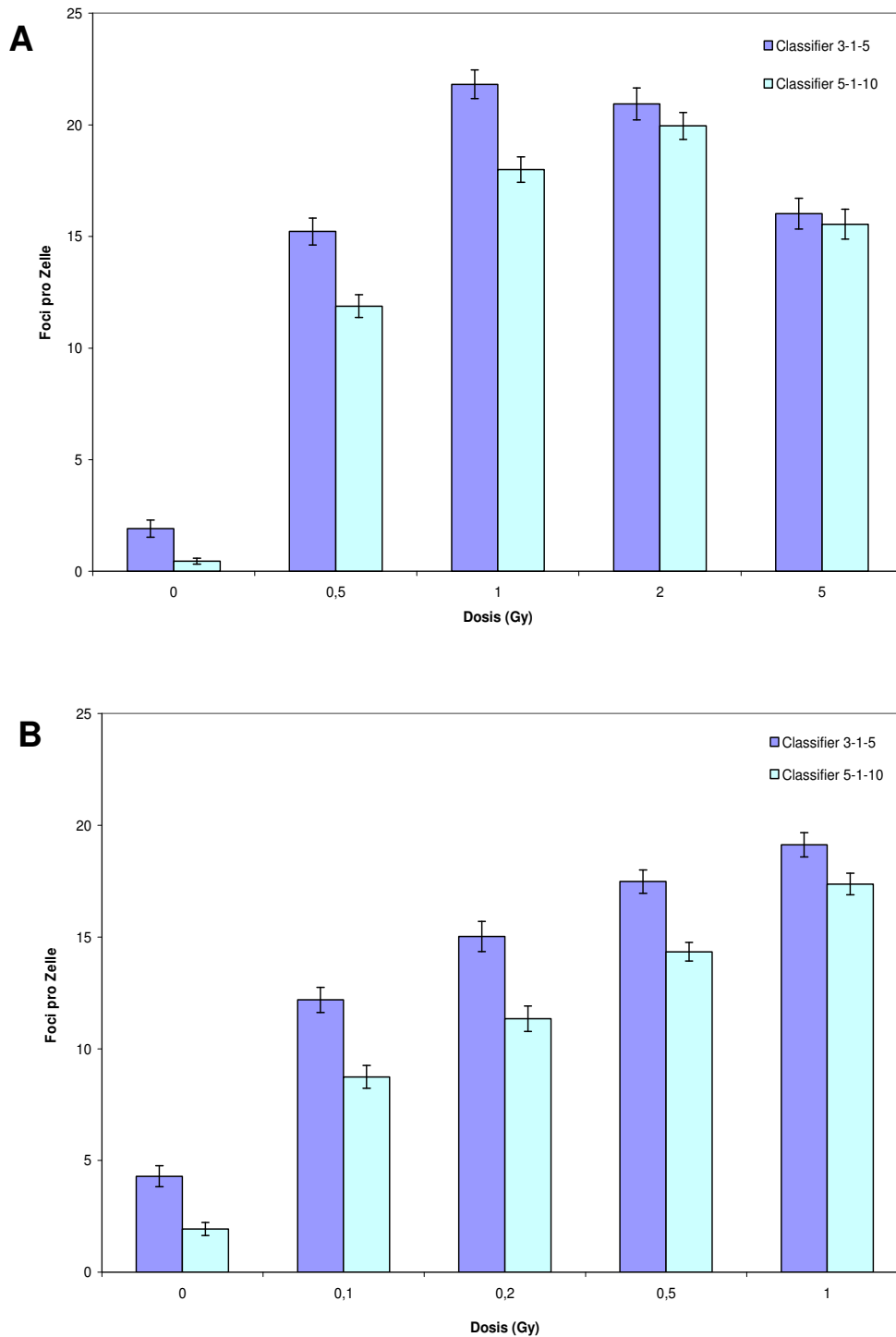
#### 5.1.4 Vergleich der Messeinstellungen 3-1-5 und 5-1-10 in verschiedenen Dosisbereichen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci in Trainingsdatensätzen mit Metafer4 unter Verwendung der Classifier 3-1-5 und 5-1-10 grundsätzlich möglich (Kapitel 5.1.2) und das 63x Objektiv einem 40x Objektiv vorzuziehen ist (Kapitel 5.1.3), wurden die beiden Messparameter in zwei unabhängigen Versuchen auf ihre Eignung zur Detektion von  $\gamma$ H2AX in verschiedenen Dosisbereichen geprüft. Darüber hinaus sollte untersucht werden, innerhalb welcher Nachweisgrenzen eine sinnvolle Quantifizierung der Foci durchführbar ist. Dazu wurden bestrahlte ( $^{137}\text{Cs}$ ) und unbestrahlte primäre Lymphozyten mit einem 63x Objektiv (ohne die Anfertigung von Trainingsdatensätzen) an Metafer gemessen. Da der Vergleich der beiden Classifier bisher nur an unbestrahlten bzw. 1 Gy bestrahlten Zellen vorgenommen wurde (Kapitel 5.1.2 und 5.1.3), sollte in diesen Versuchen die Foci-Detektion durch die Software Metafer4 in einem Dosisbereich von 0 bis 5 Gy (Abb. 5.7 A) bzw. 0 bis 1 Gy (Abb. 5.7 B) untersucht werden. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, ob einer der beiden Parameter dem anderen in unterschiedlichen Dosisbereichen überlegen ist.

Sowohl in der Abbildung 5.7 A als auch in 5.7 B zeigt sich, dass mit dem Classifier 3-1-5 bei allen untersuchten Strahlendosen eine höhere Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Foci detektiert werden kann als mit den Schwellenwerten 5-1-10. Die größere Sensitivität dieser Messeinstellung bedingt in beiden Versuchen auch in den unbestrahlten Kontrollzellen eine höhere durchschnittliche Anzahl der Foci pro Zellkern. Bis zu einem Wert von 1 Gy lässt sich aus den ermittelten Ergebnissen eine dosisabhängige Induktion der  $\gamma$ H2AX-Foci sowohl mit dem Classifier 3-1-5 als auch mit den Parametern 5-1-10 nachweisen. Bei Bestrahlungsdosen  $>1$  Gy (Abb. 5.7 A) sinkt die mittlere Anzahl der detektierten Foci pro Zellkern bei beiden Messeinstellungen unter den für 1 Gy ermittelten Wert.

Insgesamt unterscheiden sich die beiden Classifier nur in den absoluten Zahlen der quantifizierten Foci. Sie spiegeln aber beide die gleiche Tendenz bezüglich der Induktion von  $\gamma$ H2AX in primären Lymphozyten wider.

Die in diesen Versuchen ermittelten Ergebnisse decken sich mit den bisher anhand von Trainingsdatensätzen generierten Resultaten in Bezug auf die unterschiedliche Sensitivität der beiden Classifier 3-1-5 und 5-1-10 (Kapitel 5.1.2 und 5.1.3). Da mit den Schwellenwerten 3-1-5 bei allen Bestrahlungsdosen mehr Foci detektiert werden konnten als mit dem Classifier 5-1-10 und auch der auf diese Weise ermittelte Grundscha den der Lymphozyten nicht den Nachweis einer eindeutigen Foci-Induktion nach Bestrahlung behinderte, wurde dieser Classifier für alle weiteren Versuche verwendet.



**Abbildung 5.7 Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci durch Metafer4 mit den Classifiern 3-1-5 und 5-1-10 in verschiedenen Dosisbereichen**

Mittlere Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Foci pro Lymphozyten-Zellkern nach  $^{137}\text{Cs}$ -Bestrahlung und 30 minütiger Inkubation unter Verwendung eines 63x Objektivs. Jedes Diagramm repräsentiert einen unabhängigen Versuch und jeder Balken stellt den Mittelwert aus der Analyse von 3 Objektträgern  $\pm$  SEM dar. Pro Objektträger wurden 300 Zellen ausgewertet. **A:** Dosisbereich von 0,5 bis 5 Gy. **B:** Dosisbereich von 0,1 bis 1 Gy.



### **5.1.5 Ermittlung von Nachweisgrenzen des für die Quantifizierung von $\gamma$ H2AX optimierten Bildanalyzesystems Metafer**

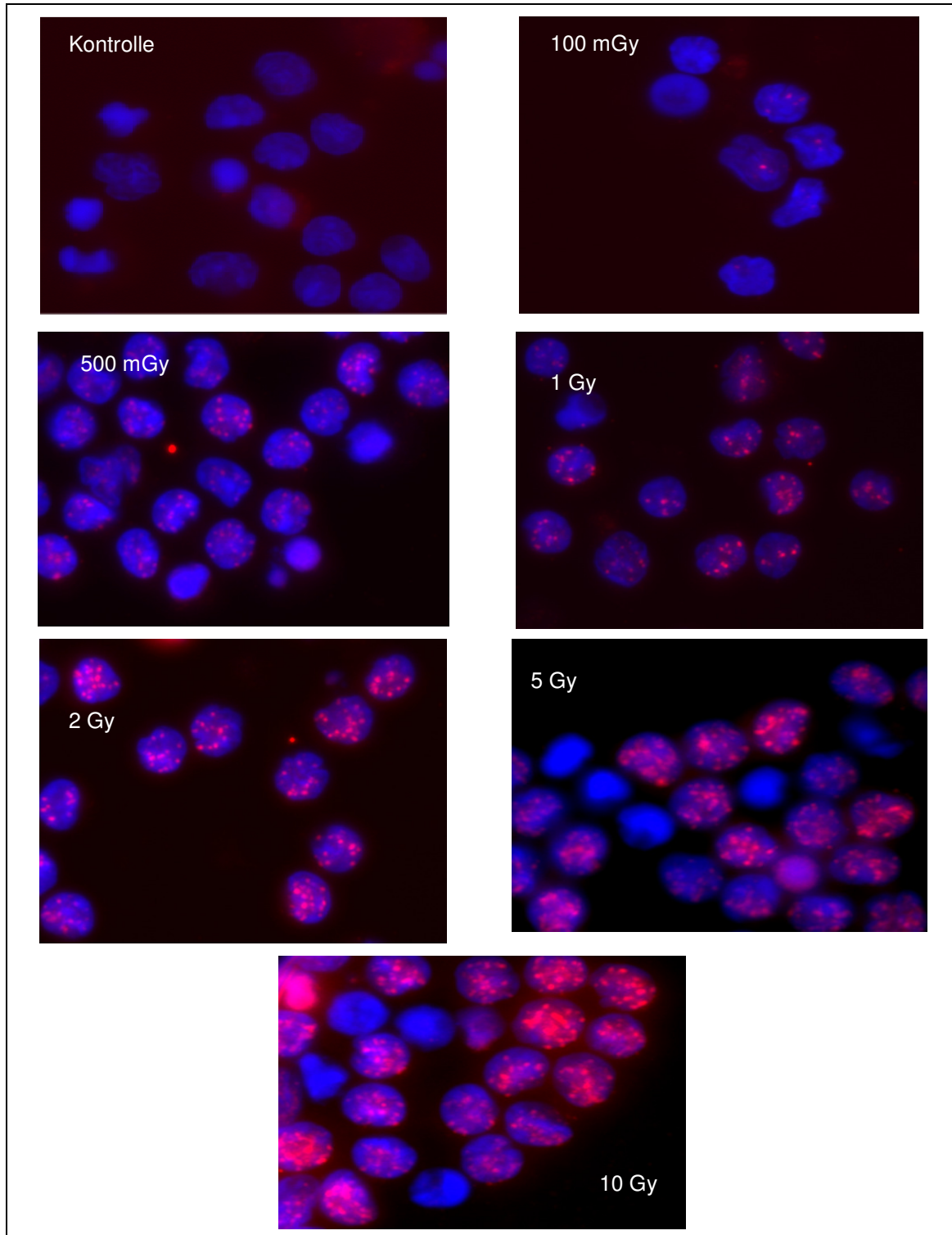
Auf der Grundlage der bisher erarbeiteten Ergebnisse wurden die Verwendung eines 63x Objektivs und die Messeinstellung 3-1-5 als optimal für die Detektion von  $\gamma$ H2AX in primären Lymphozyten angesehen. In weiteren Versuchen sollte nun untersucht werden, ob anhand der unter optimierten Messbedingungen erzielten Ergebnisse Dosis-Wirkungs-Kurven in verschiedenen Dosisbereichen erstellt werden können.

#### **5.1.5.1 Nachweis von $\gamma$ H2AX im Dosisbereich von 0,1 bis 10 Gy**

Für die Dosis-Wirkungs-Kurve mit Strahlendosen von 0,1 bis 10 Gy wurden pro Datenpunkt 2-5 unabhängige Versuche an mit  $^{137}\text{Cs}$  bestrahlten primären Lymphozyten ausgewertet. Der Transport der Proben sowie die Bestrahlung erfolgten auf Eis. Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der  $\gamma$ H2AX-Foci ist in der Abb. 5.8 exemplarisch dargestellt.

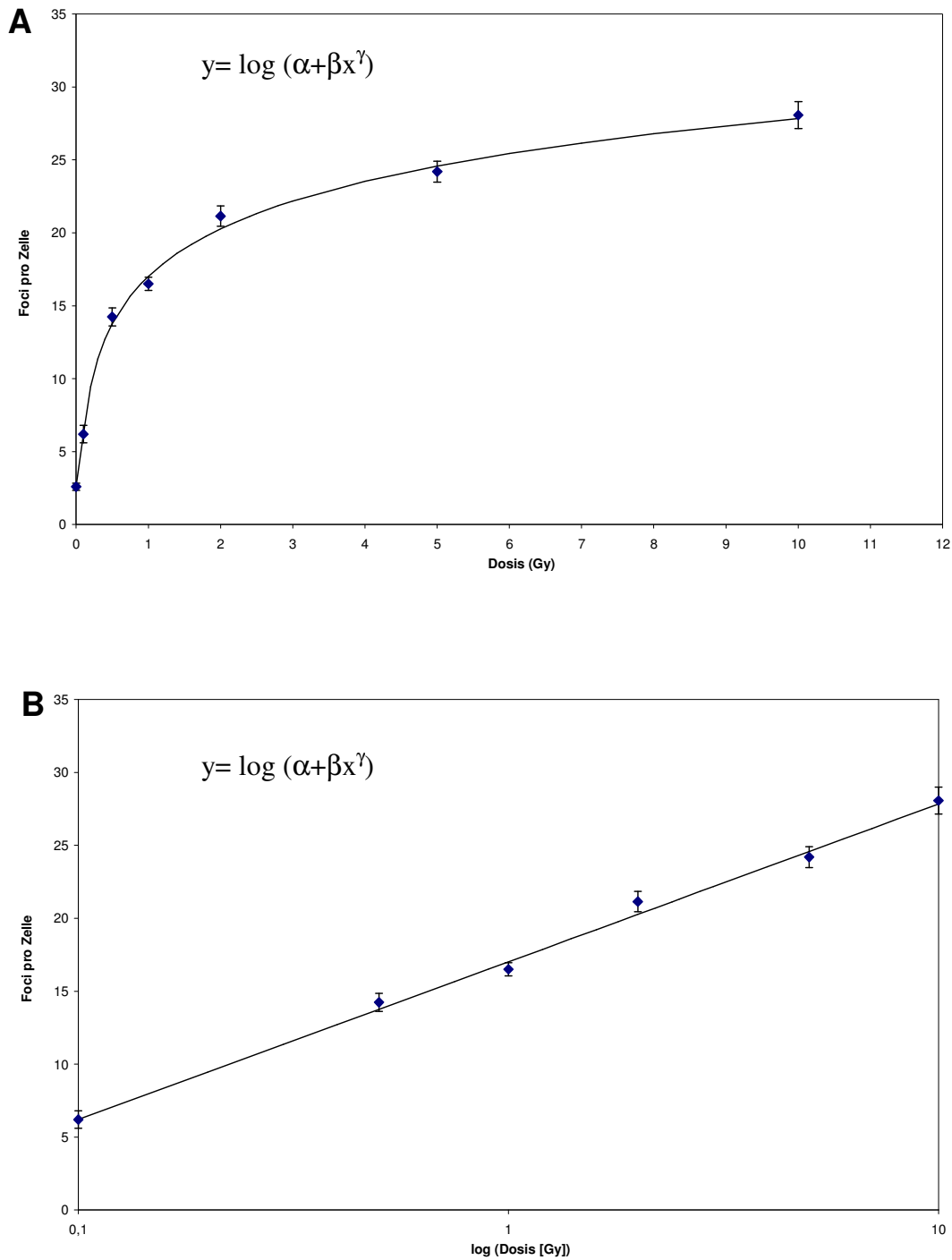
Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich, wie in Abbildung 5.9 A gezeigt, in Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve darstellen. Dabei lässt sich die dosisabhängige Foci-Induktion mit der Funktion  $y = \log(\alpha + \beta x^\gamma)$  (Fit-Funktion) beschreiben. In dieser Gleichung entspricht  $y$  der Anzahl der Foci und  $x$  der Strahlendosis der  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle.  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  sind Parameter dieser Fit-Funktion und werden in der Tabelle 5.4 zusammengefasst. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ), welches die Güte der ermittelten Anpassungskurve angibt, beträgt 0,95, wobei ein Wert von 1 dem Optimum entspricht. Durch halblogarithmische Auftragung der Dosis ergibt sich eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung (s. Abb. 5.9 B).

Aus der Grafik wird ersichtlich, dass der Anstieg der durchschnittlichen Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci anfänglich linear verläuft und bei höheren Bestrahlungsdosen in ein Plateau übergeht. Analog zu den in Abb. 5.7 A dargestellten Ergebnissen ist auch in der Abbildung 5.9 A zu erkennen, dass nach Überschreitung einer maximalen Dosis von 1 Gy die Induktion von  $\gamma$ H2AX nicht proportional zur applizierten Strahlendosis verläuft.



**Abbildung 5.8** Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von  $\gamma$ H2AX-Foci in primären humanen Lymphozyten nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen mit  $^{137}\text{Cs}$  und 30 min Inkubationszeit

Zu erkennen sind der geringe Grundschaden in unbestrahlten Kontrollzellen sowie die dosisabhängige Induktion von  $\gamma$ H2AX nach  $^{137}\text{Cs}$ -Bestrahlung mit 100 mGy, 500 mGy, 1 Gy, 2 Gy, 5 Gy und 10 Gy. Bei Strahlendosen  $>1$  Gy ist die Überlappung der einzelnen Fluoreszenzsignale in den Zellkernen zu erkennen. Blau: Kernfärbung mit Hoechst-Farbstoff 33342. Pink:  $\gamma$ H2AX-Foci. Die Bilder wurden mit einem 63x Objektiv aufgenommen.



**Abbildung 5.9 Dosis-Wirkungs-Kurve für primäre Lymphozyten 30 min nach Bestrahlung mit  $^{137}\text{Cs}$**

Anzahl der  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci nach  $\gamma$ -Bestrahlung in primären Lymphozyten in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 2-5 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM dar. In jedem Experiment wurden pro Dosis 1-3 Parallel-Proben angefertigt und pro Objektträger ca. 300 Zellen ausgewertet. **A:** Dosis-Wirkungs-Kurve im Bereich von 0 bis 10 Gy. Sie lässt sich mit der Fit-Funktion  $y = \log(\alpha + \beta x^\gamma)$  beschreiben ( $R^2 = 0,999$ ). **B:** Durch halblogarithmische Auftragung (Anzahl der Foci gegenüber  $\log[\text{Dosis}]$ ) ergibt sich aus der gleichen Funktion eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung.

ERGEBNISSE

Tabelle 5.4 Fit-Funktion und enthaltene Fit-Parameter sowie das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) der Anpassungskurve aus der Abb. 5.9

Strahlenquelle	Fit-Funktion	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$R^2$
$^{137}\text{Cs}$	$y = \log(\alpha + \beta x^\gamma)$	13,31 $\pm 13,28$	$2,45 \times 10^7$ $\pm 6,28 \times 10^6$	4,70 $\pm 0,19$	0,95

Tabelle 5.5 Anzahl der Foci/ZK in primären Lymphozyten 30 min nach Bestrahlung mit  $^{137}\text{Cs}$ , dargestellt in Abb. 5.9

Dosis (Gy)	0	0,1	0,5	1	2	5	10
Anzahl der Foci/ZK (Mittelwert $\pm$ SEM)	2,6 $\pm 0,2$	6,2 $\pm 0,6$	14,2 $\pm 0,6$	16,5 $\pm 0,4$	21,2 $\pm 0,7$	24,2 $\pm 0,7$	28,1 $\pm 0,9$

Tabelle 5.6 Fit-Funktion und enthaltene Fit-Parameter sowie das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) der Anpassungskurve aus der Abb. 5.10

Strahlenquelle	Fit-Funktion	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$R^2$
Röntgenstrahlung	$y = (\alpha + \beta \cdot x)e^{\gamma x}$	5,37 $\pm 0,27$	- 0,53 $\pm 0,04$	25,56 $\pm 1,93$	0,95

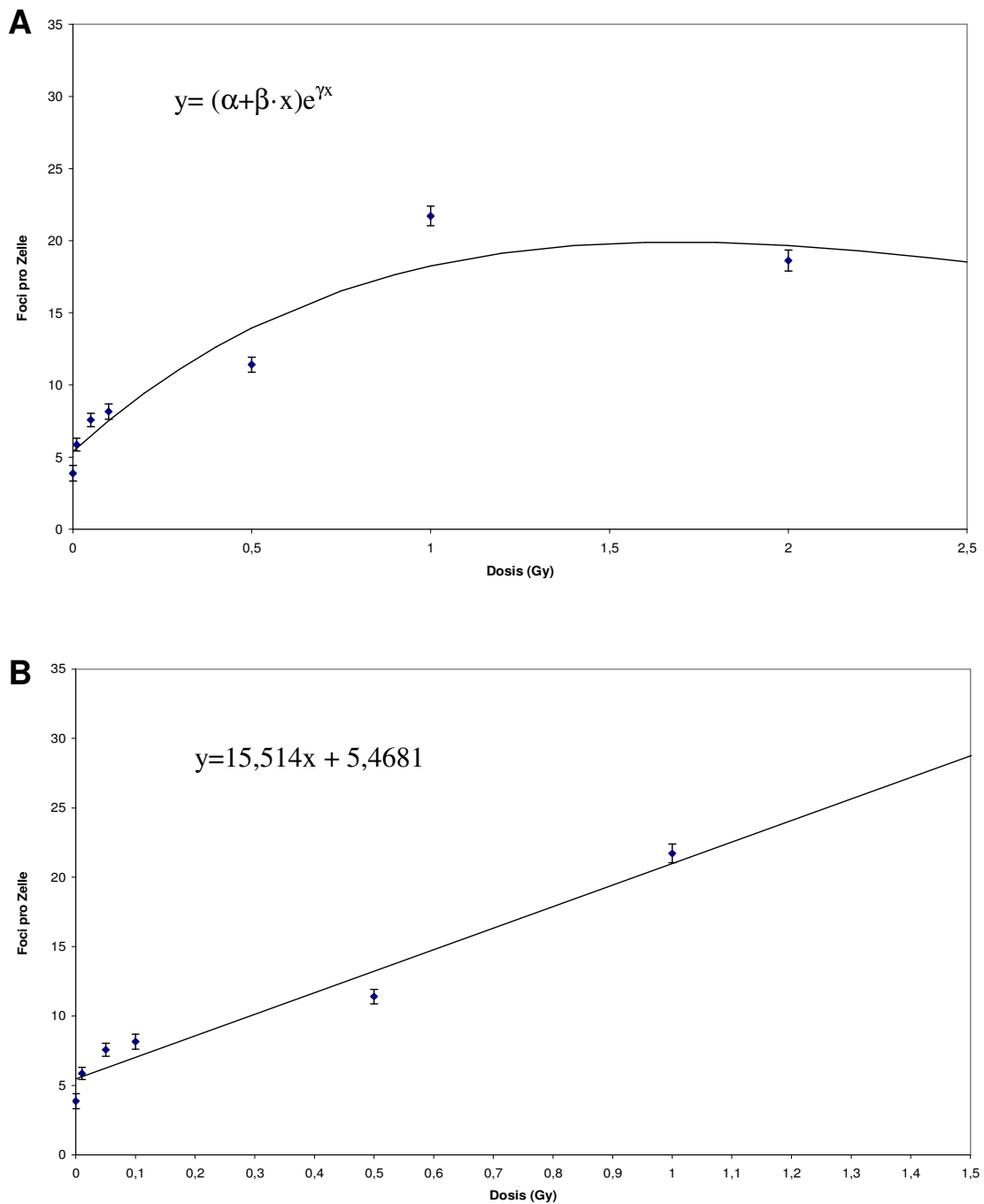
Tabelle 5.7 Anzahl der Foci/ZK in primären Lymphozyten 30 min nach Bestrahlung mit einer Röntgenquelle, dargestellt in Abb. 5.10

Dosis (Gy)	0	0,01	0,05	0,1	0,5	1	2
Anzahl der Foci/ZK (Mittelwert $\pm$ SEM)	3,9 $\pm 0,5$	5,9 $\pm 0,4$	7,6 $\pm 0,5$	8,2 $\pm 0,5$	11,4 $\pm 0,5$	21,7 $\pm 0,7$	18,6 $\pm 0,7$

### 5.1.5.2 Nachweis von $\gamma$ H2AX im Dosisbereich von 0,01 bis 2 Gy

Um die Sensitivität des  $\gamma$ H2AX-Assays im Niedrigdosisbereich bei einer automatischen Auswertung an Metafer4 zu untersuchen, wurden primäre Lymphozyten in weiteren Versuchen mit Dosen bis minimal 10 mGy bestrahlt und anschließend mit der Bildanalysesoftware ausgewertet. Für diese Versuche musste auf eine andere Strahlenquelle zurückgegriffen werden, da an der  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle aus technischen Gründen eine minimale Dosis von 100 mGy nicht unterschritten werden kann. Zur Erzeugung von Photonenstrahlung im Niedrigdosisbereich wurde daher eine Röntgenröhre des Bundesamtes für Strahlenschutz eingesetzt, mit der die applizierte Dosis bis auf 10 mGy reduziert werden konnte. Da das an der Röntgenquelle verwendete Dosimeter für eine Anwendung bei Raumtemperatur geeicht ist, wurden die Zellen hier, im Gegensatz zur  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle, nicht auf Eis, sondern bei Raumtemperatur bestrahlt. Einzelheiten der Röntgenbestrahlung sind dem Kapitel 4.2.3.2 zu entnehmen.

Wie aus der Abbildung 5.10 A ersichtlich ist, lassen sich auch die in einem Dosisbereich von 10 mGy bis 2 Gy mit der Software Metafer4 in primären Lymphozyten ermittelten Ergebnisse in Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve darstellen. Diese lässt sich durch die Fit-Funktion  $y = (\alpha + \beta x)e^{\gamma x}$  beschreiben. Dabei ist  $y =$  Anzahl der Foci und  $x =$  Dosis der applizierten Röntgenstrahlung. Die Werte der Fit-Parameter  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  werden in der Tabelle 5.6 zusammengefasst. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) dieser Fit-Funktion beträgt 0,95; wobei 1 das Optimum ist. In dieser Grafik ist zu erkennen, dass die Zunahme der Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Signale bis zu einer applizierten Dosis von 1 Gy linear verläuft. Bis zu diesem Punkt lassen sich die ermittelten Ergebnisse in Form einer Geraden (Abb. 5.10 B) darstellen, die sich mit der Fit-Funktion  $y = 15,514x + 5,4681$  beschreiben lässt. Bei Bestrahlungsdosen  $>1\text{Gy}$  ist, wie auch in der Abb. 5.9 nach  $^{137}\text{Cs}$ -Bestrahlung erkennbar, durch Dosiserhöhung kein entsprechender Anstieg in der Anzahl der detektierten  $\gamma$ H2AX-Foci nachweisbar, d.h. die Kurve geht in eine Sättigung über. Hier liegt der für 2 Gy ermittelte Wert (18,6 Foci/ZK) unter der für 1 Gy Röntgenstrahlung detektierten Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci (21,7).



**Abbildung 5.10 Dosis-Wirkungs-Kurve für primäre Lymphozyten 30 min nach Bestrahlung mit einer Röntgenquelle**

Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci nach Röntgenbestrahlung in primären Lymphozyten in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM dar. In jedem Experiment wurden pro Dosis 1-4 Parallel-Proben und pro Objektträger ca. 300 Zellen ausgewertet. **A:** Dosis-Wirkungs-Kurve im Bereich von 0 bis 2 Gy. Sie lässt sich durch die Fit-Funktion  $y = (\alpha + \beta x) e^{\gamma x}$  mit einem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0,95 beschreiben. **B:** Im Dosisbereich von 0 bis 1 Gy Röntgenstrahlung ergibt sich eine Gerade mit der Fit-Funktion  $y = 15,514x + 5,4681$  und einem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0,95.

## **5.2 Nachweis kleiner strahleninduzierter DNA-Schäden mittels der $\gamma$ H2AX-Analyse in Lymphozyten von different strahlenempfindlichen Strahlentherapiepatienten**

Nachdem der  $\gamma$ H2AX-Assay und seine vollautomatische Auswertung mit der Bildanalysesoftware Metafer4 an humanen Lymphozyten etabliert werden konnte und Nachweisgrenzen der Methode ermittelt wurden, sollte der Assay anhand eines praktischen Anwendungsbeispiels weiter auf seine Eignung zum Nachweis geringer strahleninduzierter DNA-Schäden untersucht werden. Dabei war von besonderem Interesse, inwiefern die  $\gamma$ H2AX-Analyse dazu geeignet ist, zwei Gruppen zu trennen, die sich nur hinsichtlich kleiner strahleninduzierter Effekte voneinander unterscheiden. Das Probenmaterial der Strahlentherapiepatienten aus dem Forschungsvorhaben StSch 4467 (s. Kapitel 4.2.8) erschien dafür ideal, da zu erwarten war, dass die Unterschiede in Bezug auf die strahleninduzierten DNA-Schäden zwischen den klinisch strahlenempfindlichen bzw. klinisch nicht strahlenempfindlichen Individuen - falls vorhanden – nur klein ausfallen würden.

Das Probenmaterial der Strahlentherapiepatienten wurde - wie in Kapitel 4.2.8 beschrieben - aufbereitet, nach der Bestrahlung mit 5 Gy 24 Stunden inkubiert und  $\gamma$ H2AX immunzytochemisch mit Metafer4 unter Verwendung des hier optimalen Classifiers quantifiziert. Die durchschnittliche Anzahl der nach 24stündiger Inkubation detektierten  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zellkern wird in Tab. 5.8 angegeben, wobei die als klinisch strahlensensitiv klassifizierten Patienten mit einem x gekennzeichnet sind.

**Tabelle 5.8 Mittlere Anzahl der mit Metafer4 detektierten  $\gamma$ H2AX-Foci in primären Lymphozyten eines Probenkollektivs nach 5 Gy Bestrahlung ( $^{137}\text{Cs}$ ) und 24stündiger Inkubation**

Die klinisch als strahlensensitiv charakterisierten Probanden sind mit einem x gekennzeichnet. Bei den als humane Kontrolle bezeichneten Zellen handelt es sich um primäre Lymphozyten eines gesunden männlichen Spenders mittleren Alters. Die Probe 1a fehlt.

Objektträger	Foci/ZK (Mittelwert)	klinisch strahlensensitiv
humane Kontrolle	0,19	
1 b	0,12	×
2 a	0,02	
2 b	0,36	×
3 a	0,04	×
3 b	0,03	
5 a	0,01	
5 b	0,49	×
6 a	0,01	×
6 b	0,17	
7 a	0,14	×
7 b	0,30	
8 a	0,32	×
8 b	0,05	
9 a	0,31	
9 b	0,01	×
10 a	0,01	×
10 b	0,02	
13 a	0,08	
13 b	0,61	×

Um zu ermitteln, ob der Restschaden (= Foci pro Zellkern nach 5 Gy Bestrahlung und 24stündiger Inkubation) als Kriterium für die Zuordnung einer Probe zur Kategorie „klinisch strahlenempfindlich“ bzw. „klinisch nicht strahlenempfindlich“ herangezogen werden kann, wurde an den aus dieser Messung erhaltenen Ergebnissen mit dem Wilcoxon Rangsummentest ein Vergleich zwischen den beiden Gruppen durchgeführt.



Strahlenempfindliche zeigen dabei nach 24 h mit durchschnittlich 0,21 Foci/ZK eine geringere Reparaturfähigkeit als Strahlenunempfindliche mit durchschnittlich 0,11 Foci/ZK (Tab.5.9, Abb. 5.11). Die sehr kleinen Gruppen „Strahlenempfindliche“ (n=10) und „Strahlenunempfindliche“ (n=9) können jedoch anhand des Restschadens nicht statistisch abgesichert unterschieden werden (p= 0,511).

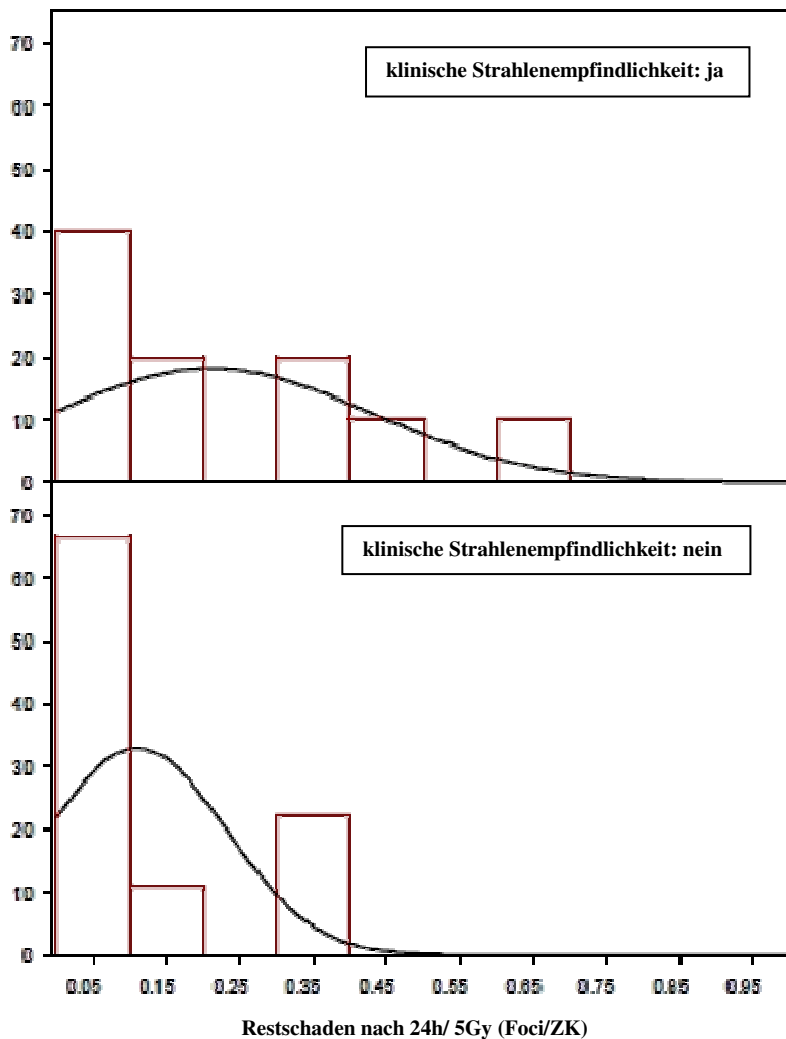
**Tabelle 5.9 Wilcoxon Rangsummentest (2-seitig)**

Bei Vorliegen einer klinischen Strahlenempfindlichkeit (n=10) lässt sich ein durchschnittlicher Restschaden von 0,21 Foci/ZK ermitteln. Bei den klinisch nicht-strahlenempfindlichen Patienten (n=9) beträgt der errechnete Restschaden im Mittel 0,11 Foci/ZK. Statistisch lassen sich die beiden Gruppen jedoch nicht voneinander unterscheiden (p= 0,511).

<i>klinische Strahlenempfindlichkeit</i>	<i>n</i>	<i>Restschaden nach 24 h/5Gy</i>		<i>emp. Spannweite (Minimum – Maximum)</i>
ja	10	0.21	( 0,05 - 0,37 )	0,01-0,61
nein	9	0.11	( 0,02 - 0,20 )	0,01-0,31

Zumindest die Tendenz einer Reparaturdefizienz im Probenmaterial klinisch strahlenempfindlicher Probanden lässt sich trotz mangelnder Signifikanz bei grafischer Darstellung der in Tab. 5.8 zusammengefassten Ergebnisse aus der Abb. 5.11 ablesen. In primären Lymphozyten strahlenempfindlicher Patienten (obere Grafik) ist der Prozentanteil der Zellen, die nach 24stündiger Inkubation nur noch sehr wenige  $\gamma$ H2AX-Foci aufweisen, deutlich geringer (40%) als bei der Gruppe der Strahlenunempfindlichen (65%). Die Verschiebung des prozentualen Anteils der Zellen strahlensensitiver Patienten in Bereiche höheren Restschadens zeigt sich auch im Kurvenverlauf der Grafik.

Anzahl der Zellen (%)



**Abbildung 5.11 Restschaden 24 h nach Bestrahlung mit 5 Gy ( $^{137}\text{Cs}$ ) in Lymphozyten von Strahlentherapiepatienten**

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen in %, die einer bestimmten Restschadens-Klasse (Foci/ZK nach 5 Gy Bestrahlung und 24stündiger Inkubation) angehören und ihre Zuordnung in die Gruppe der klinisch Strahlenempfindlichen bzw. klinisch nicht Strahlenempfindlichen. Der Kurvenverlauf spiegelt dabei die Reparaturkapazität der Zellen wider.

Zur Ermittlung eines optimalen Wertes für den Restschaden, der Strahlenempfindliche und Strahlenunempfindliche am besten trennt („*cut-off point*“ oder Split-Grenze), wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Als optimal wird dabei ein Wert angesehen, für den Sensitivität (Anteil der richtig als strahlensensitiv erkannten Probanden an der Gesamtheit der strahlensensitiven Probanden) und Spezifität (Anteil der richtig als nicht

strahlensensitiv erkannten Probanden an der Gesamtheit der nicht-strahlensensitiven Probanden) möglichst hoch liegen. In einem speziellen Diagramm, der sog. ROC-Kurve (Abb. 5.12), wurde dabei die Sensitivität gegen 1-Spezifität für sämtliche Trennwerte aufgetragen. Als Kriterium für den besten *cut-off point* wurde der maximale Youden Index gewählt. Dieser berechnet sich aus der Sensitivität + Spezifität – 1 und beträgt hier 0,4. In der Grafik lässt sich an diesem Punkt ein *cut-off point* von 0,32 Foci/Zellkern ablesen. Da keiner der Strahlenunempfindlichen einen höheren Restschaden als 0,32 Foci/Zellkern aufweist, liegt die Spezifität dieses Grenzwertes bei 100%. Die Sensitivität liegt bei dieser Klassifizierung bei 40% für Strahlenempfindlichkeit (s. Tab. 5.11).

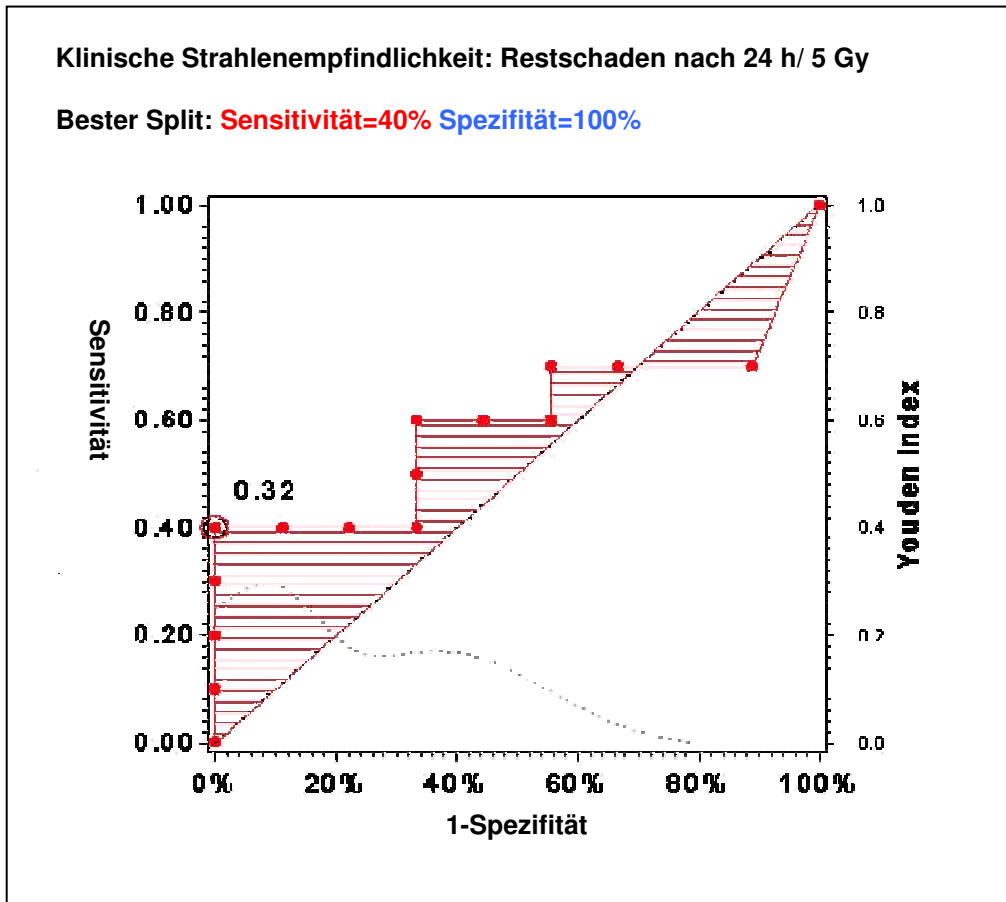
**Tabelle 5.10 Zusammenfassung der ROC des Restschadens hinsichtlich klinischer Strahlenempfindlichkeit**

Durch Ermittlung der optimalen Split-Grenze von 0,32 Foci/ZK ergeben sich für den Test eine Sensitivität von 40% und eine Spezifität von 100%. Für die „area under the curve“ wurde ein Wert von 0,60 errechnet.

Split-Grenze**	Sensitivität *	Spezifität	ROC***	p-Wert	
				kontinuierlich	Bester split
0.32	40% ( 12% - 74%)	100% ( 66% - 100%)	low discrimination ROC=0.60	0.2366	0.0867

- \* 95%-CI (nach PearsonClopper)
- \*\* max. Youden Index=0.4
- \*\*\* Klassifikation nach Hosmer und Lemeshow 2000

Durch das Einfügen einer Winkelhalbierenden in die ROC-Kurve kann die sog. „area under the curve“ (AUC) bestimmt werden. Ein Test trennt zwei Gruppen insgesamt umso besser, je größer die Fläche unter der ROC-Kurve ist. Diese ist maximal 1 bei einer 100%igen Sensitivität und Spezifität. Sie ist 0,5 wenn eine Trennung nicht möglich ist (Sachs und Hedderich, 2006). Wie in der Tab. 5.10 zusammengefasst, beträgt bei einem *cut-off point* von 0,32 Foci/Zellkern die Fläche der AUC (Abb. 5.12) 0,60. Bei einer Klassifikation nach Hosmer und Lemeshow (2000) (s. Kapitel 4.2.9) ergibt sich für den Wert 0,6 eine akzeptable Güte der Diskrimination.



**Abbildung 5.12 ROC des Restschadens in Lymphozyten von Strahlentherapiepatienten**

Dargestellt sind die möglichen Trennwerte sowie die zugehörigen Sensitivitäten und Spezifitäten. Anhand des berechneten maximalen Youden Index von 0,4 kann aus der Grafik der beste *cut- off point* abgelesen werden (0,32 Foci/ZK). Bei diesem Trennwert liegt die Sensitivität bei 40% und die Spezifität bei 100%.

**Tabelle 5.11 Sensitivität und Spezifität bei einem Trennwert von 0,32 Foci pro Zellkern**

Keiner der Strahlenunempfindlichen weist einen höheren Restschaden als 0,32 Foci/ZK auf. Daher ist die Spezifität 100%. Die Sensitivität liegt bei dieser Klassifikation bei 40%.

klinische Strahlenempfindlichkeit	Restschaden nach 24 h/5Gy		Summe
	< 0.32	>= 0.32	
ja	6 60%	4 40%	10
nein	9 100%	0 --	9
<b>Summe</b>	15	4	19

## 6 Diskussion

### 6.1 Quantifizierung von DNA-Schäden anhand von $\gamma$ H2AX-Foci

Verschiedene chemische und physikalische Umweltfaktoren verursachen an der DNA Schäden. Besonders drastische Auswirkungen auf die Erbsubstanz haben dabei DNA-Doppelstrangbrüche, die bis zum Zelltod führen können oder - bei fehlerhafter Reparatur - Mutationen, chromosomale Umgestaltungen und onkogene Transformationen zur Folge haben (Obe et al., 2002). Als „Goldstandard“ der biologischen Dosimetrie für den spezifischen und hoch sensitiven Nachweis von Doppelstrangbruch induzierenden Agenzien, wie z.B. ionisierender Strahlung, gilt derzeit der Nachweis von Dizen-trischen Chromosomen (Stephan et al., 2007). Bei dieser Methode handelt es sich um eine Chromosomenanalyse, mit der Strahlenexpositionen erfasst werden können. Dabei werden Lymphozyten nach spezieller Färbung auf das Vorhandensein Dizen-trischer Chromosome untersucht, welche an den zwei Zentromeren zu erkennen sind. Diese Methode ist aber sehr zeitaufwändig und erfordert ein hohes Maß an Routine. Ihre Nachweisgrenze liegt bei 100 mGy (Romm et al., 2005). Auf der Suche nach alternativen Verfahren, die eine raschere Schadenseinschätzung ermöglichen, werden Methoden diskutiert, die den Nachweis von Strangbrüchen an der DNA zum Ziel haben. Neben dem Comet Assay, der vorwiegend zur Detektion von Einzelstrangbrüchen der DNA genutzt wird, scheint der  $\gamma$ H2AX-Assay für die biologische Dosimetrie viel versprechend. Da die Zahl der  $\gamma$ H2AX-Foci mit der Menge induzierter DNA-Doppelstrangbrüche korreliert (Rogakou et al., 1999; Sedelnikova et al., 2002; Rothkamm und Löbrich, 2003), ist es mit dieser Methode möglich, die Anzahl der DNA-DSBs in Zellen durch das Auszählen der  $\gamma$ H2AX-Foci zu quantifizieren. Dabei erreicht die zugrunde liegende Phosphorylierung des Histons nach etwa 30 Minuten maximale Werte (Rogakou et al., 1999), weshalb hier - mit Ausnahme der Reparaturkinetiken in Kapitel 5.2 -  $\gamma$ H2AX in allen Versuchen nach 30minütiger Inkubationszeit bestimmt wurde.

Eine zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war, welche Sensitivitätsgrenzen mit dem Assay bei möglichst voll automatisierten Bedingungen erreicht werden können. Dies ist vor allem dann wichtig, wenn nur sehr geringe Schadensmengen zu erwarten sind. Alle derzeit zum Nachweis von DNA-Schäden eingesetzten Methoden (z.B. Dizentrische Chromosomen, Translokationen oder Mikrokerne) erreichen Nachweisgrenzen, die (bei ionisierender Strahlung als Noxe) im Bereich von 0,3 bis 0,1 Sv liegen (Gomolka, 2008). Im Vergleich dazu zeichnet sich der Nachweis der phosphorylierten Form des Histons H2AX durch eine deutlich erhöhte Sensitivität aus. Die Nachweisgrenze von strahlungsinduzierten DNA-Schäden soll bei dieser Methode im Bereich von 1 mSv liegen (Rothkamm und Löbrich, 2003).

Neben der Sensitivität war es wichtig zu ermitteln, wie hoch die methodische Variation des Tests ist und inwiefern sich der Assay zur objektiven automatischen Auswertung im Routinebetrieb mit hohem Probendurchsatz eignet. Diese Themenfelder sollten mit vorliegender Arbeit experimentell dargestellt und diskutiert werden.

## **6.2 Diskussion der methodischen Optimierungen anhand der Testung von bestrahlten Lymphozyten**

### **6.2.1 Optimierung der Inkubationsbedingungen**

In Vorversuchen dieser Arbeit zur Etablierung des  $\gamma$ H2AX-Assays am BfS wurde die Dauer der Inkubation des gegen die phosphorylierte Form von H2AX gerichteten Antikörpers zwischen 2 und 24 Stunden variiert. Dabei war ein deutlicher Einfluss der Inkubationszeit des Primärantikörpers auf die Anzahl und Intensität der im Fluoreszenzmikroskop detektierbaren  $\gamma$ H2AX-Foci erkennbar (s. Abb. 5.1). In der Literatur variieren die Zeitangaben zur Inkubation des Probenmaterials mit dem primären Antikörper laborabhängig. Sowohl 1 bis 2stündige (Rogakou et al., 1999; Rothkamm und Löbrich, 2003; Kühne et al., 2004; Böcker und Iliakis, 2006) als auch 24stündige Inkubationszeiten (Costes et al., 2006) werden beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine deutliche Verbesserung der  $\gamma$ H2AX-

Fluoreszenzsignale um den Faktor 1,5-2 bezüglich ihrer Anzahl und Intensität nach 24stündiger Inkubation des Primärantimkörpers erzielt werden kann (s. Kap. 5.1.1.1). Mit diesem Schritt wurde eine reproduzierbare Qualitätsverbesserung der fluoreszenzmikroskopisch darstellbaren Foci erreicht, die auch einer automatischen Auswertung nicht entgegensteht.

### **6.2.2 Optimierung der Fixierung der Testzellen auf Objektträgern**

Ein weiterer wichtiger Optimierungsschritt für eine Automatisierung der Probenanalyse bestand darin, eine geeignete Methode zur Fixierung von suspendierten Testzellen auf Objektträgern zu finden. Primäre Lymphozyten können beim Nachweis von DNA-Schäden über den Comet Assay in Agarose eingebettet und die Objektträger vollautomatisch mit Metafer4 analysiert werden (Rössler et al., 2006). Diese Art der Zellfixierung ist für die Auswertung des  $\gamma$ H2AX-Assays aus zwei Gründen nicht zweckmäßig: Zum einen wird der zeitliche Aufwand für die mikroskopische Probenanalyse bei Anwendung dieser Methode erhöht und zum anderen wird die automatische Fokussierung der Zellkerne in der Agaroseschicht erschwert. Zu erklären ist die verlängerte Messdauer bei Agarose-Einbettung damit, dass die Zellen bei Beschichtung der Objektträger über die gesamte Fläche verteilt werden. Die Folge ist eine zu geringe Zelldichte für eine automatische Auswertung des  $\gamma$ H2AX-Assays. Als Konsequenz daraus resultiert ein hoher Zeitaufwand beim Scannen der Zellen bzw. ein höherer Zellmaterialeinsatz, der gerade bei limitiertem Probenmaterial zum Problem werden kann. Eine weitere Schwierigkeit bei in Agarose eingebetteten Suspensionszellen besteht in der Vielschichtigkeit des Präparates. Da die Zellen in unterschiedlichen Ebenen auf dem Objektträger liegen, können die Kerne nur unscharf automatisch fokussiert werden. Somit ist eine eindeutige Erkennung und Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci durch Metafer4 nicht möglich.

Eine andere Methode der Fixierung von Suspensionszellen auf Objektträgern ist das Auftropfen von Zellen auf unbeschichtete (Kühne et al., 2004; Löbrich et al., 2005; Rothkamm et al., 2007) oder auf gelatinebeschichtete Objektträger (Stiff et al., 2004).

Diese Vorgehensweise ist zeitsparend und erzielt auf einer kleinen Fläche des Objektträgers eine hohe Zelldichte. Ein Problem für die automatische Probenanalyse stellt aber die häufige Überlagerung der einzelnen Zellkerne und die nicht standardisierbare Lage der Zellen auf dem Objektträger dar. Diese ist jedoch für eine effektive vollautomatische Probenanalyse wichtig, da die Software auf diese Weise nicht den gesamten Objektträger nach Zellen absuchen muss, sondern gezielt an einem definierten und standardisierten Bereich mit der Detektion der Zellkerne beginnen kann.

Suspensionszellen können auch mit Hilfe einer Zytozentrifuge als Einschichtpräparat auf Objektträger zentrifugiert werden (Kato et al., 2006; Kozlov et al., 2006; Scherthan et al., 2008). Durch den speziellen Aufbau der Zytospin-Apparatur, bei dem der Auslass des Plastikaufsatzes kongruent mit dem Loch des Filterpapiers ist, wird die Restflüssigkeit absorbiert und die Zellen immer auf den gleichen Objektträgerbereich zentrifugiert (s. Abb. 4.1). Diese Methode bietet demnach den Vorteil, dass Zellen in hoher Dichte in einer Ebene auf einen definierten Bereich des Objektträgers zentrifugiert werden können. Für die Automatisierung der Auswertung bedeutet das, dass nur ein kleiner, vom Untersucher vordefinierter Bereich von Metafer4 nach Zellkernen abgesucht werden muss, der bei allen Proben identisch ist. Auf diese Weise kann die Messdauer pro Objektträger deutlich reduziert werden.

### **6.3 Optimierung der vollautomatischen Quantifizierung von $\gamma$ H2AX-Foci mit dem Bildanalyse-System Metafer**

#### **6.3.1 Vorteile eines höher auflösenden Objektivs**

Bei der vollautomatischen Auswertung von Probenmaterial mit dem Bildanalyse-System Metafer kann das verwendete Epifluoreszenzmikroskop mit unterschiedlich hoch auflösenden Objektiven betrieben werden. Da die Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci auf der exakten rechnerischen Identifizierung der Fluoreszenzsignale in Form von Pixeln basiert, wurde geprüft, ob mit einem höher auflösenden Objektiv mehr Foci detektiert werden können als mit einem Objektiv geringerer Auflösung. Wie in Kapitel 5.1.3



beschrieben, wurden dazu Versuche unter Verwendung eines 40x und 63x Objektivs mit den Messeinstellungen 3-1-5 und 5-1-10 ausgewertet und miteinander verglichen. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit dem höher auflösenden Objektiv und den Schwellenwerten 3-1-5 erzielt, die in Metafer4 als Classifier bezeichnet werden und einen  $\gamma$ H2AX-Focus rechnerisch definieren.

In anderen Studien, in denen  $\gamma$ H2AX-Foci manuell oder unter Verwendung von Bildanalysesoftware quantifiziert wurden, fanden sowohl an Laser-Scanning- als auch Epifluoreszenzmikroskopen unterschiedliche Objektive Anwendung (s. Tab. 6.1). Dabei reichen die Auflösungen von 40x (Costes et al., 2007) bis zu 400x (Wykes et al., 2006). Die Bildauflösung der Aufnahmen von Zellen, an denen  $\gamma$ H2AX-Foci manuell oder automatisch quantifiziert werden, ist aber nur einer von mehreren Faktoren, die sich auf die Messergebnisse auswirken, wie im folgenden Kapitel näher erläutert wird.

### **6.3.2 Vergleichende Betrachtung der publizierten Untersuchungen über die manuelle und automatische Quantifizierung von $\gamma$ H2AX-Foci**

Die Standardmethode zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen über den Nachweis von  $\gamma$ H2AX-Foci ist die manuelle Auszählung der fluoreszenzmarkierten Foci per Auge. Dabei werden Aufnahmen von Zellkernen entweder an Laser-Scanning- oder Epifluoreszenzmikroskopen angefertigt. Diese Art der Probenanalyse ist sehr arbeitsintensiv und zeitaufwändig, weshalb sie nur einen geringen Probendurchsatz erlaubt. Im Routinebetrieb werden daher maximal 50 Zellen auf diese Weise ausgewertet. Darüber hinaus ist die personenabhängige Auswertung subjektiv und fehleranfällig. DNA-Schäden können auch vollautomatisch durch Bildanalyseysteme wie Metafer ausgewertet werden (Schunck et al., 2004). Am Bundesamt für Strahlenschutz ist dieses vollautomatische System zum Nachweis von DNA-Schäden bereits für die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) gut etabliert (Rössler et al., 2006). Ziel dieser Arbeit war daher, zum Zwecke der Objektivierbarkeit der Probenanalyse und im Hinblick auf eine Erhöhung des Probendurchsatzes, die Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci mittels Metafer4 zu etablieren.

Mit der Bildanalysesoftware konnten unter dem gewählten Classifier (3-1-5) und einem 63x Objektiv bei einer Dosis von 1 Gy ( $^{137}\text{Cs}$ -Strahlung) 16,5 Foci bzw. 21,7 Foci pro Zellkern (Röntgenstrahlung) detektiert werden. Vergleicht man diese Werte mit Publikationen, in denen  $\gamma\text{H2AX}$  manuell in Lymphozyten ausgezählt wurde (Übersicht in Tab. 6.1), stimmen die mit Metafer4 ermittelten Ergebnisse gut mit den Resultaten von Arbeiten überein, die unter ähnlichen Versuchsbedingungen angefertigt wurden (Löbrich et al., 2005; Redon et al., 2008). Die etwas höhere Anzahl (~29) der pro Gy detektierten Foci einer weiteren vergleichbaren Veröffentlichung (Rothkamm et al., 2007) könnte ihre Ursache in der Verwendung eines höher auflösenden Objektivs (100x) haben. Sak et al. (2007) ermittelten mit ca. 10 Foci pro Zellkern nach 1 Gy Bestrahlung einen vergleichsweise niedrigen Wert. Dabei ist jedoch zu beachten, dass in dieser Arbeit von der durchschnittlichen Anzahl der quantifizierten Foci in bestrahlten Zellen der in unbestrahlten Kontrollen bestimmte Grundschaden der Lymphozyten abgezogen wurde. Die von Scherthan et al. (2008) ermittelte Anzahl von ca. 9 Foci pro Gy pro Lymphozyten-Zellkern ist mit dem Ergebnis der zuvor genannten Veröffentlichung vergleichbar. Jedoch wird die Interpretation dieses Wertes wegen fehlender Angaben zu den Bedingungen der Foci-Quantifizierung (verwendetes Mikroskop, Objektivauflösung etc.) erschwert.

Ein generelles Problem beim Vergleich der von verschiedenen Arbeitsgruppen bei manueller Foci-Quantifizierung ermittelten Ergebnisse besteht sowohl in den Variationen der verwendeten mikroskopischen Ausstattung als auch in der Subjektivität der Untersuchungen (Redon et al., 2008; Scherthan et al., 2008). Aus diesem Grund stellt die Objektivierung der Probenanalyse durch Bildanalyseysteme wie Metafer eine aussichtsreiche Alternative zur manuellen und personenabhängigen Auswerteroutine dar.

Betrachtet man den Verlauf der Foci-Induktion mit steigender Strahlendosis, so geht der Kurvenverlauf bei Strahlendosen über einem Gray in eine Sättigungskurve über, d.h. eine Erhöhung der Dosis zeigt keinen weiteren Anstieg der Anzahl der  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci (s. Abb. 5.9 und 5.10). Dieses Phänomen kann mit der Überlappung zweier oder mehrerer Fluoreszenzsignale in der Maximalprojektion erklärt werden, die dann bei der

Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci nicht mehr als getrennt liegende Objekte gezählt werden können. Dies wirkt sich umso deutlicher aus, je mehr Foci pro Zellkern vorliegen (Rogakou et al., 1999; Böcker und Iliakis, 2006). Diese Problematik wird auch bei manueller Foci-Quantifizierung ab einer Dosis von 2 Gy beschrieben (Rogakou et al., 1999). Die Beeinträchtigung der ermittelbaren Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci bei höheren Bestrahlungsdosen wird in verschiedenen Veröffentlichungen kritisch diskutiert (Bouquet et al., 2006; Kataoka et al., 2006; Tanaka et al., 2007). Im Gegensatz zur manuellen Auszählung der  $\gamma$ H2AX-Fluoreszenzsignale kann das Problem der Überlappung von zwei nah nebeneinander liegenden Foci in Bildanalyseprogrammen durch die Anwendung mathematischer Filter, wie z.B. dem „*WaterShed-Algorithmus*“, behoben werden (Böcker und Iliakis, 2006; Costes et al., 2007).

**Tabelle 6.1 Vergleich verschiedener Publikationen über die manuelle bzw. automatische Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci in unterschiedlichen Zellsystemen**

Veröffentlichung	untersuchtes Zellsystem	verwendetes Mikroskop/Objektiv	Methode der Foci-Quantifizierung	Ergebnisse	Sonstiges
Redon et al. 2008	humane Lymphozyten	Laser-Scanning-Mikroskop	manuell	- 0,02 Gy: ~ 0,2 Foci/ZK - 0,1 Gy: 1,4 Foci/ZK - 1 Gy: 12,6 Foci/ZK - 2 Gy: 23,5 Foci/ZK ( <sup>137</sup> Cs-Quelle)	- untersuchter Dosisbereich: 0,02-5 Gy
Scherthan et al. 2008	humane Lymphozyten	keine Angaben	manuell	- 1 Gy: ~9 Foci/ZK (220 kVp, Röntgenstrahlung)	-untersuchter Dosisbereich: 0,5-3 Gy
Rothkamm et al. 2007	humane Lymphozyten	Fluoreszenzmikroskop (100x Objektiv)	manuell	- 1Gy: ~29 Foci/ZK (150 kV Röntgenstrahlung)	
Löbrich et al. 2005	humane Lymphozyten	Fluoreszenzmikroskop (63x Objektiv)	manuell	- 1 Gy: 20 Foci/ZK (90 kV Röntgenstrahlung)	
Sak et al. 2007	humane Lymphozyten	Fluoreszenzmikroskop	manuell	- 0,1 Gy: ~1 Foci/ZK - 1 Gy: ~10 Foci/ZK ( <sup>60</sup> Co-Quelle)	-Grundscha den der Kontrollzellen wurde von Mittelwerten subtrahiert
Wykes et al. 2006	u.a. humane Fibroblasten (EBS7YZ5)	Fluoreszenzmikroskop (400x Objektiv)	Automatisch (selbst entwickeltes Macro)	-1 Gy: 19 Foci/ZK - 2Gy: 30 Foci/ZK (Röntgenstrahlung)	-untersuchter Dosisbereich: 0,1-2 Gy
Böcker und Iliakis 2006	u.a. humane Lungenkarzinomzelllinie (A549)	Laser-Scanning-Mikroskop	automatisch (selbst entwickelte Software)	- 1 Gy: ~30 Foci/ZK - 2 Gy: ~60 Foci/ZK (320 kV Röntgenstrahlung)	-untersuchter Dosisbereich: 0,5-2 Gy -Überlappungskorrektur
Costes et al. 2007	humane Epithelzellen (HMEC-184)	Fluoreszenzmikroskop (40x Objektiv)	automatisch (Software: Matlab, DIPimage)	- 1 Gy: 15,9 Foci/ZK ( <sup>137</sup> Cs-Quelle)	-untersuchter Dosisbereich: 1 Gy -Überlappungskorrektur
Leatherbarrow et al. 2006	u.a. chinesische Hamsterzellen (V79-4)	Laser-Scanning-Mikroskop (60x Objektiv)	automatisch (Software: Quantity One software, BioRad)	- 1 Gy: 10,4 Foci/ZK ( <sup>60</sup> Co-Quelle)	-untersuchter Dosisbereich: 0,2-1 Gy

Bisher finden sich nur wenige Publikationen, in denen strahlungsinduzierte Foci mit Hilfe von Computerprogrammen quantifiziert wurden (Übersicht s. Tab. 6.1), da der Anteil der Untersuchungen, in denen  $\gamma$ H2AX-Signale per Auge ausgezählt werden, noch überwiegt. Bei diesen Veröffentlichungen wird die Vergleichbarkeit der eingesetzten Systeme zur personenunabhängigen Foci-Quantifizierung durch verschiedene Komponenten erschwert. Dazu zählen z.B. physikalische Faktoren (verwendete Strahlenquelle und -qualität), systembedingte Faktoren (mikroskopische Ausrüstung, Auflösung des verwendeten Objektivs), biologische Faktoren, zu denen die Abhängigkeit der Foci-Induktion vom untersuchten Zellsystem (Macphail et al., 2003a; Banath et al., 2004) sowie von der Zellzyklus-Phase zum Zeitpunkt der Bestrahlung (Macphail et al., 2003b) gehören, und die Variationen der eingesetzten Software. Insbesondere wegen der Verwendung anderer Zellsysteme konnten die in dieser Arbeit mit Metafer4 an Lymphozyten ermittelten Ergebnisse nicht mit Publikationen über andere Bildanalyzesysteme verglichen werden. Stattdessen wurden sie anhand von Arbeiten, in denen  $\gamma$ H2AX manuell in Lymphozyten ausgezählt wurde, diskutiert (s. oben).

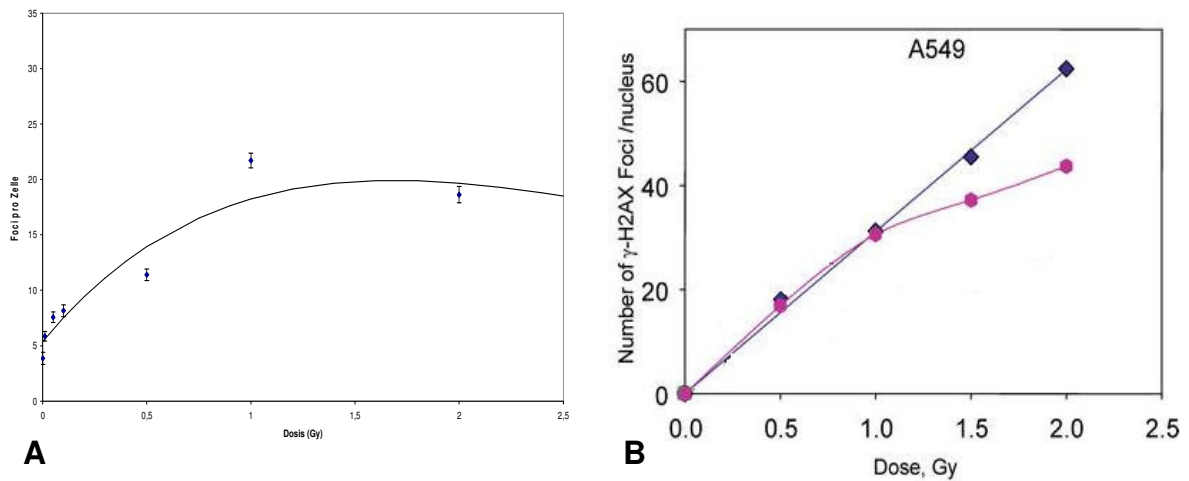
Nur in zwei der Arbeiten, in denen die Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci mittels Bildanalyzesoftware durchgeführt wurde, sind Strahlendosen von bis zu 2 Gy untersucht worden (Böcker und Iliakis, 2006; Wykes et al., 2006). In beiden Publikationen konnte, im Gegensatz zu dieser Arbeit, mit der verwendeten Software noch eine dosisabhängige Foci-Induktion bei Dosen  $> 1$  Gy nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für die besseren Ergebnisse könnte, zumindest in der Arbeit von Wykes et al. (2006), die Verwendung eines sehr hoch auflösenden Objektivs (400x) sein. Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte (Kapitel 5.1.3), resultiert die Anwendung eines höher auflösenden Objektivs in einem deutlichen Anstieg der Anzahl der detektierten  $\gamma$ H2AX-Foci.

Die Problematik der Überlagerung der  $\gamma$ H2AX-Fluoreszenzsignale nach Applikation höherer Strahlendosen, die auch bei manueller Foci-Quantifizierung ein Problem darstellt, kann in Bildanalyseprogrammen durch die Verwendung von Überlappungskorrekturen behoben werden. Ein solcher morphologischer Filter ist der so genannte „*WaterShed-Algorithmus*“ (Serra, 1982). Mit ihm lassen sich Foci, die ein

---

geringes Maß an Überlappung zeigen (weniger als 30%), noch in einzelne Spots trennen. Die automatische Zählung von  $\gamma$ H2AX-Foci bei gleichzeitiger Trennung sich stark überlappender Signale etablierten Böcker und Iliakis (2006). Dabei wurde die Form eines einzelnen Focus als rund definiert und dieser Parameter als Grundlage für die Trennung übereinander liegender Signale verwendet. Die mit und ohne Anwendung der Überlappungskorrektur erhaltenen Ergebnisse von Böcker und Iliakis in humanen Lungenkarzinomzellen (A549 Zellen) sind in der Abb. 6.1 B den eigenen, mit Metafer4 ermittelten Resultaten gegenübergestellt (Abb. 6.1 A). Aus der Grafik wird ersichtlich, dass bei beiden Bildanalyseprogrammen ohne die Verwendung einer Überlappungskorrektur (Sechsecke in Abb. 6.1 B) eine Sättigung des Systems ab einer Dosis von 1 Gy erreicht wird. Ab diesem kritischen Punkt resultiert eine Steigerung der Dosis nicht mehr in einem äquivalenten Anstieg in der Zahl der  $\gamma$ H2AX-Foci. Erst durch Anwendung eines Algorithmus zur Korrektur starker Focus-Überlappungen wird die von Böcker und Iliakis erstellte Dosis-Wirkungs-Kurve linear (s. Abb.6.1 B, Vierecke). Bis zu einer Dosis von 1 Gy wirkt sich die Anwendung eines Algorithmus zur Korrektur von Foci-Überlappungen nicht auf die ermittelten Ergebnisse aus.

Im Gegensatz zu dem von Böcker und Iliakis eingesetzten System der automatischen Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX kann das Bildanalyseprogramm Metafer überlappende Signale nicht identifizieren, was sich in dieser Arbeit in der reduzierten detektierten Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci bei Bestrahlungsdosen  $> 1$  Gy widerspiegelt. Da der  $\gamma$ H2AX-Assay im Rahmen dieser Arbeit besonders im Hinblick auf den Nachweis von geringen strahleninduzierten DNA-Schäden geprüft werden sollte und bei diesen geringen Strahlendosen keine Überlagerung der Fluoreszenzsignale zu erwarten ist, kann der Mangel an einer Überlappungskorrektur im Bildanalyseprogramm Metafer für das hier angestrebte Ziel vernachlässigt werden.



**Abbildung 6.1  $\gamma$ H2AX-Foci nach Bestrahlung an einer Röntgenquelle**

**A:** Eigene Ergebnisse mit Metafer4 in humanen primären Lymphozyten; **B:** Ergebnisse für A549 Zellen (humane Lungenkarzinomzellen) ohne (Sechsecke) und mit (Vierecke) Überlappungskorrektur einer anderen Bildanalyse-Software (modifizierte Abbildung aus: Böcker und Iliakis, 2006).

Ein Algorithmus, dem die Messung der Gesamtintensität der Zellen zugrunde liegt, könnte das Problem der Foci-Überlagerung beheben und wird derzeit von MetaSystems entwickelt. Dies könnte möglicherweise auch im höheren Dosisbereich zu auswertbaren Resultaten führen.

Betrachtet man die mit dem  $\gamma$ H2AX-Assay bei Auswertung an Metafer4 erzielte Sensitivität des Systems, konnte in dieser Arbeit auch im Niedrigdosisbereich bis 10 mGy eine dosisabhängige Foci-Induktion nachgewiesen werden (Abb. 5.10). In der Literatur wird bei manueller Auszählung von  $\gamma$ H2AX-Fluoreszenzsignalen eine Sensitivitätsgrenze der Methode von 1 mGy angegeben (Rothkamm und Löbrich, 2003), wobei die manuelle Auszählung der  $\gamma$ H2AX-Foci als kritischer, da nicht objektivierbarer Schritt gesehen werden muss. Ebenso kritisch ist die Tatsache zu beurteilen, dass dieser sehr niedrige Wert bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe reproduziert werden konnte. Im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen, in denen  $\gamma$ H2AX-Foci mit Hilfe von Bildanalysesoftware quantifiziert wurden (Tab. 6.1), konnte mit Metafer4 eine dosisabhängige Foci-Induktion in einem Dosisbereich nachgewiesen werden, der deutlich unter den bisher bei automatischer Foci-Auszählung untersuchten

Strahlendosen liegt. Dies bestätigt die Vermutung, dass eine vollautomatische Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX durch die Software Metafer4 besonders im Niedrigdosisbereich eine viel versprechende Alternative zur manuellen Probenauswertung darstellt.

#### **6.4 Nachweis kleiner strahleninduzierter DNA-Schäden mittels der $\gamma$ H2AX-Analyse in Lymphozyten von different strahlenempfindlichen Strahlentherapiepatienten**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Nachweis und die Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen, verursacht durch Photonenstrahlung, mit Hilfe des  $\gamma$ H2AX-Assays bis zu einer Dosis von 10 mGy gelingen. Damit sollte es prinzipiell auch möglich sein, Probenkollektive zu trennen, die sich in ihrem DNA-Schadensanteil nur geringfügig voneinander unterscheiden. Um dies zu testen, wurden Lymphozyten von klinisch strahlenempfindlichen und von potentiell strahlenunempfindlichen Strahlentherapiepatienten untersucht. Obwohl der Initialschaden der DNA nach Bestrahlung durch den  $\gamma$ H2AX-Assay direkt und deutlich nachweisbar ist, erwartet man Hinweise über interindividuelle Unterschiede bei der zellulären Strahlensensitivität eher anhand des verbleibenden DNA-Restschadens, welcher nicht vom körpereigenen Reparatursystem behoben wird. Durch Kinetikstudien konnte belegt werden, dass die Abnahme strahleninduzierter  $\gamma$ H2AX-Foci mit der Reparaturintensität von Doppelstrangbrüchen korreliert (Macphail et al., 2003a; Rothkamm und Löbrich, 2003; Kühne et al., 2004; Löbrich et al., 2005). Die Defizienz einer derartigen Reparatur steht in engem Zusammenhang mit einer erhöhten klinisch ausgeprägten Strahlenempfindlichkeit (Rübe et al., 2008) und wurde bereits mittels des  $\gamma$ H2AX-Assays in verschiedenen Arbeiten zum Nachweis zellulärer Strahlensensitivität herangezogen (Banath et al., 2004; Olive und Banath, 2004; Rübe et al., 2008). Dabei konnte kein Unterschied im Umfang des Initialschadens der Zellen nach Bestrahlung ermittelt werden, jedoch waren nach 24stündiger Inkubation in strahlensensitiven Zellen deutlich mehr  $\gamma$ H2AX-Foci erhalten und nachweisbar als in strahlenresistenten Zellen



(Rothkamm und Löbrich, 2003; Olive und Banath, 2004; Taneja et al., 2004). Die Ergebnisse einer Vielzahl solcher Studien lassen vermuten, dass der  $\gamma$ H2AX-Assay ein geeigneter Indikator für die Prognose zellulärer Strahlenempfindlichkeit ist (Macphail et al., 2003a; Olive und Banath, 2004; Taneja et al., 2004).

Um zu überprüfen, ob die in dieser Untersuchung erarbeiteten Bedingungen der vollautomatischen  $\gamma$ H2AX-Analyse geeignet sind, um ein Probenkollektiv, welches sich nur bezüglich geringer strahleninduzierter DNA-Schäden unterscheidet, in zwei Subpopulationen aufzutrennen, wurden isolierte Lymphozyten der Strahlentherapiepatienten, wie in Kapitel 4.2.8 beschrieben, in Kultur genommen, mit 5 Gy bestrahlt und nach 24stündiger Inkubation der Restschaden der Zellen mit Metafer4 gemessen. Dabei ließen sich die beiden Gruppen der strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Individuen anhand der ermittelten Werte voneinander differenzieren, wenn auch – bedingt durch die geringe Probenanzahl - statistisch nicht signifikant.

Aus der Untersuchung des Restschadens ergab sich ein optimaler Trennwert von 0,32 Foci pro Zellkern, mit dem strahlenempfindliche von strahlenunempfindlichen Probanden differenziert werden konnten. Dieser Wert trennt mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 40% die beiden Gruppen auf. Mit einer Spezifität von 100% ist diese Klassifikation zum Ausschluss einer Strahlenunempfindlichkeit geeignet. Bei einem Restschaden von  $< 0,32$  Foci pro Zellkern kann jedoch nicht mit ausreichender Sicherheit (Sensitivität von 40% für Strahlenempfindlichkeit) auf Strahlenunempfindlichkeit geschlossen werden (s. Tab. 5.11). Wird die Fläche unterhalb der ROC-Kurve (AUC, Abb. 5.12) als Gütemaß für die Eignung des Tests zur Differenzierung der beiden Gruppen strahlensensitiv bzw. nicht strahlensensitiv herangezogen, so ist mit dem ermittelten Wert von 0,6 nach der Klassifizierung von Hosmer und Lemeshow (2000) eine akzeptable Trennung der beiden Gruppen möglich. Dabei wäre eine optimale Trennung bei einem AUC-Wert von  $\geq 0,9$  gegeben. Beträgt die Fläche unter der ROC-Kurve 0,5, ist dagegen keine Trennung möglich (s. Kapitel 4.2.9).

Die Ergebnisse zum hier ermittelten Trennwert müssen zum einen in einer weiteren unabhängigen Studie validiert werden, zum anderen könnte versucht werden, eine Optimierung der Auflösung der Unterschiede im Restschaden zu erreichen, indem ein sensitiverer Classifier verwendet wird. Die Güte der Messergebnisse des Restschadens könnte möglicherweise auch durch einen hohen Gehalt an endogen bedingten DNA-Doppelstrangbrüchen beeinträchtigt sein. Dies könnte durch die Mitführung eines bestrahlungsfreien 0-Wertes korrigiert werden. Aufgrund des limitierten Patientenmaterials konnte in vorliegender Untersuchung jedoch keine zusätzliche 0-Kontrolle mitgeführt werden. Bei einer künftigen Validierung der Ergebnisse ist dies jedoch zu beachten.

Interessant ist, dass während der experimentellen Abwicklung des Forschungsprojektes (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, FuE Vorhaben 4467), aus dem die Lymphozyten für die vorliegende Untersuchung stammten, kein anderer zellulärer Test die beiden Subpopulationen „Strahlenempfindliche“ bzw. „Strahlenunempfindliche“ eindeutig voneinander trennen konnte. Weder Apoptose-Assays, noch Einzelzell-Gelelektrophoresen zeigten einen signifikanten Unterschied innerhalb des untersuchten Probenkollektivs. Auch die durchflusszytometrische Auswertung von  $\gamma$ H2AX in oben genannter Studie (Bestrahlungsdosis: 2 Gy) konnte keine Subpopulationen definieren. Mit vorliegender Arbeit ist es erstmalig gelungen, einen akzeptablen Trennwert zu ermitteln. Dieses Ergebnis ist viel versprechend für spezifisch ausgerichtete Folgestudien zur Strahlenempfindlichkeit.

Im Hinblick auf die ursprüngliche Zielsetzung dieser Arbeit konnten mit Hilfe der hier ermittelten Resultate wichtige Grundlagen geschaffen werden, um sehr geringe DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen sicher nachzuweisen. Durch die Automatisierung der Probenanalyse am Bildanalysesystem Metafer konnte darüber hinaus eine Objektivierung der Auswertroutine bei gleichzeitiger Erhöhung des Probendurchsatzes erzielt werden. Beides wirkt sich wiederum positiv auf die statistische Belastbarkeit der Ergebnisse aus.

## 7 Zusammenfassung

### **Nachweis geringer strahleninduzierter DNA-Schäden mittels automatisierter Quantifizierung von $\gamma$ H2AX**

#### **Einleitung:**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der  $\gamma$ H2AX-Assay, eine neuartige Methode zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen, auf seine Eignung zur Detektion geringer strahleninduzierter DNA-Schäden untersucht. Als  $\gamma$ H2AX wird die phosphorylierte Form des Histons H2AX bezeichnet, die sich bereits wenige Minuten nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen immunzytochemisch in Zellkernen nachweisen lässt. Da die manuelle mikroskopische Foci-Auswertung sehr zeitaufwändig und abhängig von subjektiven Kriterien des Untersuchers ist, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die automatisierte Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci zu etablieren. Eine solche Automatisierung würde in zukünftigen Studien die Anwendung des Assays mit einem hohen Probendurchsatz erlauben. Daher wurden in dieser Arbeit gleichzeitig zur Ermittlung der Sensitivitätsgrenze der Methode sowohl das verwendete Versuchsprotokoll als auch die Bildanalysesoftware im Hinblick auf die Automatisierung der Auswerteroutine optimiert.

#### **Methode:**

In humanen Lymphozyten wurden mittels Photonenstrahlung in einem Dosisbereich von 10 mGy bis 10 Gy DNA-Schäden induziert.  $\gamma$ H2AX akkumuliert an den Seiten von DNA-Doppelstrangbrüchen so stark, dass es immunzytochemisch in Form distinkter Punkte, so genannter  $\gamma$ H2AX-Foci, nachgewiesen und ausgezählt werden kann. Da die Zahl der  $\gamma$ H2AX-Foci mit der Menge der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche korreliert, ist es möglich, durch das Auszählen der Foci die Anzahl der Doppelstrangbrüche in Zellen zu ermitteln. Für die automatische Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX erfolgten sowohl eine methodische Optimierung als auch eine Optimierung

verschiedener Messeinstellungen der verwendeten Bildanalysesoftware Metafer4. An einem Probenkollektiv klinisch strahlenempfindlicher bzw. klinisch nicht strahlenempfindlicher Strahlentherapiepatienten wurde darüber hinaus untersucht, ob sich mit dem  $\gamma$ H2AX-Assay zwei Gruppen, die sich nur anhand geringer strahleninduzierter DNA-Schäden voneinander unterscheiden, differenzieren lassen. Dazu wurden Lymphozyten der Patienten *in vitro* mit einer  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle bestrahlt und die DNA-Reparaturkapazität der Zellen mit Hilfe des Nachweises von  $\gamma$ H2AX untersucht.

### **Ergebnisse:**

Bis zu einer Strahlendosis von 1 Gy konnte bei vollautomatischer Probenauswertung mit dem Bildanalyseprogramm Metafer eine dosisabhängige Induktion von  $\gamma$ H2AX-Foci nachgewiesen werden, wobei die in dieser Arbeit ermittelte Sensitivitätsgrenze der Methode bei 10 mGy lag. Die beiden Gruppen der klinisch strahlenempfindlichen und klinisch nicht strahlenempfindlichen Strahlentherapiepatienten konnten anhand der nach 24stündiger Inkubation persistierenden  $\gamma$ H2AX-Foci voneinander differenziert werden. Mit dem ermittelten Trennwert wurde eine 100%ige Spezifität und 40%ige Sensitivität des Tests erzielt, wobei das Ergebnis –bedingt durch die geringe Probenanzahl– statistisch nicht signifikant ist.

### **Schlussfolgerung:**

Die vollautomatische Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci durch das Bildanalyseprogramm Metafer ist insbesondere bei Strahlendosen  $\leq 1$  Gy eine viel versprechende Alternative zur manuellen Probenauswertung. Durch die Automatisierung der Foci-Auszählung konnte die Auswerterroutine objektiviert und der Zeitaufwand der Probenanalyse deutlich reduziert werden, so dass die Bewältigung eines hohen Probendurchsatzes möglich ist. Die in dieser Arbeit ermittelte Sensitivitätsgrenze der Methode von 10 mGy für Photonenstrahlung lässt vermuten, dass der  $\gamma$ H2AX-Assay bei vollautomatischer Probenauswertung durch Metafer4 eine geeignete Methode zum Nachweis geringer strahleninduzierter DNA-Schäden ist. Mit keinem anderen biologischen Assay können z.Z. DNA-Schäden in so niedrigen Dosisbereichen nachgewiesen werden. Darüber

hinaus eröffnet sich die Möglichkeit, strahlensensitive Patienten anhand ihres erhöhten Restschadens nach *in vitro* Bestrahlung ihrer Lymphozyten zu detektieren, wobei der in dieser Arbeit ermittelte Trennwert in einer Folgestudie validiert werden muss.

## 8 Summary

### **Detection of low dose induced radiation damage by automated $\gamma$ H2AX foci analysis**

#### **Introduction:**

This study investigated the ability to detect radiation-induced DNA damage by low doses using the  $\gamma$ H2AX-assay, a novel method for the detection of DNA double-strand breaks.  $\gamma$ H2AX is a phosphorylated form of the histone H2AX that can be detected immunocytochemically few minutes after the induction of DNA double-strand breaks in the nuclei of cells. Since manual microscopic foci analysis is very time consuming and dependent on subjective criteria of the user, a main task here was to provide an automated quantification of the  $\gamma$ H2AX-foci. An automation would allow to use this assay for high throughput projects in the future. To achieve this goal, the experimental protocol as well as the applied software for the image analysis was optimized and the sensitivity of the method was investigated.

#### **Method:**

DNA damage was induced in human lymphocytes by using photon or gamma radiation in a dose ranging from 10 mGy to 10 Gy.  $\gamma$ H2AX accumulates at the sides of DNA double-strand breaks. It can be detected and quantified immunocytochemically as distinct spots, so called  $\gamma$ H2AX-foci. Since the number of  $\gamma$ H2AX-foci and the amount of induced DNA double-strand breaks correlates, it is possible to detect the number of double-strand breaks in cells by counting the foci. To quantify  $\gamma$ H2AX foci automatically, an optimization of the experimental protocol as well as an optimization of different measurement settings of the used image analysis software Metafer4 was carried out. Furthermore, the sensitivity of the analysis system was investigated to separate between two groups showing only small differences in the induced radiation damage. Therefore, blood lymphocytes of clinically radiosensitive and normal-reacting

radiation therapy cancer patients were irradiated *in vitro* and the radiation damage by  $\gamma$ H2AX-foci analysis was investigated after 24 h.

**Results:**

A dose-dependent induction of  $\gamma$ H2AX-foci can be detected by the fully automated sample analysis by using the image analysis system Metafer up to a radiation dose of 1 Gy. The determined method sensitivity limit was 10 mGy. Both groups of clinically radiosensitive and clinically normal radiation therapy patients could be separated due to the number of  $\gamma$ H2AX-foci remaining unrepaired after 24 h. The cut point to differentiate the groups was set to 100% specificity and 40% sensitivity. However, the difference between the groups was not statistically significant probably due to the small number of patients.

**Conclusion:**

The fully automated quantification of  $\gamma$ H2AX-foci by the image analysis system Metafer is an encouraging alternative to manual sample analysis particularly at radiation doses  $\leq 1$  Gy. By automating the counting of foci, the analysis routine is now more objective and analysis time is reduced considerably, so that high throughput research projects can now be performed. It has been shown that the automated  $\gamma$ H2AX-assay described here is sensitive to detect radiation damage even at very low radiation doses. The detection limit is 10 mGy or 10 mSv for photon or gamma radiation. No other biological assay is able to detect DNA damage induced by such low radiation doses. In addition, it offers the possibility to differentiate radiation sensitive patients characterized by a higher residual DNA damage after *in vitro* exposure of lymphocytes. However, the here determined cut point has to be validated in a separate study.

## 9 Literaturverzeichnis

**Abraham R. T. (2001)**

Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases  
Genes Dev 15(17): 2177-2196

**Alpar D., Hermes J., Poto L., Laszlo R., Kereskai L., Jakso P., Pajor G., Pajor L. und Kajtar B. (2008)**

Automated FISH analysis using dual-fusion and break-apart probes on paraffin-embedded tissue sections  
Cytometry A 73(7): 651-657

**Altaf M., Saksouk N. und Cote J. (2007)**

Histone modifications in response to DNA damage  
Mutat Res 618(1-2): 81-90

**Ames B. N. und Gold L. S. (1991)**

Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer  
Mutat Res 250(1-2): 3-16

**Anderson C. W. und Lees-Miller S. P. (1992)**

The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK  
Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2(4): 283-314

**Arlett C. F., Lowe J. E., Harcourt S. A., Waugh A. P., Cole J., Roza L., Diffey B. L., Mori T., Nikaido O. und Green M. H. (1993)**

Hypersensitivity of human lymphocytes to UV-B and solar irradiation  
Cancer Res 53(3): 609-614

**Banath J. P. und Olive P. L. (2003)**

Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks  
Cancer Res 63(15): 4347-4350

**Banath J. P., Macphail S. H. und Olive P. L. (2004)**

Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines  
Cancer Res 64(19): 7144-7149



**Bannister A. J., Gottlieb T. M., Kouzarides T. und Jackson S. P. (1993)**

c-Jun is phosphorylated by the DNA-dependent protein kinase in vitro; definition of the minimal kinase recognition motif

Nucleic Acids Res 21(5): 1289-1295

**Bartek J. und Lukas J. (2001)**

Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage

Curr Opin Cell Biol 13(6): 738-747

**Bassing C. H., Chua K. F., Sekiguchi J., Suh H., Whitlow S. R., Fleming J. C., Monroe B. C., Ciccone D. N., Yan C., Vlasakova K., Livingston D. M., Ferguson D. O., Scully R. und Alt F. W. (2002)**

Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX

Proc Natl Acad Sci U S A 99(12): 8173-8178

**Bassing C. H. und Alt F. W. (2004)**

The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks

DNA Repair (Amst) 3(8-9): 781-796

**Bekker-Jensen S., Lukas C., Melander F., Bartek J. und Lukas J. (2005)**

Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1

J Cell Biol 170(2): 201-211

**Bekker-Jensen S., Lukas C., Kitagawa R., Melander F., Kastan M. B., Bartek J. und Lukas J. (2006)**

Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks

J Cell Biol 173(2): 195-206

**Berger S. L. (2002)**

Histone modifications in transcriptional regulation

Curr Opin Genet Dev 12(2): 142-148

**Blakely W. F., Prasanna P. G., Kolanko C. J., Pyle M. D., Mosbrook D. M., Loats A. S., Rippeon T. L. und Loats H. (1995)**

Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase-finder

Stem Cells 13 Suppl 1223-230

**Bocker W., Muller W. U. und Streffer C. (1995)**

Image processing algorithms for the automated micronucleus assay in binucleated human lymphocytes

Cytometry 19(4): 283-294

**Bocker W., Streffer C., Muller W. U. und Yu C. (1996)**

Automated scoring of micronuclei in binucleated human lymphocytes  
Int J Radiat Biol 70(5): 529-537

**Bocker W., Rolf W., Bauch T., Muller W. U. und Streffer C. (1999)**

Automated comet assay analysis  
Cytometry 35(2): 134-144

**Böcker W. und Iliakis G. (2006)**

Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells  
Radiat Res 165(1): 113-124

**Bouquet F., Muller C. und Salles B. (2006)**

The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage  
Cell Cycle 5(10): 1116-1122

**Bryant P. E. (1998)**

The signal model: a possible explanation for the conversion of DNA double-strand breaks into chromatid breaks  
Int J Radiat Biol 73(3): 243-251

Bundesamt für Strahlenschutz (BfS) D. M. D.

**Burma S., Chen B. P., Murphy M., Kurimasa A. und Chen D. J. (2001)**

ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks  
J Biol Chem 276(45): 42462-42467

**Burma S., Chen B. P. C. und Chen D. J. (2006)**

Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity  
DNA Repair 5(9-10): 1042-1048

**Celeste A., Petersen S., Romanienko P. J., Fernandez-Capetillo O., Chen H. T., Sedelnikova O. A., Reina-San-Martin B., Coppola V., Meffre E., Difilippantonio M. J., Redon C., Pilch D. R., Orlaru A., Eckhaus M., Camerini-Otero R. D., Tessarollo L., Livak F., Manova K., Bonner W. M., Nussenzweig M. C. und Nussenzweig A. (2002)**

Genomic instability in mice lacking histone H2AX  
Science 296(5569): 922-927

**Celeste A., Fernandez-Capetillo O., Kruhlak M. J., Pilch D. R., Staudt D. W., Lee A., Bonner R. F., Bonner W. M. und Nussenzweig A. (2003)**

Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks  
Nat Cell Biol 5(7): 675-679

**Chapman J. R. und Jackson S. P. (2008)**

Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage  
EMBO Rep 9(8): 795-801

**Chatgililoglu C. und O'Neill P. (2001)**

Free radicals associated with DNA damage  
Exp Gerontol 36(9): 1459-1471

**Chen H. T., Bhandoola A., Difilippantonio M. J., Zhu J., Brown M. J., Tai X., Rogakou E. P., Brotz T. M., Bonner W. M., Ried T. und Nussenzweig A. (2000)**

Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX  
Science 290(5498): 1962-1965

**Costes S. V., Boissiere A., Ravani S., Romano R., Parvin B. und Barcellos-Hoff M. H. (2006)**

Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts  
Radiat Res 165(5): 505-515

**Costes S. V., Ponomarev A., Chen J. L., Nguyen D., Cucinotta F. A. und Barcellos-Hoff M. H. (2007)**

Image-based modeling reveals dynamic redistribution of DNA damage into nuclear sub-domains  
PLoS Comput Biol 3(8): e155

**Cox J. D., Stetz J. und Pajak T. F. (1995)**

Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 31(5): 1341-1346

**Cox M. M., Goodman M. F., Kreuzer K. N., Sherratt D. J., Sandler S. J. und Marians K. J. (2000)**

The importance of repairing stalled replication forks  
Nature 404(6773): 37-41

**d'Adda di Fagagna F., Reaper P. M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., Von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N. P. und Jackson S. P. (2003)**

A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence  
Nature 426(6963): 194-198

**Dupre A., Boyer-Chatenet L. und Gautier J. (2006)**

Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex  
Nat Struct Mol Biol 13(5): 451-457

**Ewald B., Sampath D. und Plunkett W. (2007)**

H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation  
Mol Cancer Ther 6(4): 1239-1248

**Falek J., Coates J. und Jackson S. P. (2005)**

Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage  
Nature 434(7033): 605-611

**Felsenfeld G. und Groudine M. (2003)**

Controlling the double helix  
Nature 421(6921): 448-453

**Fernandez-Capetillo O., Chen H. T., Celeste A., Ward I., Romanienko P. J., Morales J. C., Naka K., Xia Z., Camerini-Otero R. D., Motoyama N., Carpenter P. B., Bonner W. M., Chen J. und Nussenzweig A. (2002)**

DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1  
Nat Cell Biol 4(12): 993-997

**Foster E. R. und Downs J. A. (2005)**

Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair  
FEBS J 272(13): 3231-3240

**Frieauff W., Hartmann A. und Suter W. (2001)**

Automatic analysis of slides processed in the Comet assay  
Mutagenesis 16(2): 133-137

**Furuta T., Takemura H., Liao Z. Y., Aune G. J., Redon C., Sedelnikova O. A., Pilch D. R., Rogakou E. P., Celeste A., Chen H. T., Nussenzweig A., Aladjem M. I., Bonner W. M. und Pommier Y. (2003)**

Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes  
J Biol Chem 278(22): 20303-20312

**Gedik C. M., Ewen S. W. und Collins A. R. (1992)**

Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells  
Int J Radiat Biol 62(3): 313-320

**Goldberg M., Stucki M., Falck J., D'Amours D., Rahman D., Pappin D., Bartek J. und Jackson S. P. (2003)**

MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint  
Nature 421(6926): 952-956

**Gomolka M., Rossler U., Hornhardt S., Walsh L., Panzer W. und Schmid E. (2005)**

Measurement of the initial levels of DNA damage in human lymphocytes induced by 29 kV X rays (mammography X rays) relative to 220 kV X rays and gamma rays  
Radiat Res 163(5): 510-519

**Gomolka M. (2008)**

Strahlenbiologie und Strahlenschutz

Teil 2) Strahlenspezifische Biomarker - Individuelle Strahlenempfindlichkeit und zukünftiger Forschungsbedarf

Umweltmedizinischer Informationsdienst 1/2008, pp. 9-13

**Goodhead D. T. (1994)**

Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA  
Int J Radiat Biol 65(1): 7-17

**Green M. H., Waugh A. P., Lowe J. E., Harcourt S. A., Cole J. und Arlett C. F. (1994)**

Effect of deoxyribonucleosides on the hypersensitivity of human peripheral blood lymphocytes to UV-B and UV-C irradiation  
Mutat Res 315(1): 25-32

**Haber J. E. (2000)**

Partners and pathways repairing a double-strand break  
Trends Genet 16(6): 259-264

**Halicka H. D., Huang X., Traganos F., King M. A., Dai W. und Darzynkiewicz Z. (2005)**

Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis  
Cell Cycle 4(2): 339-345

**Halliwell B. und Aruoma O. I. (1991)**

DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems  
FEBS Letters 281(1-2): 9-19

**Hansen J. C. (2002)**

Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions  
Annu Rev Biophys Biomol Struct 31361-392

**Hoeijmakers J. H. (2001)**

Genome maintenance mechanisms for preventing cancer  
Nature 411(6835): 366-374

**Hosmer D. W. und Lemeshow S. (2000)**

Applied logistic regression  
Wiley & Sons, New York

**Huber R., Kulka U., Lorch T., Braselmann H. und Bauchinger M. (1995)**

Automated metaphase finding: an assessment of the efficiency of the METAFER2 system in a routine mutagenicity assay  
Mutat Res 334(1): 97-102

**Iliakis G., Wang Y., Guan J. und Wang H. (2003)**

DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation  
Oncogene 22(37): 5834-5847

**Iliakis G., Wang H., Perrault A. R., Boecker W., Rosidi B., Windhofer F., Wu W., Guan J., Terzoudi G. und Pantelias G. (2004)**

Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation  
Cytogenet Genome Res 104(1-4): 14-20

**Imlay J. A. und Linn S. (1988)**

DNA damage and oxygen radical toxicity  
Science 240(4857): 1302-1309

**Jackson S. P. (2002)**

Sensing and repairing DNA double-strand breaks  
Carcinogenesis 23(5): 687-696

**Kaneko H., Igarashi K., Kataoka K. und Miura M. (2005)**

Heat shock induces phosphorylation of histone H2AX in mammalian cells  
Biochem Biophys Res Commun 328(4): 1101-1106

**Kang J., Ferguson D., Song H., Bassing C., Eckersdorff M., Alt F. W. und Xu Y. (2005)**

Functional interaction of H2AX, NBS1, and p53 in ATM-dependent DNA damage responses and tumor suppression  
Mol Cell Biol 25(2): 661-670

**Kataoka Y., Bindokas V. P., Duggan R. C., Murley J. S. und Grdina D. J. (2006)**

Flow cytometric analysis of phosphorylated histone H2AX following exposure to ionizing radiation in human microvascular endothelial cells

J Radiat Res (Tokyo) 47(3-4): 245-257

**Khanna K. K. und Jackson S. P. (2001)**

DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection

Nat Genet 27(3): 247-254

**Kim S.-T., Lim D.-S., Canman C. E. und Kastan M. B. (1999)**

Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members

J. Biol. Chem. 274(53): 37538-37543

**Kobayashi J., Tauchi H., Sakamoto S., Nakamura A., Morishima K., Matsuura S., Kobayashi T., Tamai K., Tanimoto K. und Komatsu K. (2002)**

NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain

Curr Biol 12(21): 1846-1851

**Kornberg R. D. (1974)**

Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA

Science 184(139): 868-871

**Kornberg R. D. und Lorch Y. (1999)**

Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome

Cell 98(3): 285-294

**Kühne M., Riballo E., Rief N., Rothkamm K., Jeggo P. A. und Lobrich M. (2004)**

A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity

Cancer Res 64(2): 500-508

**Lavin M. F. (2007)**

ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks

Oncogene 26(56): 7749-7758

**Lavin M. F. und Kozlov S. (2007)**

DNA damage-induced signalling in ataxia-telangiectasia and related syndromes

Radiother Oncol 83(3): 231-237

**Lee J. H. und Paull T. T. (2005)**

ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex

Science 308(5721): 551-554

**Lieber M. R., Ma Y., Pannicke U. und Schwarz K. (2003)**

Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining  
Nat Rev Mol Cell Biol 4(9): 712-720

**Lindahl T. (1993)**

Instability and decay of the primary structure of DNA  
Nature 362(6422): 709-715

**Löbrich M. und Jeggo P. A. (2005)**

Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow  
DNA Repair (Amst) 4(7): 749-759

**Löbrich M., Rief N., Kuhne M., Heckmann M., Fleckenstein J., Rube C. und Uder M. (2005)**

In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations  
Proc Natl Acad Sci U S A 102(25): 8984-8989

**Lou Z., Minter-Dykhouse K., Franco S., Gostissa M., Rivera M. A., Celeste A., Manis J. P., van Deursen J., Nussenzweig A., Paull T. T., Alt F. W. und Chen J. (2006)**

MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals  
Mol Cell 21(2): 187-200

**Lowndes N. F. und Murguia J. R. (2000)**

Sensing and responding to DNA damage  
Curr Opin Genet Dev 10(1): 17-25

**Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F. und Richmond T. J. (1997)**

Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution  
Nature 389(6648): 251-260

**Luger K. (2003)**

Structure and dynamic behavior of nucleosomes  
Curr Opin Genet Dev 13(2): 127-135

**Lukas C., Melander F., Stucki M., Falck J., Bekker-Jensen S., Goldberg M., Lerenthal Y., Jackson S. P., Bartek J. und Lukas J. (2004)**

Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention  
EMBO J 23(13): 2674-2683



**Lydall D. und Whitehall S. (2005)**

Chromatin and the DNA damage response  
DNA Repair (Amst) 4(10): 1195-1207

**Ma Y., Lu H., Schwarz K. und Lieber M. R. (2005)**

Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model  
Cell Cycle 4(9): 1193-1200

**MacPhail S. H., Banath J. P., Yu T. Y., Chu E. H., Lambur H. und Olive P. L. (2003a)**

Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays  
Int J Radiat Biol 79(5): 351-358

**MacPhail S. H., Banath J. P., Yu Y., Chu E. und Olive P. L. (2003b)**

Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells  
Radiat Res 159(6): 759-767

**Mahadevaiah S. K., Turner J. M., Baudat F., Rogakou E. P., de Boer P., Blanco-Rodriguez J., Jasin M., Keeney S., Bonner W. M. und Burgoyne P. S. (2001)**

Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis  
Nat Genet 27(3): 271-276

**Mannironi C., Bonner W. M. und Hatch C. L. (1989)**

H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals  
Nucleic Acids Res 17(22): 9113-9126

**Mello Filho A. C., Hoffmann M. E. und Meneghini R. (1984)**

Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron  
Biochem J 218(1): 273-275

**Modesti M. und Kanaar R. (2001)**

DNA repair: spot(light)s on chromatin  
Curr Biol 11(6): R229-232

**Moore J. K. und Haber J. E. (1996)**

Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*  
Mol Cell Biol 16(5): 2164-2173

**Natarajan A. T. und Obe G. (1984)**

Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. III. Restriction endonucleases

Chromosoma 90(2): 120-127

**Niida H. und Nakanishi M. (2006)**

DNA damage checkpoints in mammals

Mutagenesis 21(1): 3-9

**Nikjoo H., O'Neill P., Goodhead D. T. und Terrissol M. (1997)**

Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events

Int J Radiat Biol 71(5): 467-483

**Noll M. (1974)**

Internal structure of the chromatin subunit

Nucleic Acids Res 1(11): 1573-1578

**Nyberg K. A., Michelson R. J., Putnam C. W. und Weinert T. A. (2002)**

Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints

Annu Rev Genet 36:617-656

**Obe G., Johannes C. und Schulte-Frohlinde D. (1992)**

DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation

Mutagenesis 7(1): 3-12

**Obe G., Pfeiffer P., Savage J. R. K., Johannes C., Goedecke W., Jeppesen P., Natarajan A. T., Martínez-López W., Folle G. A. und Drets M. E. (2002)**

Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 504(1-2): 17-36

**Olive P. L., Banath J. P. und Durand R. E. (1990)**

Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay

Radiat Res 122(1): 86-94

**Olive P. L. und Banath J. P. (1993)**

Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd

Int J Radiat Biol 64(4): 349-358

**Olive P. L. (1998)**

The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation  
Radiat Res 150(5 Suppl): S42-51

**Olive P. L. und Banath J. P. (2004)**

Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 58(2): 331-335

**Ostling O. und Johanson K. J. (1987)**

Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell  
Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 52(5): 683-691

**Paques F. und Haber J. E. (1999)**

Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*  
Microbiol Mol Biol Rev 63(2): 349-404

**Park E. J., Chan D. W., Park J. H., Oettinger M. A. und Kwon J. (2003)**

DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner  
Nucleic Acids Res 31(23): 6819-6827

**Paull T. T., Rogakou E. P., Yamazaki V., Kirchgessner C. U., Gellert M. und Bonner W. M. (2000)**

A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage  
Curr Biol 10(15): 886-895

**Paull T. T. und Lee J. H. (2005)**

The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM  
Cell Cycle 4(6): 737-740

**Pearce A. K. und Humphrey T. C. (2001)**

Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways  
Trends Cell Biol 11(10): 426-433

**Pero R. W., Sheng Y., Olsson A., Bryngelsson C. und Lund-Pero M. (1996)**

Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors  
Carcinogenesis 17(1): 13-18

**Peterson C. L. und Cote J. (2004)**

Cellular machineries for chromosomal DNA repair  
Genes Dev 18(6): 602-616

**Peterson C. L. und Laniel M. A. (2004)**

Histones and histone modifications  
Curr Biol 14(14): R546-551

**Petrini J. H. (1999)**

The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response  
Am J Hum Genet 64(5): 1264-1269

**Petrini J. H. und Stracker T. H. (2003)**

The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators  
Trends Cell Biol 13(9): 458-462

**Povirk L. F., Wubter W., Kohnlein W. und Hutchinson F. (1977)**

DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin  
Nucleic Acids Res 4(10): 3573-3580

**Powell S. und McMillan T. J. (1990)**

DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation  
Radiother Oncol 19(2): 95-108

**Pruss D., Hayes J. J. und Wolffe A. P. (1995)**

Nucleosomal anatomy--where are the histones?  
Bioessays 17(2): 161-170

**Rathbun G. A., Ziv Y., Lai J. H., Hill D., Abraham R. H., Shiloh Y. und Cantley L. C. (1999)**

ATM and lymphoid malignancies; use of oriented peptide libraries to identify novel substrates of ATM critical in downstream signaling pathways  
Curr Top Microbiol Immunol 246:267-273; discussion 274

**Redon C., Pilch D., Rogakou E., Sedelnikova O., Newrock K. und Bonner W. (2002)**

Histone H2A variants H2AX and H2AZ  
Curr Opin Genet Dev 12(2): 162-169

**Redon C. E., Dickey J. S., Bonner W. M. und Sedelnikova O. A. (2008)**

gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin  
Space Res. , in press  
J. Adv.

**Rich T., Allen R. L. und Wyllie A. H. (2000)**

Defying death after DNA damage  
Nature 407(6805): 777-783

**Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S. und Bonner W. M. (1998)**

DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139  
J Biol Chem 273(10): 5858-5868

**Rogakou E. P., Boon C., Redon C. und Bonner W. M. (1999)**

Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo  
J Cell Biol 146(5): 905-916

**Rogakou E. P., Nieves-Neira W., Boon C., Pommier Y. und Bonner W. M. (2000)**

Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139  
J Biol Chem 275(13): 9390-9395

**Romm H., Oestreicher U. und Stephan G. (2005)**

Welche Möglichkeiten bietet die biologische Dosimetrie für den beruflichen Strahlenschutz?  
In: StrahlenschutzPraxis 1: pp. 37-42

**Rössler U., Hornhardt S., Seidl C., Muller-Lau E., Walsh L., Panzer W., Schmid E., Senekowitsch-Schmidtke R. und Gomolka M. (2006)**

The sensitivity of the alkaline comet assay in detecting DNA lesions induced by X rays, gamma rays and alpha particles  
Radiat Prot Dosimetry 122(1-4): 154-159

**Rothkamm K., Kruger I., Thompson L. H. und Lobrich M. (2003)**

Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle  
Mol Cell Biol 23(16): 5706-5715

**Rothkamm K. und Löbrich M. (2003)**

Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses  
Proc Natl Acad Sci U S A 100(9): 5057-5062

**Rothkamm K., Balroop S., Shekhdar J., Fernie P. und Goh V. (2007)**

Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure  
Radiology 242(1): 244-251

**Rübe C. E., Grudzinski S., Kuhne M., Dong X., Rief N., Lobrich M. und Rube C. (2008)**

DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing  
Clin Cancer Res 14(20): 6546-6555

**Sachs L. und Hedderich J. (2006)**

Angewandte Statistik - Methodensammlung mit R (12. Auflage)  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

**Saha A., Wittmeyer J. und Cairns B. R. (2006)**

Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones  
Nat Rev Mol Cell Biol 7(6): 437-447

**Sak A., Grehl S., Erichsen P., Engelhard M., Grannass A., Levegrun S., Pottgen C., Groneberg M. und Stuschke M. (2007)**

gamma-H2AX foci formation in peripheral blood lymphocytes of tumor patients after local radiotherapy to different sites of the body: dependence on the dose-distribution, irradiated site and time from start of treatment  
Int J Radiat Biol 83(10): 639-652

**Scherthan H., Hieber L., Braselmann H., Meineke V. und Zitzelsberger H. (2008)**

Accumulation of DSBs in gamma-H2AX domains fuel chromosomal aberrations  
Biochem Biophys Res Commun 371(4): 694-697

**Schultz L. B., Chehab N. H., Malikzay A. und Halazonetis T. D. (2000)**

p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks  
J Cell Biol 151(7): 1381-1390

**Schunck C., Johannes T., Varga D., Lörch T. und Plesch A. (2004)**

New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals  
Cytogenetic and Genome Research 104(1-4): 383-389

**Sedelnikova O. A., Horikawa I., Zimonjic D. B., Popescu N. C., Bonner W. M. und Barrett J. C. (2004)**

Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks  
Nat Cell Biol 6(2): 168-170

**Sedelnikova O. A. und Bonner W. M. (2006)**

GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence  
Cell Cycle 5(24): 2909-2913

**Serra J. (1982)**

Image analysis and mathematical morphology  
Academic Press, New York

**Shiloh Y. (2003)**

ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity  
Nat Rev Cancer 3(3): 155-168

**Stephan G., Oestreicher U. und Romm H. (2007)**

Biological Dosimetry  
In: Chromosomal Alterations - Methods, Results and Importance in Human Health  
Obe G., Vijayalaxmi, Eds.  
Springer Verlag, Heidelberg: pp. 341-349

**Stewart G. S., Wang B., Bignell C. R., Taylor A. M. und Elledge S. J. (2003)**

MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint  
Nature 421(6926): 961-966

**Stiff T., O'Driscoll M., Rief N., Iwabuchi K., Lobrich M. und Jeggo P. A. (2004)**

ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation  
Cancer Res 64(7): 2390-2396

**Stucki M., Clapperton J. A., Mohammad D., Yaffe M. B., Smerdon S. J. und Jackson S. P. (2005)**

MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks  
Cell 123(7): 1213-1226

**Stucki M. und Jackson S. P. (2006)**

gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes  
DNA Repair (Amst) 5(5): 534-543

**Takahashi A., Matsumoto H., Nagayama K., Kitano M., Hirose S., Tanaka H., Mori E., Yamakawa N., Yasumoto J., Yuki K., Ohnishi K. und Ohnishi T. (2004)**

Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing  
Cancer Res 64(24): 8839-8845

**Takahashi A. und Ohnishi T. (2005)**

Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks?  
Cancer Lett 229(2): 171-179

**Takata M., Sasaki M. S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A. und Takeda S. (1998)**

Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells  
EMBO J 17(18): 5497-5508

**Tanaka T., Huang X., Halicka H. D., Zhao H., Traganos F., Albino A. P., Dai W. und Darzynkiewicz Z. (2007)**

Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents  
Cytometry A 71(9): 648-661

**Taneja N., Davis M., Choy J. S., Beckett M. A., Singh R., Kron S. J. und Weichselbaum R. R. (2004)**

Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy  
J Biol Chem 279(3): 2273-2280

**Theodosiou Z., Kasampalidis I. N., Livanos G., Zervakis M., Pitas I. und Lyroudia K. (2007)**

Automated analysis of FISH and immunohistochemistry images: a review  
Cytometry A 71(7): 439-450

**Thiriet C. und Hayes J. J. (2005)**

Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair  
Mol Cell 18(6): 617-622

**Tsankova N., Renthal W., Kumar A. und Nestler E. J. (2007)**

Epigenetic regulation in psychiatric disorders  
Nat Rev Neurosci 8(5): 355-367

**Uziel T., Lerenthal Y., Moyal L., Andegeko Y., Mittelman L. und Shiloh Y. (2003)**

Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage  
EMBO J 22(20): 5612-5621

**van Attikum H. und Gasser S. M. (2005)**

The histone code at DNA breaks: a guide to repair?  
Nat Rev Mol Cell Biol 6(10): 757-765

**van Gent D. C., Hoeijmakers J. H. und Kanaar R. (2001)**

Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection  
Nat Rev Genet 2(3): 196-206

**Varga D., Johannes T., Jainta S., Schuster S., Schwarz-Boeger U., Kiechle M., Patino Garcia B. und Vogel W. (2004)**

An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis  
Mutagenesis 19(5): 391-397



**Vijayalaxmi, Strauss G. H. und Tice R. R. (1993)**

An analysis of gamma-ray-induced DNA damage in human blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes

Mutat Res 292(2): 123-128

**Ward I. M. und Chen J. (2001)**

Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress

J Biol Chem 276(51): 47759-47762

**Ward I. M., Minn K., Jorda K. G. und Chen J. (2003)**

Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX

J Biol Chem 278(22): 19579-19582

**Ward J. F. (1994)**

The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences

Int J Radiat Biol 66(5): 427-432

**Weber J., Scheid W. und Traut H. (1992)**

Time-saving in biological dosimetry by using the automatic metaphase finder Metafer2

Mutat Res 272(1): 31-34

**Wei Y. H. (1998)**

Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging

Proc Soc Exp Biol Med 217(1): 53-63

**West M. H. und Bonner W. M. (1980)**

Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species

Biochemistry 19(14): 3238-3245

**Wykes S. M., Piasentin E., Joiner M. C., Wilson G. D. und Marples B. (2006)**

Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks

Radiat Res 165(5): 516-524

**Xiao H., Li T. K., Yang J. M. und Liu L. F. (2003)**

Acidic pH induces topoisomerase II-mediated DNA damage

Proc Natl Acad Sci U S A 100(9): 5205-5210

**Xie A., Puget N., Shim I., Odate S., Jarzyna I., Bassing C. H., Alt F. W. und Scully R. (2004)**

Control of sister chromatid recombination by histone H2AX

Mol Cell 16(6): 1017-1025

**Xu X. und Stern D. F. (2003)**

NFBD1/MDC1 regulates ionizing radiation-induced focus formation by DNA checkpoint signaling and repair factors

FASEB J 17(13): 1842-1848

**You Z., Chahwan C., Bailis J., Hunter T. und Russell P. (2005)**

ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1

Mol Cell Biol 25(13): 5363-5379

**Zhou B.-B. S. und Elledge S. J. (2000)**

The DNA damage response: putting checkpoints in perspective

Nature 408(6811): 433-439

**Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (2005)**

Multiparametrische Untersuchungen an Strahlentherapiepatienten mit auffälligen Strahlenreaktionen (BMU-2005-662)

Schriftenreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz (ISSN 1612-6386)

[http://www.bmu.de/strahlenschutz/schriftenreihe\\_reaktorsicherheit\\_strahlenschutz/doc/35979.php](http://www.bmu.de/strahlenschutz/schriftenreihe_reaktorsicherheit_strahlenschutz/doc/35979.php)>

**Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (2009)**

Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben „Molekulare Biomarker für zelluläre und klinische Strahlenempfindlichkeit“ (FuE Vorhaben StSch 4467)

Schriftenreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz (ISSN 1612-6386)

nach Veröffentlichung einsehbar unter:

<http://www.bmu.de/mediathek/veroeffentlichungen/schriftenreihe/doc/20112.php>

## 10 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 4.1 Einzelheiten zu den beiden mittels einer Röntgenquelle durchgeführten Bestrahlungsversuchen.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 5.1 Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Fixierung von Suspensionszellen auf Objektträgern und Beurteilung im Hinblick auf ihre Eignung für eine Automatisierung der Quantifizierung von <math>\gamma</math>H2AX in Lymphozyten.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabelle 5.2 Vergleich der unter verschiedenen Classifiern in einem Trainingsdatensatz von bestrahlten Zellen erhaltenen mittleren Anzahl von <math>\gamma</math>H2AX-Foci pro Zellkern .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 5.3 Vergleich der unter verschiedenen Classifiern in einem Trainingsdatensatz von unbestrahlten Zellen erhaltenen mittleren Anzahl von <math>\gamma</math>H2AX-Foci pro Zellkern.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 5.4 Fit-Funktion und enthaltene Fit-Parameter sowie das Bestimmtheitsmaß (<math>R^2</math>) der Anpassungskurve aus der Abb. 5.9 .....</b>	<b>62</b>
<b>Tabelle 5.5 Anzahl der Foci/ZK in primären Lymphozyten 30 min nach Bestrahlung mit <math>^{137}\text{Cs}</math>, dargestellt in Abb. 5.9 .....</b>	<b>62</b>
<b>Tabelle 5.6 Fit-Funktion und enthaltene Fit-Parameter sowie das Bestimmtheitsmaß (<math>R^2</math>) der Anpassungskurve aus der Abb. 5.10 .....</b>	<b>62</b>
<b>Tabelle 5.7 Anzahl der Foci/ZK in primären Lymphozyten 30 min nach Bestrahlung mit einer Röntgenquelle, dargestellt in Abb. 5.10.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabelle 5.8 Mittlere Anzahl der mit Metafer4 detektierten <math>\gamma</math>H2AX-Foci in primären Lymphozyten eines Probenkollektivs nach 5 Gy Bestrahlung (<math>^{137}\text{Cs}</math>) und 24stündiger Inkubation...</b>	<b>66</b>
<b>Tabelle 5.9 Wilcoxon Rangsummentest (2-seitig) .....</b>	<b>67</b>
<b>Tabelle 5.10 Zusammenfassung der ROC des Restschadens hinsichtlich klinischer Strahlenempfindlichkeit.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabelle 5.11 Sensitivität und Spezifität bei einem Trennwert von 0,32 Foci pro Zellkern .....</b>	<b>70</b>
<b>Tabelle 6.1 Vergleich verschiedener Publikationen über die manuelle bzw. automatische Quantifizierung von <math>\gamma</math>H2AX-Foci in unterschiedlichen Zellsystemen.....</b>	<b>78</b>

## 11 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 2.1 Die Organisation der DNA innerhalb der Chromatinstruktur (nach Felsenfeld und Groudine, 2003).....	4
Abbildung 2.2 Schematischer Aufbau eines Nukleosoms (nach Tsankova et al., 2007) .....	5
Abbildung 2.3 Zelluläre Antworten auf DNA-Schäden (modifiziert, nach Shiloh 2003) .....	8
Abbildung 2.4 Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort (nach Khanna und Jackson, 2001) .....	12
Abbildung 2.5 DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen (nach Hoeijmakers, 2001) .....	16
Abbildung 2.6 Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort (A: nach Lou et al., 2006; B: nach Stucki und Jackson, 2006).....	22
Abbildung 4.1 Aufbau einer Zytospin-Apparatur (nach Thermo Electron Corporation, USA).....	36
Abbildung 4.2 Das vollautomatische Bildanalysesystem Metafer (aus Schunck et al., 2004) .....	39
Abbildung 5.1 $\gamma$ H2AX-Foci in primären humanen Lymphozyten 30 min nach Bestrahlung mit 1 Gy ( $^{137}\text{Cs}$ -Quelle), gemessen mit Metafer4 am Fluoreszenzmikroskop .....	43
Abbildung 5.2 Bildschirmoberfläche der Software Metafer4 mit Erläuterungen zu einzelnen wichtigen Punkten.....	46
Abbildung 5.3 Bildschirmoberfläche des Menüpunktes „Feature Setup“ der Software Metafer4 zur Erstellung eines Classifiers.....	47
Abbildung 5.4 Vergleich der Anzahl von $\gamma$ H2AX-Foci in 1 Gy bestrahlten Lymphozyten ( $^{137}\text{Cs}$ ) nach 30minütiger Inkubation in Abhängigkeit vom Classifier .....	52
Abbildung 5.5 Vergleich der Anzahl von $\gamma$ H2AX-Foci in unbestrahlten Kontrollzellen nach 30minütiger Inkubation in Abhängigkeit vom Classifier .....	53
Abbildung 5.6 Mittlere Anzahl der unter Verwendung eines 40x bzw. 63x Objektivs detektierten $\gamma$ H2AX-Foci pro Zellkern in bestrahlten bzw. unbestrahlten primären Lymphozyten nach 30 minütiger Inkubation.....	55
Abbildung 5.7 Quantifizierung von $\gamma$ H2AX-Foci durch Metafer4 mit den Classifiern 3-1-5 und 5-1-10 in verschiedenen Dosisbereichen.....	58

<b>Abbildung 5.8</b> Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von $\gamma$ H2AX-Foci in primären humanen Lymphozyten nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen mit $^{137}\text{Cs}$ und 30 min Inkubationszeit.....	<b>60</b>
<b>Abbildung 5.9</b> Dosis-Wirkungs-Kurve für primäre Lymphozyten 30 min nach Bestrahlung mit $^{137}\text{Cs}$ .....	<b>61</b>
<b>Abbildung 5.10</b> Dosis-Wirkungs-Kurve für primäre Lymphozyten 30 min nach Bestrahlung mit einer Röntgenquelle .....	<b>64</b>
<b>Abbildung 5.11</b> Restschaden 24 h nach Bestrahlung mit 5 Gy ( $^{137}\text{Cs}$ ) in Lymphozyten von Strahlentherapiepatienten.....	<b>68</b>
<b>Abbildung 5.12</b> ROC des Restschadens in Lymphozyten von Strahlentherapiepatienten .....	<b>70</b>
<b>Abbildung 6.1</b> $\gamma$ H2AX-Foci nach Bestrahlung an einer Röntgenquelle.....	<b>81</b>

## 12 Abkürzungsverzeichnis

$^{137}\text{Cs}$	Cäsium-137
53BP1	<i>p53-binding protein 1</i>
Aqua dest.	Aqua destillata
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated protein</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
ATR	<i>ATM and Rad3-related</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
BfS	Bundesamt für Strahlenschutz
BRCA1/2	<i>breast cancer susceptibility gene 1/2</i>
CCD	<i>charge-coupled-device</i>
DAPI	4',6-Diamin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbruch (engl. <i>DNA double-strand break</i> )
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PK <sub>cs</sub>	Katalytische Untereinheit der DNA-PK
EDTA	<i>ethylen-diamin-tetraacetat</i>
EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> )
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G1-Phase	erste <i>gap</i> -Phase des Zellzyklus
G2-Phase	zweite <i>gap</i> -Phase des Zellzyklus
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gy	Gray (Einheit der Strahlungsdosis)
HR	Homologe Rekombination
IR	Ionisierende Strahlung (engl. <i>ionising radiation</i> )
kDa	Kilo Dalton
MDC1	<i>mediator of DNA damage-checkpoint 1</i>
Mre11	<i>meiotic recombination protein 11</i>

MRN-Komplex (M/R/N)	Mre11-Rad50-Nbs1 Komplex
Nbs1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (engl. <i>non homologous end-joining</i> )
nm	Nanometer
OH·	Hydroxylradikal
P	Phosphatrest
P53	<i>protein 53</i>
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PIKKs	Phosphatidyl-inositol-3 Kinase-ähnliche Kinasen
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß, das die Güte von Anpassungskurven/Fit-Funktionen angibt
RFC	<i>replication factor C</i>
ROC	<i>receiver operation characteristic</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTOG	<i>Radiation Therapy Oncology Group</i>
SEM	Standardfehlers des Mittelwertes (engl. <i>standard error of the mean</i> )
Ser	Serin
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SSB	Einzelstrangbruch (engl. <i>single-strand break</i> )
Sv	Sievert (Einheit der Strahlungsdosis)
Thr	Threonin
UV	ultraviolett
WBCs	Weißer Blutzellen (engl. <i>white blood cells</i> )
ZK	Zellkern

## 13 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Ute Rössler und Frau Dr. Maria Gomolka für die Möglichkeit, diese Dissertation unter ihrer Anleitung anfertigen zu können, für die hervorragende fachliche Betreuung und die angenehme Zusammenarbeit. Ihr Engagement und ihre kompetente Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Ulrike Kulka, Herrn Frank Bunk und Frau Ingrid Baumgärtner für die jederzeit gewährte Hilfe und die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Frau Vera Jenei gilt mein Dank für die Einarbeitung und Hilfestellung bei der Arbeit im Zellkulturlabor und darüber hinaus.

Frau Linda Walsh und Herrn Albert Rosenberger danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung SG 1.1 des Bundesamts für Strahlenschutz für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Herrn Prof. Dr. Stangassinger danke ich für die Vertretung dieser Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Stohrer für die Idee zu dieser Dissertation und die Vermittlung des Kontaktes zum BfS, sowie bei Frau Siglinde Hirmer und Frau Karin Begsteiger für ihre Hilfe und Unterstützung am Institut für Tierphysiologie bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich zuletzt meinen wundervollen Eltern und meinen Großeltern für ihren moralischen Beistand, ihre Motivation, ihr Vertrauen in mich und ihre Unterstützung danken. Ohne Euch hätte ich das alles nie geschafft!