

**Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. M. Flentje**

**STRAHLENINDUZIERTE DNA-SCHÄDEN UND DEREN
REPARATUR IN HUMANEN TUMOR- UND
FIBROBLASTENZELLINIEN
DETEKTIERT MITTELS HISTON γ H2AX**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von**

**Hartmut Mahrhofer
aus Waiblingen**

Würzburg, April 2007

Referenten

Referent: Prof. Dr. med. M. Flentje

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. H. Stopper

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. März 2009

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeines zur Strahlentherapie.....	1
1.2	Zelluläre Wirkungen der Strahlentherapie	2
1.3	Prädiktive Testverfahren der Strahlensensibilität.....	3
1.3.1	Der Koloniebildungstest.....	4
1.3.2	Detektionsverfahren von DNA-Doppelstrangbrüchen	5
1.4	Klinische Hintergrundinformationen zu den Zelllinien.....	10
1.5	Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Zelllinien	14
2.2	Materialien.....	16
2.3	Geräte und Software	18
2.4	Zellkultivierung	18
2.5	Versuchsaufbau des Koloniebildungstests	18
2.6	Versuchsaufbau zur Histon- γ -H2AX-Foci-Anfärbung.....	20
2.7	Statistik.....	21
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Effekte der Bestrahlung auf das Wachstum im Kolonietest.....	22
3.1.1	Plating efficiency der untersuchten Zelllinien.....	22
3.1.2	Überlebensraten der untersuchten Zelllinien.....	23
3.2	Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, untersucht mittels Histon γ H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche.....	27
3.2.1	γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz.....	27
3.2.2	Effekte der applizierten Dosis auf die Bildung und den Verlauf von γ H2AX-Foci	30
3.2.3	Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen unter Verwendung des Histons γ H2AX als Marker	34

3.2.4	Residuelle DNA-Schäden, gemessen mittels Histon γ H2AX nach erfolgter DNA-Reparatur.....	40
3.2.5	Korrelationen zwischen den SF2-Werten des Koloniebildungstests und den auf der γ H2AX-Fluoreszenz basierten Ergebnissen für die Induktion und Reparatur von DNA-DSB	41
4	Diskussion	44
4.1	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	44
4.2	Diskussion der Ergebnisse der Koloniebildungstests.....	44
4.3	Diskussion der Ergebnisse der γ H2AX-Detektion	45
4.3.1	Hintergrundfluoreszenz von γ H2AX.....	46
4.3.2	γ H2AX-Verlauf bei steigenden Bestrahlungsdosen	47
4.3.3	Induktion von γ H2AX nach Bestrahlung	48
4.3.4	Reparatur und Abbau von γ H2AX-Foci	50
4.3.5	Restliche Menge von γ H2AX nach 18 Stunden Reparaturzeit.....	52
4.3.6	Einflüsse der PIKK-Kinasen auf die Induktion und den Verlauf von γ H2AX am Beispiel der Zelllinien MO59J, MO59K und AT	54
5	Zusammenfassung und Ausblick	57
6	Literaturverzeichnis	60

Abkürzungsverzeichnis

γH2AX	Phosphorylierte Form der Histonvariante H2AX
AK	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia-teleangiektasia mutated, eine PIKK-Kinase
ATR	Ataxia-teleangiektasia and Rad3-related, eine PIKK-Kinase
CFGE	Constant field gel electrophoresis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	eine PIKK-Proteinkinase
DSB	Doppelstrangbruch der DNA
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FAR	Fraction of Activity Released
FBS	Foetal Bovine Serum
GFGE	Graded field gel electrophoresis
Gy	Gray (= Energiedosis; $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} \times \text{kg}^{-1}$)
H2AX	Variante des Histons H2A
HR	Homologous Recombination
IRIF	Irradiation induced foci
kbp	Kilobasenpaare der DNA
NHEJ	Non homologous end joining
p53	Tumorsuppressor
PE	Plating Efficiency
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-like kinase
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SF2	Überlebensrate im Koloniebildungstest bei einer Dosis von 2 Gray

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zur Strahlentherapie

Erste therapeutische Erfolge durch den Einsatz von ionisierenden Strahlen wurden bereits 1896 durch Leopold Freund in Wien erzielt. Dieser nutzte die erst kurz zuvor von Wilhelm Conrad Röntgen in Würzburg entdeckte Strahlung zur Behandlung eines Tierfellnävus [Wendt 2001]. Allerdings dauerte es noch lange, bis die neue Therapieform ihren festen Platz in der Therapie benigner Prozesse wie Keloide, arteriovenöser Malformationen oder Ophthalmopathien sowie insbesondere maligner Veränderungen erstreiten konnte. Heute kommt die Strahlentherapie laut internationalen Zahlen bei mehr als jedem zweiten Tumorpatienten zum Einsatz. Sie stellt dabei ein vielseitig einsetzbares Behandlungskonzept in der Tumorthherapie dar und kann hier sowohl neoadjuvant, adjuvant als auch primär kurativ genutzt werden. Eine zunehmende Bedeutung besitzt die Strahlentherapie in der palliativen Behandlung fortgeschrittener Tumorleiden, beispielsweise zur Schmerztherapie, Blutungskontrolle und Tumorkontrolle. Ebenso dient sie der Behandlung onkologischer Notfälle wie tumorbedingten Rückenmarkskompressionen, einem metastasenbedingten Anstieg des intrakraniellen Druckes oder von Vena-cava-Obstruktionen [Ashby 1991].

Die Modalität der Bestrahlung, der Umfang ihres Einsatzes sowie letztendlich der Behandlungserfolg sind dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. So haben neben der Operabilität und dem Allgemeinzustand des Patienten besonders auch die Histologie und das Ansprechen eines Gewebes auf ionisierende Strahlen einen wesentlichen Einfluss auf deren Einsatz und Erfolg. Dies wird deutlich beim Vergleich von bestimmten Hauttumoren, bei denen eine strahlentherapeutische Heilung in annähernd 100% der Fälle erreicht werden kann, und dem Glioblastoma multiforme, welches mit den alleinigen Mitteln der Strahlentherapie nicht kurierbar ist [Suit 2002]. Ebenso variabel stellt sich aber auch die Normalgewebsreaktion nach einer therapeutischen Bestrahlung dar [Bentzen und Overgard, 1994; Turesson et al., 1996]. Während die meisten Patienten die Bestrahlung mit gängigen Bestrahlungsschemata gut tolerieren, entwickeln immerhin 5-10 Prozent von ihnen als sogenannte "over-responders" starke Nebenwirkungen [Begg 2006], beispielsweise in Form von schweren Haut- und Schleimhautreaktionen.

Worin die Ursachen dieser großen Variabilität in der Reaktion auf ionisierende Strahlung liegen, ist letztendlich nicht eindeutig geklärt, sicher multifaktoriell und Thema aktueller Forschung. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang neben den strahleninduzierten DNA-Läsionen unterschiedlichster Art insbesondere auch die mit ihnen verbundenen Reparaturmechanismen. Heutige Bestrebungen, die Strahlenempfindlichkeit eines beliebigen Gewebes oder einer beliebigen Zelllinie zu bestimmen, basieren daher überwiegend auf der Registrierung und Quantifizierung erzeugter DNA-Schäden und deren Reparatur. Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist es bis heute jedoch noch nicht gelungen, einen schnellen und zuverlässigen prädiktiven Test zur Ermittlung der Strahlensensibilität eines Gewebes zu entwickeln, obgleich ein solcher Test unschätzbaren Wert für die individuelle Therapieplanung und Dosisfindung hätte.

1.2 Zelluläre Wirkungen der Strahlentherapie

Der Einsatz ionisierender Strahlen in therapeutischer Absicht hat die Zerstörung des krankhaften Gewebes unter möglicher Schonung des gesunden Nachbargewebes zum Ziel. Der angestrebte Zelltod resultiert dabei aus den erzeugten Schäden in den bestrahlten Zellen. Dabei kann die Strahlung entweder direkt an biologisch wichtigen Molekülen, insbesondere der DNA wirken, oder aber indirekt über Radikalbildung, vorwiegend über die Radiolyse des Wassers unter Bildung von Hydroxidionen und Peroxiden, seine Wirkung entfalten [Ward 1988; Zaider et al., 1994]. Die entscheidende Zielstruktur stellt in jedem Fall die DNA einer Zelle dar. So konnte bereits Munro [1970] an Hamsterfibroblasten zeigen, dass der Zellkern wesentlich für die Effekte einer Bestrahlung im Vergleich zum Zytosol ist. Die DNA kann dabei verschiedene Läsionsformen aufweisen. Zu den wichtigsten strahleninduzierten Schäden gehören Basenschäden, DNA-Einzelstrangbrüche, DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), Quervernetzungen der DNA, Verbindungen zwischen der DNA und Proteinen sowie Denaturierungen. Die induzierten DNA-Doppelstrangbrüche stellen im Vergleich zu den anderen erwähnten Schäden die vital bedrohlichsten Läsionen des Genoms dar [Frankenberg et al., 1981; Ward 1988] und sind Hauptursache strahleninduzierter Chromosomenaberrationen [Morgan et al., 1998].

Durch jedes Gray (Energiedosis, $1 \text{ Gray} = 1 \text{ Joule} \times \text{kg}^{-1}$) wird statistisch gesehen ein Doppelstrangbruch pro $0,2 \times 10^9$ Basenpaare DNA erzeugt [Cedervall et al., 1995].

Bei einer humanen Zelle mit $6-12 \times 10^9$ Basenpaaren bedeutet dies, dass 30 bis 60 DNA-Doppelstrangbrüche pro Gray entstehen. Gelingt es der Zelle, diese und andere entstandene Schäden effektiv zu reparieren, so kann sie dem Zelltod entgehen. Ist sie dazu nicht oder nicht ausreichend in der Lage, so resultieren Zellzyklusarrest, Apoptose oder Entartung [Vamvakas et al., 1997; Olive et al., 1998; Rich et al., 2000; Hoeijmakers 2001]. Reparaturmechanismen der DNA haben somit einen wesentlichen Einfluss auf die Wirkung bzw. auf das Überleben einer Zelle im Anschluss an die Bestrahlung. Man unterscheidet zwei Hauptreparaturformen von DNA-Doppelstrangbrüchen - das NHEJ (non-homologous-end-joining) und die HR (homologous recombination). Während die HR eine sehr exakte Reparatur unter Verwendung von homologer DNA z.B. in Form von Schwesterchromatiden ermöglicht, geht die weitaus weniger exakte Reparatur des NHEJ ohne Verwendung homologer DNA-Abschnitte einher. Welcher dieser beiden Mechanismen zum Einsatz kommt, ist dabei vor allem von der Zellzyklusphase abhängig. Der genaue Ablauf dieser Reparaturwege stellt einen komplizierten, nur unvollständig verstandenen Prozess dar, an dem zahlreiche Faktoren wie p53, ATM und DNA-PK beteiligt sind [Kanaar et al., 1998; Hoeijmakers 2001; Bassing und Alt, 2004; Peterson und Côté, 2004].

1.3 Prädiktive Testverfahren der Strahlensensibilität

In diesem Kapitel sollen einige Methoden zur Bestimmung von DNA-DSB sowie der Koloniebildungstest als momentan geltender „Goldstandard“ zur Ermittlung der Strahlensensibilität und beliebter Vergleichstest für modernere Testverfahren kurz vorgestellt werden.

Bestrebungen, die Strahlensensibilität einer Zelllinie anhand der Quantifizierung von DNA-Schäden vorhersagen zu können, gibt es schon längere Zeit. Neben der Detektion von Mikrokernen, DNA-Einzelstrangbrüchen oder Chromosomenaberrationen unter Einsatz verschiedenster Methoden, kommt der Betrachtung von DNA-DSB aufgrund ihrer deletären Folgen ein besonderer Stellenwert zu. Durch die Detektion und Quantifizierung von DNA-DSB verspricht man sich letztendlich ein besseres Verständnis über die Wirkung von ionisierender Strahlung, ein Kontrollinstrument für den Effekt modulierender Chemotherapeutika (sog. Radiosensitizer) sowie vor allem eine Voraussage der Effektivität von ionisierender Strahlung [McMillan et al., 2001].

Bis heute kann jedoch auf Grund der Vielzahl gefundener, sich teilweise widersprechender Ergebnisse keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, durch welchen der häufig bestimmten Parameter "Induktion", "Reparatur" oder "Residuen" von DNA-DSB die Strahlensensibilität einer Zelllinie am besten vorhergesagt werden kann. Während einige Arbeiten einen potentiellen Prädiktionwert in der Induktion oder der direkt nach einer Bestrahlung auftretenden Menge von DNA-DSB zeigten [Radford et al., 1986; Kelland et al., 1988; McMillan et al., 1990; Ruiz de Almodovar et al., 1994; El-Awady et al., 2003], wurde von anderen Arbeitsgruppen in den residuellen, also den nach einer bestimmten Reparaturzeit verbleibenden DNA-DSB, am ehesten ein Prädiktor für die Strahlensensibilität der betrachteten Zelllinien gesehen [Wurm et al., 1994; Kiltie et al., 1997; Zhou et al., 1998; Dikomey et al., 1998, 2000; Banáth et al., 2004; Klovov et al., 2006]. In weiteren Veröffentlichungen wurde ein Vorhersagewert anhand der Reparaturdauer von DNA-DSB erkannt [Schwartz et al., 1988; Zaffaroni et al., 1994]. In einer Arbeit von Olive et al. [1994] wiederum wurde weder für die induzierten noch für die residuellen DNA-DSB eine Vorhersagekraft für die Sensibilität einer Zelllinie gegenüber ionisierender Strahlung gefunden. Als Ursachen für diese sehr unterschiedlichen Resultate kommen neben den verwendeten Zelllinien mit andersartigen Chromatinstrukturen auch die angewandten Detektionsverfahren für DNA-Schäden in Frage. Darauf haben bereits Woudstra et al. [1996] hingewiesen, die unter Verwendung derselben Zelllinien, aber unterschiedlicher Assays, ebenfalls zu widersprüchlichen Resultaten gelangten. Aber auch der oftmals als Vergleichstest herangezogene Koloniebildungstest kann als mögliche Ursache für die ungleichen Ergebnisse betrachtet werden.

1.3.1 Der Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest wurde bereits in den Fünfzigerjahren des 20. Jahrhunderts von Puck und Markus [1956] entwickelt und anschließend weiter modifiziert. Dieses Verfahren misst zum einen die Fähigkeit einer unbestrahlten Testzelllinie auf einem entsprechenden Kulturmedium anzuwachsen. Dies kommt über die Plating efficiency (PE) zum Ausdruck. Zum anderen misst der Koloniebildungstest die Fähigkeit einer Testzelllinie nach Kontakt zu einer Noxe wie ionisierende Strahlung zu überleben. Dies spiegelt sich im SF2-Wert (surviving fraction bei 2 Gy) wider. Für den SF2-Wert

konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass er mit der in-vivo-Strahlensensibilität, gemessen zum Beispiel anhand der späten [Gears et al., 1993; Alsbeih et al., 2000] oder frühen [Burnet et al., 1992] Hautreaktionen bestrahlter Patienten korreliert. Andere Arbeiten konnten hingegen keine deutliche Korrelation zwischen der frühen [Begg et al., 1993] oder späten [Oppitz et al., 2001] Hautreaktion und den SF2-Werten erkennen. Trotz dieser Widersprüche wird der Koloniebildungstest heute als Goldstandard zur Vorhersage der Strahlensensibilität einer Zelllinie angesehen und die SF2-Werte werden häufig als Vergleichswerte für neuere prädiktive Verfahren zur Bestimmung der Strahlensensibilität herangezogen. Ein großer Nachteil des Koloniebildungstests ist neben der großen Menge an benötigten Testzellen seine lange Kulturdauer von 2-4 Wochen. Ferner sind nicht alle Zelllinien kultivierbar. Aus diesen Gründen kommt der Koloniebildungstest nicht als Standardverfahren in der Routinediagnostik zum Einsatz. Ebenfalls unbefriedigend ist die mangelnde Aussage dieses Tests über die Ursachen einer erhöhten oder auch verminderten Überlebensrate. Molekularbiologische Aspekte können allenfalls indirekt mit Hilfe dieses Tests erfasst werden. Er eignet sich folglich eher als globaler Überlebensstest einer kultivierbaren Zelllinie unter dem Einfluss einer angesetzten Noxe.

1.3.2 Detektionsverfahren von DNA-Doppelstrangbrüchen

Zur Detektion von DNA-DSB sind im Laufe der Zeit immer sensitivere Verfahrenswegen entwickelt worden. Dadurch ist man dem Ziel einer individuellen Verlaufskontrolle entstandener DNA-DSB einer Zelllinie immer näher gerückt. Im Folgenden soll ein Überblick über Detektionsverfahren von DNA-Schäden und insbesondere von DNA-DSB und deren Charakteristika gegeben werden. Dabei sollen die Sucrose-Dichte-Gradienten-Sedimentation, die Filterelution, gelelektrophoretische Verfahren und die Detektion des Histons γ H2AX näher vorgestellt werden.

a) Bei der **Sucrose-Dichte-Gradienten-Sedimentation** handelt es sich um ein sehr frühes Verfahren zur Quantifizierung von DNA-Schäden [Lett et al., 1967]. Bei diesem Verfahren werden entstandene DNA-Bruchstücke in einer Zentrifuge anhand ihrer Dichte aufgetrennt. Diese Methode ist für Dosisbereiche zwischen 5 und 150 Gray anwendbar [Blöcher und Pohlitz, 1982], für gut reproduzierbare Ergebnisse sind jedoch Bestrahlungsdosen von über 200 Gray anzusetzen. Aufgrund der großen Zahl benötigter

Zellen, einer geringen Sensitivität sowie einer hohen Störanfälligkeit dieser Methode durch Scherkräfte, ist sie weitgehend zugunsten neuerer Verfahren verlassen worden.

b) Ein weiteres Verfahren zur Detektion von DNA-Strangbrüchen, die **Filterelution**, wurde von Kohn und Grimek-Ewig [1973] entwickelt. Bei dieser Methode werden die DNA-Bruchstücke in Abhängigkeit von ihrer Größe mit Hilfe eines Mikrofilters getrennt. Letztendlich kann auf der Grundlage der DNA-Fragmentgröße auf die Anzahl der DNA-Schäden geschlossen werden. Bei neutralem pH-Wert können damit selektiv DNA-Doppelstrangbrüche erkannt werden [Bradley und Kohn, 1979]. Obwohl dieses Verfahren sensitiver, kostengünstiger und schneller als die Sedimentation ist, liegt die benötigte Bestrahlungsdosis noch immer weit über dem klinisch verwendeten Bereich von 2 Gray. Zudem sind bei diesem Verfahren weiterhin sehr viele Testzellen nötig.

c) **Gelelektrophoretische** Verfahren wie beispielsweise die Konstantfeldgelelektrophorese (CFGE) oder die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) waren ein weiterer Meilenstein bei der Entwicklung von Detektionsverfahren von DNA-DSB. Diese Methoden machen sich vor allem die massenabhängige Wanderungsgeschwindigkeit entstandener DNA-Fragmente im elektrischen Feld zunutze. Während bei konstantem elektrischen Feld eine Auftrennung entstandener DNA-Fragmente nur bis zu 30-50 kbp möglich ist, kann die von Schwartz und Cantor [1984] etablierte PFGE infolge eines rasch wechselnden elektrischen Feldes auch größere DNA-Fragmente von bis zu mehreren Megabasenpaaren auftrennen, was mit einer höheren Sensitivität dieses Verfahrens gleichgesetzt werden kann. Dennoch werden für gewöhnlich auch bei der PFGE verhältnismäßig hohe Dosen von über 20 Gray angesetzt [Rothkamm und Löbrich, 2002]. Die Quantifizierung der DNA-DSB erfolgt häufig durch Bestimmung des sog. FAR-Wertes (Fraction of Activity Released). Dabei wird beispielsweise die Aktivität der gewanderten, radioaktiv markierten DNA-Bruchstücke einer Reparaturprobe, bei der ein Teil der DNA-Schäden bereits beseitigt werden konnte, ins Verhältnis zur Gesamtaktivität einer Induktionsprobe (Probe ohne Möglichkeit zur DNA-Reparatur) gesetzt. Der FAR-Wert repräsentiert das durchschnittliche molekulare Gewicht strahleninduzierter Fragmente. Er registriert dabei alle DNA-Doppelstrangbruchreparaturen, unabhängig von der Reparaturqualität [Löbrich 1998].

d) Die Einzelzellgelelektrophorese, auch als **Comet-Assay** bezeichnet, wurde bereits 1984 von Östling und Johanson [1984] etabliert. Singh et al. [1988] verbesserten durch die Entwicklung des alkalischen Comet-Assays die Sensitivität dieses Verfahrens und weiteten sein Einsatzgebiet auf die Möglichkeit der Detektion von DNA-Einzelstrangbrüchen aus. Auch der Comet-Assay basiert auf elektrophoretischer Grundlage. Anders als bei den bisher geschilderten Detektionsmethoden PFGE und CFGE, wird mit seiner Hilfe der DNA-Schaden aber fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen und quantifiziert. Die Detektion erfolgt dabei nicht für alle untersuchten Zellen gleichzeitig, sondern für jede Zelle einzeln. Dabei wird im Prinzip die Länge und Intensität eines elektrophoretisch erzeugten Schweifes aus DNA-Bruchstücken gemessen, die das Ausmaß des Schadens widerspiegeln. Mit diesem Verfahren kann der Verlauf der DNA-Schäden wesentlich sensitiver erfasst werden als mit den bisher vorgestellten Methoden. Der Einsatz des Comet-Assays ist bis zu einem Dosisbereich von weit unter 1 Gray möglich [Singh et al., 1991]. Ein weiterer Vorteil besteht in der Selektion und Betrachtung von Einzelzellen, daher ist die Zahl benötigter Versuchszellen bei diesem Verfahren vergleichsweise gering. Bisherige Arbeiten unterstreichen das Potential des Comet-Assays zur Beurteilung der Genotoxizität von endogenen [Stopper et al., 2001; 2003] als auch von exogenen Noxen wie beispielsweise ionisierende Strahlung [Djuzenova et al., 1999]. Einigen Autoren ist es mit Hilfe des Comet-Assays gelungen, die Strahlensensibilität der untersuchten Zelllinien vorherzusagen [Bauch et al., 1999; Djuzenova et al. 1999]. Weiterhin wurden Korrelationen zwischen den SF2-Werten des Koloniebildungstests und der Länge des Kometenschweifes gefunden [McKelvey-Martin et al., 1998]. Oppitz et al. [2002] konnten eine direkte Korrelation zwischen den mittels Cometentechnik ermittelten DNA-Schäden bei Lymphozyten und den akuten klinischen Strahlenreaktionen erkennen.

e) Das momentan sensitivste Detektionsverfahren von DNA-Doppelstrangbrüchen stellt der Nachweis des **Histons γ H2AX** dar. Im Gegensatz zu den bisher aufgezeigten Verfahren wird dabei nicht die DNA selbst als Messparameter herangezogen, sondern das reparaturassoziierte Histon γ H2AX. Dieses Histon wurde im Jahr 1980 erstmals von West und Bonner als Variante des Histons H2A dargestellt [West und Bonner, 1980]. Bei Säugerzellen liegt sein Anteil am H2A im Allgemeinen zwischen 2 und 25% [Rogakou et al., 1998]. Das Histon H2AX besitzt eine für seine Funktion äußerst

wichtige und charakteristische Aminosäuresequenz (Ser-Gln-Gln-Tyr), die auch als SQ-Motif bezeichnet wird [Mannironi et al., 1989]. Über dieses Motif bzw. seine Modifikation kann die Aktivität des Histons H2AX gesteuert werden. So kommt es im Rahmen seiner Aktivierung zu einer durch sogenannte PIKK-Kinasen katalysierten Phosphorylierung des hier gelegenen Serin-Restes, Ser139 in humanen Zelllinien [Rogakou et al., 1998]. Das phosphorylierte Histon wird in der Literatur auch als γ H2AX bezeichnet. Die Bedeutung des Histons γ H2AX im Zusammenhang mit Doppelstrangbrüchen der DNA wurde erstmals von Rogakou und seinen Mitarbeitern [1998] erkannt. Dabei konnte mittels der Gelelektrophorese gezeigt werden, dass die Fraktion von phosphoryliertem γ H2AX nach Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahlten Zellen zunimmt [Rogakou et al., 1998]. Die Gesamtmenge an γ H2AX verhielt sich dabei proportional zur verwendeten Strahlendosis. Pro Gray bzw. pro in etwa 30-60 statistisch erfolgenden DNA-DSB wurde dabei eine Phosphorylierung von 1% des vorhandenen H2AX gefunden, was in etwa 0,03% des H2AX pro DNA-DSB entspricht [Rogakou et al., 1998]. Ebenfalls waren es Rogakou et al. [1998] die zeigen konnten, dass γ H2AX spezifisch als Antwort auf DNA-DSB erscheint und nicht etwa infolge von DNA-Einzelstrangbrüchen gebildet wird. Allerdings verdichten sich zunehmend die Hinweise, dass γ H2AX auch unabhängig von DNA-DSB auftreten kann [McManus et al., 2005; Han et al., 2006; Suzuki et al., 2006].

Obgleich H2AX normalerweise gleichmäßig im Zellkern verteilt zu sein scheint, kommt es im Anschluss an einen DNA-DSB zur Konzentrierung des γ H2AX am Ort der DNA-Läsion [Rogakou et al., 1999]. Das phosphorylierte Protein flankiert dabei große Bereiche des Chromatins in der Umgebung des DNA-DSB und bildet hier fluoreszenzmikroskopisch nachweisbare Foci oder IRIF (irradiation induced foci) [Rogakou et al., 1999]. Solche Ansammlungen von γ H2AX können bereits wenige Minuten nach dem entstandenen Schaden nachgewiesen werden und erreichen nach etwa 10-30 Minuten ihr Maximum [Redon et al., 2002]. Der Bereich, den diese Foci flankieren, umfasst in etwa 2 Megabasen an DNA [Rogakou et al., 1999]. Zunächst wurde γ H2AX als essentiell für die Rekrutierung der assoziierten Reparaturproteine an den Läsionsort angesehen. Jedoch wurde von Celeste et al. [2003] dargestellt, dass Zelllinien auch ohne H2AX nach Induktion eines DNA-DSB entsprechende Reparaturfaktoren im Bereich

des DNA-Bruches aufweisen können. Im Gegensatz zu Zelllinien die H2AX exprimieren konnten, bildeten die H2AX-defekten Mutanten allerdings keine IRIF aus. Das Histon γ H2AX scheint folglich vielmehr die Rekrutierung von Reparaturfaktoren an den Ort des DNA-DSB zu beschleunigen als ihn selbst zu initiieren. Es scheint essentiell für eine persistierende Ansammlung der Reparaturkomplexe und die Bildung von Foci zu sein [Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002; Celeste et al., 2003].

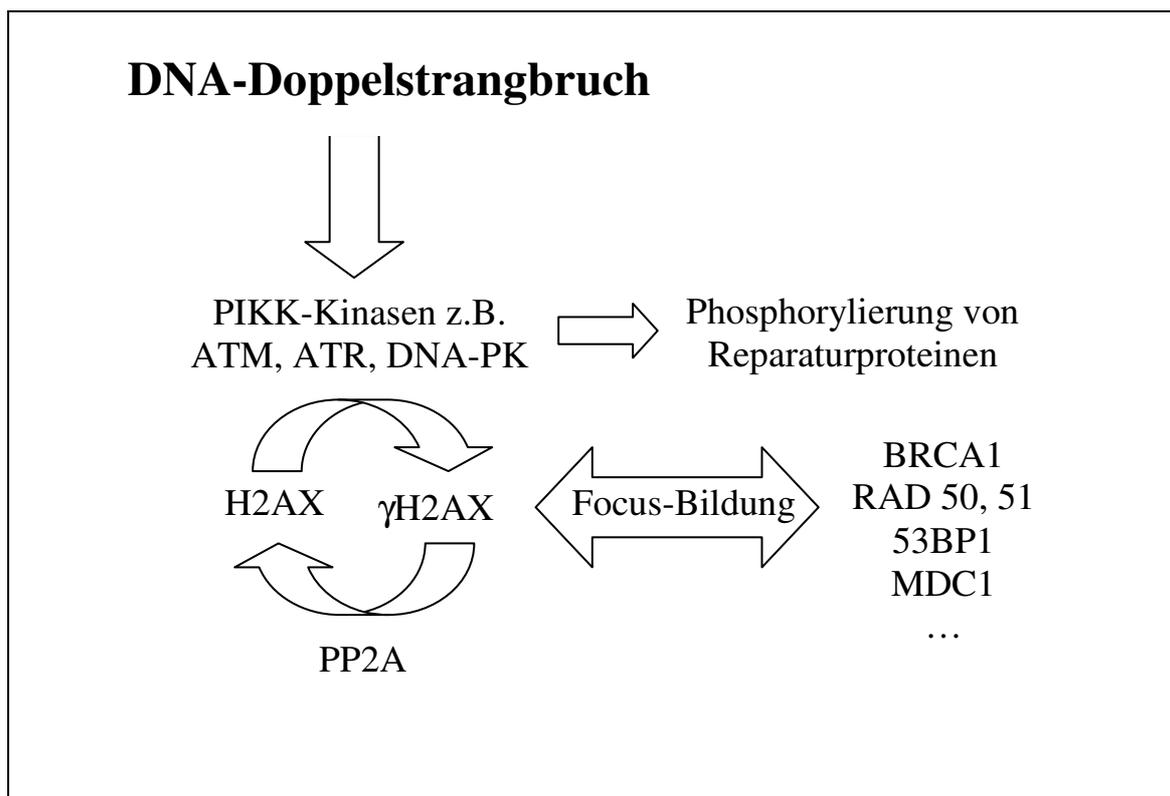


Abbildung 1.1 : Vereinfachte Darstellung der Aktivierung und Deaktivierung von H2AX. Ein DNA-Doppelstrangbruch führt über die Aktivierung von PIKK-Kinasen zur Phosphorylierung zahlreicher Proteine, darunter auch des Histons H2AX. Das phosphorylierte Histon, auch als γ H2AX bezeichnet, unterstützt die Rekrutierung zahlreicher Reparaturfaktoren und ist für die Focus-Bildung bei vielen dieser Faktoren essentiell. Die Dephosphorylierung von γ H2AX erfolgt schließlich durch die Dephosphorylase PP2A, nachdem eine Dissoziation von der DNA erfolgt ist.

Durch die Erkenntnis, dass jeder γ H2AX-Focus genau einem DNA-DSB entspricht, konnte nun mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen γ H2AX und über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der 0,1 bis 0,2 μ m großen, fluoreszierenden γ H2AX-Foci eine Quantifizierung der entstandenen DNA-DSB erfolgen [Rogakou et al., 1999;

Sedelnikova et al., 2002]. Der Nachweis von DNA-DSB ist mit dieser Methode bis zu einigen hundertstel Gray möglich [MacPhail et al., 2003a]. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen dabei in der geringen Zahl benötigter Versuchszellen, in der guten Quantifizierbarkeit von DNA-DSB für jede einzelne Zelle und der problemlosen sowie schnellen Durchführbarkeit des Verfahrens selbst.

Die Quantifizierung der entstandenen γ H2AX-Foci kann durch Auszählen [Taneja et al., 2004], durch die FACS-Analyse [Olive et al., 2003; Banáth et al., 2004] oder die Messung der Fluoreszenzintensitäten von Einzelbildern [MacPhail et al., 2003a; Mahrhofer et al., 2006; Mirzayans et al., 2006] erfolgen. Darüber hinaus kann eine Quantifizierung von γ H2AX auch mittels elektrophoretischer Verfahren durchgeführt werden [Paull et al., 2000; Taneja et al., 2004]. Mit Hilfe dieser Methoden wurde versucht, den Marker γ H2AX nach Einwirkung verschiedener Noxen auf die Versuchszellen zu verfolgen. Bis heute ist jedoch nur relativ wenig darüber bekannt, welcher Bezug zwischen γ H2AX und dem Reparaturerefolg und seiner Genauigkeit als auch der Strahlensensibilität besteht.

1.4 Klinische Hintergrundinformationen zu den Zelllinien

Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien werden in diesem Abschnitt vor allem aus klinischer sowie strahlentherapeutischer Sicht kurz vorgestellt :

Zwei der hier verwendeten Zelllinien (HFIB1, HFIB2) waren **normale Hautfibroblasten**. Sie dienten als Referenzzelllinien.

Eine weitere untersuchte Zelllinie stellten Ataxia-teleangiektasia-Fibroblasten dar. Bei der **Ataxia teleangiektasia** (AT) handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Die Symptome entwickeln sich bereits in der frühen Kindheit. Dabei leiden die Erkrankten unter einer progressiven zerebellären Ataxie, Dysarthrie, okulokutanen Teleangiektasien sowie Immundefekten; das Risiko einer Entartung als auch die Strahlensensibilität sind erhöht [Chun und Gatti, 2004]. Der Krankheit liegt eine Mutation des AT-Gens zugrunde [Savitzky et al., 1995], was wiederum zu einem Defekt der PIKK-Kinase ATM führt. Da dieses Enzym maßgeblich bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist [Helt et al., 2005], werden AT-Zellen

häufig dazu verwendet, um den Zusammenhang zwischen der DNA-Reparatur einerseits und der Strahlensensibilität auf der anderen Seite zu untersuchen.

In Abhängigkeit von der Stärke der frühen und späten strahleninduzierten Effekte an Geweben der Haut, Augen, Drüsen, Lunge, ZNS, usw., können diese Reaktionen nach der Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) in die Grade 0 bis 4 eingeteilt werden [Cox et al., 1995]. Die hier verwendeten Hautfibroblasten HS5 und HS8 hatten nach RTOG den Grad 2-3 (**HS5**; deutliches Erythem, feuchte Schuppung, großflächige, feuchte Epitheliolyse) bzw. den RTOG-Grad 3-4 (**HS8**; großflächige, feuchte Epitheliolyse, Ulcerationen, Hämorrhagie, Nekrose).

Beim **Fibrosarkom** (HT1080) handelt es sich um ein Weichteiltumor mesodermaler Herkunft. Es ist ein eher seltener Bindegewebstumor, der primär in der Regel operativ therapiert wird. Die Strahlentherapie kommt vor allem adjuvant zur Reduktion des Lokalrezidivrisikos zum Einsatz. Bei sehr großen Tumoren kann jedoch auch eine neoadjuvante Bestrahlung erwogen werden [Suit und Spiro, 1994].

Das **Glioblastom** gehört zur Gruppe der Gliome. Dieser Gehirntumor tritt vor allem in fortgeschrittenem Alter auf und stellt den häufigsten primären Gehirntumor älterer Patienten dar. Das mittlere Überleben bei Diagnosestellung beträgt trotz Therapie in der Regel weniger als 12 Monate. Die Therapie besteht, sofern möglich, in der operativen Entfernung des Tumors, gefolgt von einer adjuvanten Strahlentherapie mit 60 Gray Gesamtdosis. Dadurch erfolgt eine lokale Tumorkontrolle und eine Verbesserung des Gesamtüberlebens [Schratter-Sehn 2006]. Das größte Problem stellt jedoch die hohe Rezidivrate dieses Tumors dar, wobei auch zur Rezidivbehandlung die Strahlentherapie eine hohe therapeutische Relevanz besitzt. Die Besonderheit der hier verwendeten Zelllinien MO59J und MO59K lag darin, dass diese isogen, aber unterschiedlich strahlensensibel waren [Allalunis-Turner et al., 1995]. MO59J hatte einen Defekt der PIKK-Kinase DNA-PK und eine eingeschränkte ATM-Aktivität [Chan et al., 1998; Tsuchida et al., 2002], MO59K hingegen nicht.

Die Inzidenz des **Malignen Melanoms** (Colo800) als primärem Hauttumor, der von melanozytären Zellen ausgeht, steigt weltweit durch die zunehmende UV-Belastung weiter an. Ungefähr 90% der hauttumorbedingten Todesfälle werden durch Melanome verursacht. Sofern eine operative Entfernung möglich ist, stellt die Exzision in der

Regel die Therapie der Wahl dar. Eine Chemo- und Strahlentherapie kommt nur bei weniger als 5% der Fälle zum Einsatz. Domänen der Chemo- und Strahlentherapie sind eine Inoperabilität oder Metastasierung sowie die Unmöglichkeit einer R0-Resektion [Pöllinger et al., 2000]. In bestimmten Fällen (Lentigo Maligna im Gesichtsbereich) kann nach den aktuell geltenden Leitlinien auch eine alleinige Strahlentherapie zum Einsatz kommen.

Das **Adenokarzinom** der Brust (MCF7) stellt den häufigsten Tumor der Frau dar. Während noch vor wenigen Jahrzehnten die totale Mastektomie im Zentrum des therapeutischen Vorgehens stand, ist nach den heute geltenden Leitlinien die brusterhaltende Therapie, bestehend aus der operativen Entfernung des Tumorgewebes samt Lymphabflussgebiet, gefolgt von einer obligaten adjuvanten Strahlentherapie bei 80% der Patienten die Therapie der Wahl. Die adjuvante Strahlentherapie kann dabei die Rezidivrate von 30-40% auf 5-10% verringern [Dalberg et al., 1997]. Neben dieser Option kann die Strahlentherapie jedoch auch palliativ im Sinne einer primären Radiochemotherapie zum Einsatz kommen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bis heute wird noch nicht ausreichend verstanden, warum verschiedene Zelllinien und Gewebe sehr unterschiedlich auf ionisierende Strahlung reagieren können. Ebenso ist noch nicht bekannt, welche Rolle die Dignität einer Zelllinie in Hinblick auf ihre Strahlensensibilität spielt. Zur Klärung dieser Zusammenhänge sind in den letzten Jahrzehnten zunehmend strahleninduzierte DNA-Schäden und darunter besonders die dabei induzierten DNA-Doppelstrangbrüche in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gelangt. Bis heute wurden zahlreiche Detektionsmethoden zur Erfassung dieser potentiell letalen DNA-Läsionen entwickelt. Anhand der Parameter "Induktion", "Reparatur" sowie "Reste" von DNA-Schäden wird versucht, die Strahlenempfindlichkeit eines Gewebes oder einer Zelllinie in vitro zu bestimmen. Letztendlich verfolgt man damit das Ziel, eines Tages einen prädiktiven Test zur besseren bzw. individuelleren Planung einer Bestrahlung nutzen zu können.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag bei der Suche nach einem verlässlichen prädiktiven Test zur Bestimmung der Strahlensensitivität bei einer beliebigen Zelllinie

leisten. Anhand der Kinetik des Histons γ H2AX, einem Surrogatmarker für DNA-DSB, soll zum einen untersucht werden, welche Stellung die Induktion, der Verlauf sowie die restliche Menge dieses Markers nach erfolgter DNA-Reparatur in Hinblick auf die Strahlensensibilität sowie Dignität einer Zelllinie besitzt. Diesem Aspekt kommt die Verwendung von äußerst unterschiedlich strahlensensiblen Zelllinien zugute. Ebenso soll der Einfluss der PIKK-Kinasen ATM und DNA-PK auf den Verlauf des Markers γ H2AX untersucht werden, was durch die Einbindung der PIKK-defizienten Zelllinien AT und MO59J geschieht. Letztendlich lag ein weiteres Ziel darin, den Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Koloniebildungstests einerseits und denjenigen der γ H2AX-Foci-Detektion andererseits zu ergründen.

Zusammenfassend beschäftigt sich diese Arbeit mit folgenden Fragen :

1. Welche Unterschiede gibt es hinsichtlich der Induktion, dem Abbau oder den nach der DNA-Reparatur verbliebenen Resten von γ H2AX-Foci beim Vergleich unterschiedlicher Zelllinien ?
2. Kann anhand der Induktion, dem Abbau oder den nach der DNA-Reparatur verbliebenen Resten von γ H2AX-Foci eine Aussage über die Strahlensensibilität einer Zelllinie getroffen werden ?
3. Gibt es Unterschiede hinsichtlich der Induktion, dem Abbau oder der restlichen Menge von γ H2AX-Foci beim Vergleich von malignen und benignen Zelllinien ?
4. Welchen Einfluss besitzen PIKK-Kinasen auf die Induktion und den Abbau von γ H2AX-Foci ?
5. Gibt es Korrelationen zwischen den SF2-Werten des Koloniebildungstests und den γ H2AX-Verlaufsparametern ?

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden 10 verschiedene Zelllinien verwendet (Tabelle 2.1). Dabei handelt es sich einerseits um Tumorzelllinien (Colo800, HT1080, MCF7, MO59K, MO59J) und andererseits um Fibroblastenzelllinien ohne bekannte maligne Veränderungen (AT, HFIB1, HFIB2, HS5, HS8).

Tabelle 2.1: Übersicht zu den verwendeten Zelllinien.

	Linie	Beschreibung	n ¹⁾	Charakteristika der Zelllinie
benigne Zelllinien	AT	Hautfibroblast	1	mit einer bekannten Mutation des AT-Gens
	HFIB1	Hautfibroblast	1	von einer gesunden Probandin, 41 Jahre alt
	HFIB2	Hautfibroblast	1	von einer gesunden Probandin, 32 Jahre alt
	HS5	Hautfibroblast	1	von einer Brustkrebspatientin mit überdurchschnittlich starker Hautreaktion nach einer Bestrahlung (RTOG-Grad 2-3)
	HS8	Hautfibroblast	1	von einer Brustkrebspatientin mit überdurchschnittlich starker Hautreaktion nach einer Bestrahlung (RTOG-Grad 3-4)
maligne Zelllinien	Colo800	Melanom	1.3	Hypotriploider Chromosomensatz
	HT1080	Fibrosarkom	1	-
	MCF7	Adenokarzinom der Brust	1.8	Zustand nach Radiochemotherapie, hypotetraploider Chromosomensatz
	MO59J	Glioblastom	1.5	MO59J ist laut ATCC dreißig mal sensibler
	MO59K	Glioblastom	1.3	gegenüber einer Bestrahlung als MO59K

¹⁾ Ploidiegrad in Bezug zum diploiden ($n = 1$) Chromosomensatz. Die angegebenen Ploidiegrade wurden anhand der Angaben der Bezugsquelle zum Chromosomensatz der einzelnen Zelllinien berechnet.

Die Zelllinien HFIB1 und HFIB2 wurden von der Cell-Lining GmbH, Berlin erworben. Die Linie MCF7 sowie Colo800 stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Abteilung Menschliche und Tierische Zellkulturen in

Braunschweig. Die Fibrosarkomlinie HT1080 sowie die Glioblastomzelllinien MO59K und MO59J wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) erworben. Die Fibroblastenlinien HS5 und HS8 sowie AT, eine Linie mit einer Mutation des AT-Gens, wurden an der Universität Würzburg etabliert und uns freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. U. Oppitz (Klinik für Strahlentherapie) bzw. Prof. Dr. D. Schindler (Institut für Humangenetik) zur Verfügung gestellt. Für die Experimente wurden ausschließlich Zelllinien der Passagen 3 bis 12 verwendet.

HFIB1 und **HFIB2** stammen von gesunden Probandinnen im Alter von 41 bzw. 32 Jahren. Beide Linien besitzen einen diploiden Chromosomensatz.

HS5 und **HS8** wurden beide als Fibroblastenzelllinien aus Hautbiopsien von Patientinnen mit einem Mammakarzinom angezüchtet. Die Patientinnen wurden in der Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg bestrahlt und zeigten daraufhin außergewöhnlich starke Hautreaktionen. Dabei beträgt bei HS5 der RTOG-Grad 2-3 (deutliches Erythem, feuchte Schuppung, großflächige, feuchte Epitheliolyse), HS8 hat den RTOG-Grad 3-4 (großflächige, feuchte Epitheliolyse, Ulzerationen, Hämorrhagie, Nekrose). Beide Linien besitzen einen diploiden Chromosomensatz.

Die Linie **AT** (Ataxia teleangiectasia), eine Zelllinie mit diploidem Chromosomensatz, hat durch eine Mutation des AT-Gens eine defekte ATM-Kinase mit resultierendem DNA-Reparaturdefekt.

Bei **Colo800** handelt es sich um eine humane Melanomzelllinie, die 1990 aus einem Subkutanknoten eines 14-jährigen Jungen isoliert wurde. Die Zellen sind hypotriploid mit hypertriploidem und 8% polyploidem Anteil.

Die Zelllinie **HT1080** wurde aus azetabulumnahem Gewebe eines 35-jährigen Mannes mit einem Fibrosarkom isoliert. Diese Zelllinie hat einen diploiden Chromosomensatz..

Das humane Adenokarzinom der Brust, **MCF7**, wurde aus einer 69-jährigen Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom nach Radio- und Chemotherapie isoliert. Die Zellen sind östrogenrezeptorpositiv und weisen einen hypotetraploiden Chromosomensatz mit 8% polyploiden Anteilen auf.

Bei den Glioblastomzelllinien **MO59K** und **MO59J** handelt es sich um zwei isogene Linien, die aus einem 33 Jahre alten Mann mit Glioblastoma multiforme ohne

vorhergehender Therapie isoliert wurden. Bei der Zelllinie MO59J liegt ein Defekt der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) vor. Ebenfalls soll die PIKK-Kinase ATM stark eingeschränkt sein [Chan et al., 1998; Tsuchida et al., 2002]. In einer Arbeit von Allalunis-Turner konnte bei MO59J ein in etwa 30 mal geringerer SF2-Wert als bei MO59K erkannt werden [Allalunis-Turner et al., 1995].

2.2 Materialien

Medium für MCF7

RPMI 1640 (R-8758, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

10% Foetal bovine serum (FBS, F-7524, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Streptomycin 100 µg/ml / Penicillin 100 U/ml (P-4333, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

L-Glutamin (1 mmol/l, G-7513, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Natriumpyruvat (1 mmol/l, S-8636, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Nicht-essentielle Aminosäuren (1x, M-7145, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Rinderinsulin (10 µg/ml, I-0516, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Medium für MO59K und MO59J

DMEM mixture F-12 HAM (D-6421, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

10% Foetal bovine serum (FBS, F-7524, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Streptomycin 100 µg/ml / Penicillin 100 U/ml (P-4333, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

L-Glutamin (1 mmol/l, G-7513, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Natriumpyruvat (1 mmol/l, S-8636, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Nicht-essentielle Aminosäuren (1x, M-7145, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Medium für HFIB1, HFIB2, HS5, HS8 und AT

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-6046, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

10% Foetal bovine serum (FBS, F-7524, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Streptomycin 100 µg/ml / Penicillin 100 U/ml (P-4333, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

L-Glutamin (1 mmol/l, G-7513, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Medium für Colo800

RPMI 1640 (R-8758, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

10% Foetal bovine serum (FBS, F-7524, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Streptomycin 100 µg/ml / Penicillin 100 U/ml (P-4333, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

L-Glutamin (1 mmol/l, G-7513, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Medium für HT1080

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-6046, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

10% Foetal bovine serum (FBS, F-7524, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Streptomycin 100 µg/ml / Penicillin 100 U/ml (P-4333, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

L-Glutamin (1 mmol/l, G-7513, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Nicht-essentielle Aminosäuren (1x, M-7145, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

PBS

Dulbecco's phosphate buffered saline

(D-8537, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Triton X-100-Lösung

1%ige Lösung in PBS

(X-100, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Trypsinlösung

Trypsin-EDTA-solution (T-3924, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

0.05% Trypsin und 0.02% EDTA

DAPI-Lösung

0,2 µg/ml DAPI (4'6'-Diamidino-2-Phenylindol) in antifade Lösung (1,5% N-propylgallat, 60% Glycerol in PBS)

Fixativ (Methanol – Essigsäure (3:1))

Kristallviolettlösung (~ 0,6% in H₂O; C-3886, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Primärer Antikörper zur H2AX-Markierung

Upstate; Charlottesville; VA; USA

Anti-phospho-histone H2AX, mouse monoclonal IgG1

Katalog #05-636

1:1000 in 2%iger Lösung von BSA in PBS

Sekundärer Antikörper zur H2AX-Markierung

Molecular probes; Eugene; Oregon; USA

Alexa Fluor[®] 594 goat anti-mouse IgG (H+L)

Katalog #A1105

1:200 in 2%iger Lösung von BSA in PBS

2.3 Geräte und Software

Mikroskop : Leica[®] DMLB Epifluoreszenzmikroskop, Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland.

Kamera : Olympus[®] ColorView 12, Olympus Biosystems, Hamburg, Deutschland.

Software : AnalySIS[®], SoftImaging GmbH, Stuttgart, Deutschland.

Microcal Origin[®], Microcal Software Inc, Northhampton, MA, USA.

Bestrahlung : Primus Linearbeschleuniger, 6 MV Dosisleistung mit einer Dosisrate von 2 Gy/Min, Siemens Medical Solutions, Concord, USA.

2.4 Zellkultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% (MCF7, Colo800, MO59J, MO59K, HT1080) bzw. 9% (HFIB1, HFIB2, HS5, HS8, AT) kultiviert. Je nach Zelllinie wurden dabei verschiedene Kulturmedien verwendet. Für die Versuche wurden nur konfluent gewachsene Zellen verwendet, um eine identische Zellzyklusphase zu gewährleisten. Die Zellen wurden 2 mal die Woche gesplittet (1:4 - 1:6). Die Ablösung der Zellen aus den Kulturflaschen erfolgte mit Trypsin-EDTA, das über 2-5 Minuten auf die Zellen einwirken konnte. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde im Anschluss daran durch Abzentrifugieren und Wiederaufnahme der Zellen in Kulturmedium entfernt.

2.5 Versuchsaufbau des Koloniebildungstests

Die zu untersuchenden Testzellen wurden aus 1-2 Kulturflaschen trypsinisiert, mit Kulturmedium gewaschen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 2 ml Medium aufgenommen. Diese Suspension wurde mit Medium soweit verdünnt, dass eine solche mit 20.000 Zellen pro Milliliter entstand. Aus dieser Lösung wurden jeweils 2-5 ml in sterile Röhrchen pipetiert. Diese Röhrchen wurden mit unterschiedlichen Dosen zwischen 1 und 8 Gray bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis unterschiedlich hohe Zellmengen in die vorher vorbereiteten Petrischalen überführt. Je höher dabei die Dosis war, desto mehr Zellen wurden pipetiert (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Pipettierschema der Koloniebildungstests

Bestrahlungsdosis	Zellzahl
0 Gy	500
1 Gy	1000
2 Gy	1000
3 Gy	5000
5 Gy	10000
7 Gy	15000
8 Gy	20000

Die Petrischalen wurden nun für 2-3 Wochen im Brutschrank belassen und mit Hilfe eines Mikroskopes auf das Vorhandensein von Kolonien getestet. Sobald deutliche Kolonien (>50 Zellen/Kolonie) zu erkennen waren, wurden die Zellproben abgestoppt. Dabei wurde das Kulturmedium entfernt, die Kolonien mittels Fixativlösung fixiert und anschließend mit einer Kristallviolett-Lösung angefärbt.

Die einzelnen Kolonien wurden nun manuell ausgezählt und die Überlebensrate (surviving fraction, SF) bestimmt. Um die Überlebensrate aus der Anzahl der ausgezählten Kolonien zu erhalten, mussten die ermittelten Werte zunächst normiert und logarithmisch dargestellt werden. Aus den erhaltenen Kurvenpunkten wurde anschließend eine Überlebenskurve erstellt. Beispiele hierfür sind in den Abbildungen 3.2 und 3.3 zu sehen. Zur Generierung der Überlebenskurven diente das linear-quadratische Modell, welches durch die Formel $SF = \exp(-\alpha \times D - \beta \times D^2)$ wiedergegeben wird. Dabei stellen α und β zelllinienspezifische Konstanten dar, während D die Bestrahlungsdosis in Gray wiedergibt. Der gerade Kurventeil wird durch den Formelabschnitt $-\alpha \times D$ repräsentiert, während die Kurvenkrümmung durch den Formelteil $-\beta \times D^2$ wiedergegeben wird. Das linear-quadratische Modell wurde für alle Zelllinien in der obigen Form angewandt, für MO59J wurde jedoch aufgrund eines linearen Kurvenverlaufs die adäquate Formelabwandlung $SF = \exp(-\alpha \times D)$ verwendet. Der SF2-Wert wurde aus dem erhaltenen SF-Wert bei 2 Gray ermittelt und diente als Vergleichswert der Strahlensensibilität zwischen verschiedenen Zelllinien. Um die

„Plating efficiency“ (PE) zu ermitteln, wurde die Koloniezahl bei unbestrahlten Proben durch die Zahl der dem Ansatz zugegebenen Zellen dividiert.

2.6 Versuchsaufbau zur Histon- γ H2AX-Foci-Anfärbung

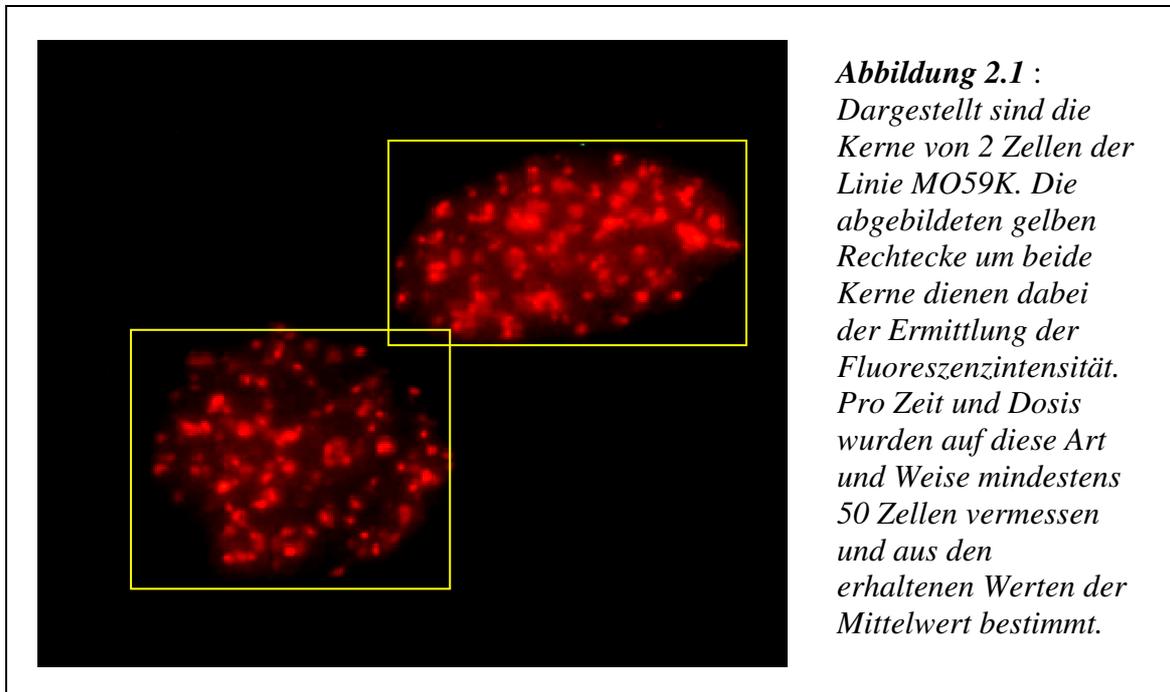
Vor der geplanten Bestrahlung wurden Zellen aus konfluenten Kulturflaschen mittels Trypsin-EDTA abgelöst. Die dadurch gewonnenen Zellen wurden auf in einer Petrischale liegenden Objektträgern über mindestens 24 Stunden angezchtet.

Die Petrischalen samt Objektträgern wurden bei den dosisabhängigen Versuchen mit bis zu 4 Gray, oder, bei den zeitabhängigen Versuchen, mit 2 Gray bestrahlt.

Nach der Bestrahlung wurden die Petrischalen erneut im Brutschrank inkubiert. Die Dauer dieser Inkubation war dabei versuchsabhängig. Bei den Ansätzen die zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung dienten, wurde eine Inkubationszeit von 30 Minuten veranschlagt. Bei den Versuchen zur Ermittlung der Verlaufskinetik von γ H2AX wurden Inkubationszeiten von 5 Minuten, 30 Minuten, 2 Stunden, 8 Stunden und 18 Stunden gewählt. Sobald die Inkubationszeit erreicht war, wurden die Objektträger mit Hilfe einer Pinzette aus dem Medium entfernt und nach einer kurzen Waschphase in einer PBS-Lösung in -20°C kalter, 70%iger Ethanollösung fixiert. Die Aufbewahrung der fixierten Objektträger erfolgte bei -20°C im Eisschrank.

Zur eigentlichen Anfärbung wurden die Objektträger aus dem Fixativ entfernt und mittels PBS-Lösung 3 mal für jeweils 5 Minuten gewaschen bzw. rehydriert. Es erfolgte die Permeabilisierung der auf den Objektträgern fixierten Zellen durch Triton-X-100-Lösung. Darin wurden die Objektträger für 5 Minuten gewaschen [Djuzenova et al., 2004]. Die anschließende Blockade wurde durch eine einstündige Inkubation in 4%iger FBS/PBS-Lösung erreicht. Die Objektträger wurden zunächst mit 60 μ l Lösung des ersten Antikörpers inkubiert. Nach 30 Minuten wurden weitere 40 μ l der ersten Antikörperlösung zugefügt, um einen möglichst gleichmäßigen Kontakt der Zellen mit den Antikörpern zu erreichen. Nach einer Stunde wurden die Objektträger 3 mal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen. Entsprechend dem Vorgehen mit dem ersten Antikörper erfolgte nun die Handhabung mit dem zweiten Antikörper. Auch dieser wirkte eine Stunde auf die Zellen ein. Nach dieser Inkubation wurden die Objektträger 3 mal in 2%iger BSA/PBS-Lösung gewaschen und anschließend für weitere 5 Minuten

getrocknet. Nach der Zugabe von 55 μ l DAPI-Lösung pro Objektträger war die Färbung der γ H2AX-Histone abgeschlossen.



Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes bei 1000-facher Vergrößerung. Zellkerne, die deutliche Foci bei geringer Hintergrundfluoreszenz aufwiesen, wurden bei einer Belichtungszeit von 5 Sekunden mit Hilfe einer Digitalkamera aufgenommen. Die aufgenommenen Bilder (mindestens 50 Zellen je Dosis und Zeitpunkt) wurden mittels AnalySIS[®]-Software ausgewertet. In der Abbildung 2.1 ist die Auswertung der Fluoreszenzintensität am Beispiel von zwei Zellen dargestellt.

2.7 Statistik

Die dargestellten Mittelwerte sind arithmetisch Mittelwerte samt ihrer Standardabweichung bzw. ihrem Standardfehler.

Ob zwischen verschiedenen Mittelwerten eine Korrelation bestand oder nicht, wurde mit dem *t*-Test nach Student ermittelt. Der p-Wert wurde auf $p < 0.05$ festgelegt. Zur Auswertung stand das Computerprogramm Microcal Origin[®] (Microcal Software Inc, Northhampton, MA, USA) zur Verfügung.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte der Bestrahlung auf das Wachstum im Kolonietest

Bei allen 10 untersuchten Zelllinien wurde die Strahlensensibilität mit Hilfe des Koloniebildungstests ermittelt. Dabei wurden Unterschiede mit Hilfe der Überlebensrate bei einer Dosis von 2 Gray (SF2-Wert) und der Plating efficiency (PE) erkannt. Der SF2-Wert gilt heute als Standardparameter für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit und wird entsprechend häufig als Referenzwert für andere Parameter herangezogen.

3.1.1 Plating efficiency der untersuchten Zelllinien

In Abbildung 3.1 werden für alle untersuchten Zelllinien die mittleren PE-Werte aus mindesten 2 Einzelversuchen dargestellt.

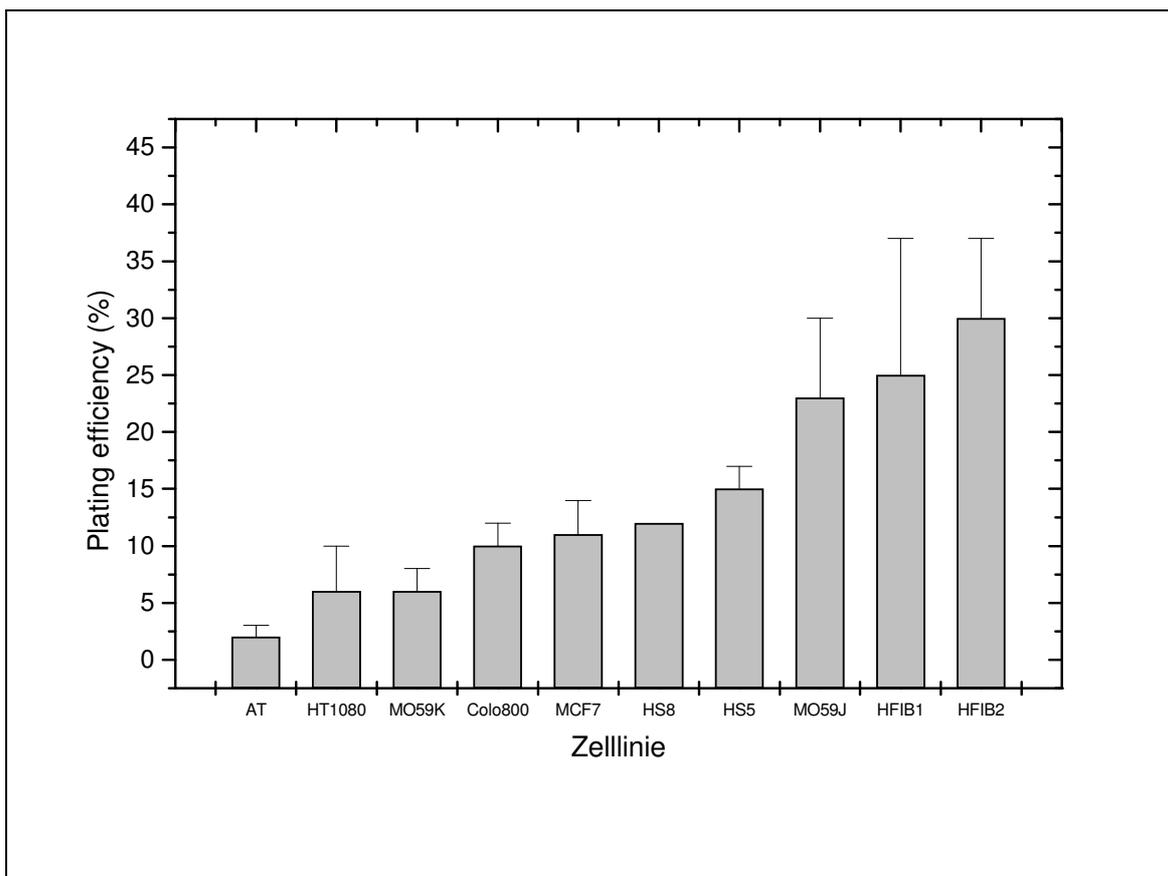


Abbildung 3.1: Die Mittelwerte der Plating efficiency und ihre Standardabweichungen für unbestrahlte Zelllinien. Die Werte basieren auf mindestens 2 unabhängigen Einzelversuchen.

Wie anhand der Abbildung 3.1 zu erkennen ist, besaß die Zelllinie HFIB2 mit 30% die größte PE. Es folgten die Linien HFIB1 (25%) und die Glioblastomlinie MO59J (23%). Die PE der Zelllinien HS5, HS8, MCF7, Colo800, HT1080 und MO59K hatten PE-Werte zwischen 6 und 15%. Mit einer PE von lediglich 2% besaß die Linie AT die geringste PE. Entsprechende Einzelwerte und Standardabweichungen sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1 : Gemittelte Werte der Plating efficiency samt ihren Standardabweichungen aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen. Grundlage ist die relative Anzahl gewachsener Kolonien bei unbestrahlten Proben nach 2-3 Wochen Kulturdauer.

Zelllinie	PE (%)	Zelllinie	PE (%)
AT	2 ± 1	Colo800	10 ± 2
HFIB1	25 ± 12	HT1080	6 ± 4
HFIB2	30 ± 7	MCF7	11 ± 3
HS5	15 ± 2	MO59J	23 ± 7
HS8	12 ± 0	MO59K	6 ± 2

3.1.2 Überlebensraten der untersuchten Zelllinien

In Abbildung 3.2 werden die Überlebenskurven der untersuchten Fibroblastenzelllinien gezeigt, wie sie nach dem linear-quadratischen Modell errechnet wurden. Während die Linien HFIB1, HFIB2 und HS8 einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf zeigten, lag die Kurve von HS5 etwas unterhalb des Niveaus der ersten drei genannten Linien. Eine weitere Auffälligkeit die in der Abbildung 3.2 zu sehen ist, ist die steil abfallende Kurve der AT-Linie.

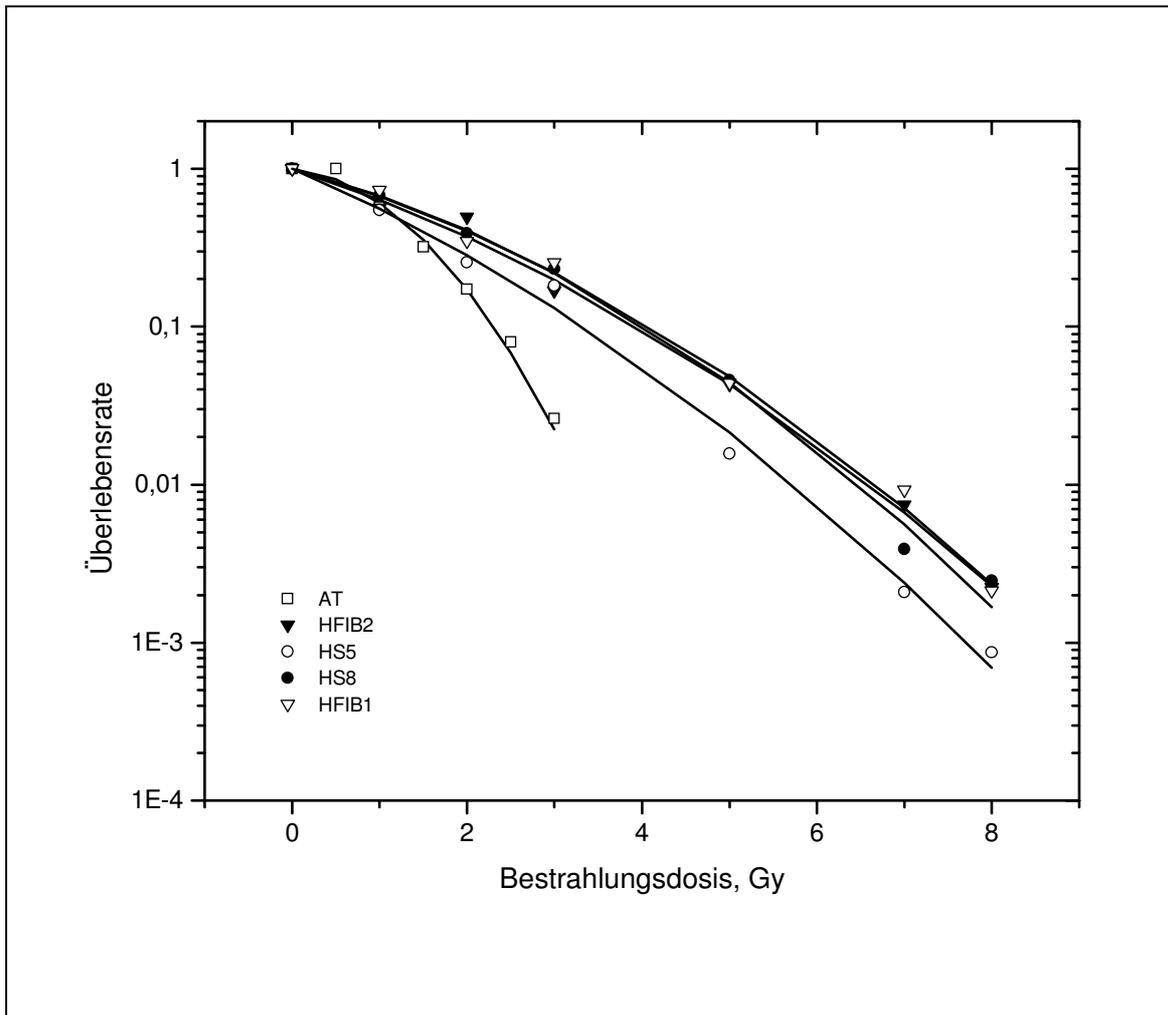


Abbildung 3.2 : Überlebenskurven der Fibroblastenzelllinien im Koloniebildungstest. Die Kurven wurden nach dem linear-quadratischen Modell ermittelt. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte aus mindestens 2 Einzelversuchen. Die Standardabweichungen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt und sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

In der Abbildung 3.3 werden die Überlebenskurven der 5 untersuchten Tumorzelllinien gezeigt. Dabei fällt besonders die linear abfallende Kurve der Linie MO59J auf, für die eine Abwandlung des linear-quadratischen Modells nötig war. Im Allgemeinen zeigten die Linien HT1080, MO59K, Colo800 und MCF7 einen ähnlichen Kurvenverlauf.

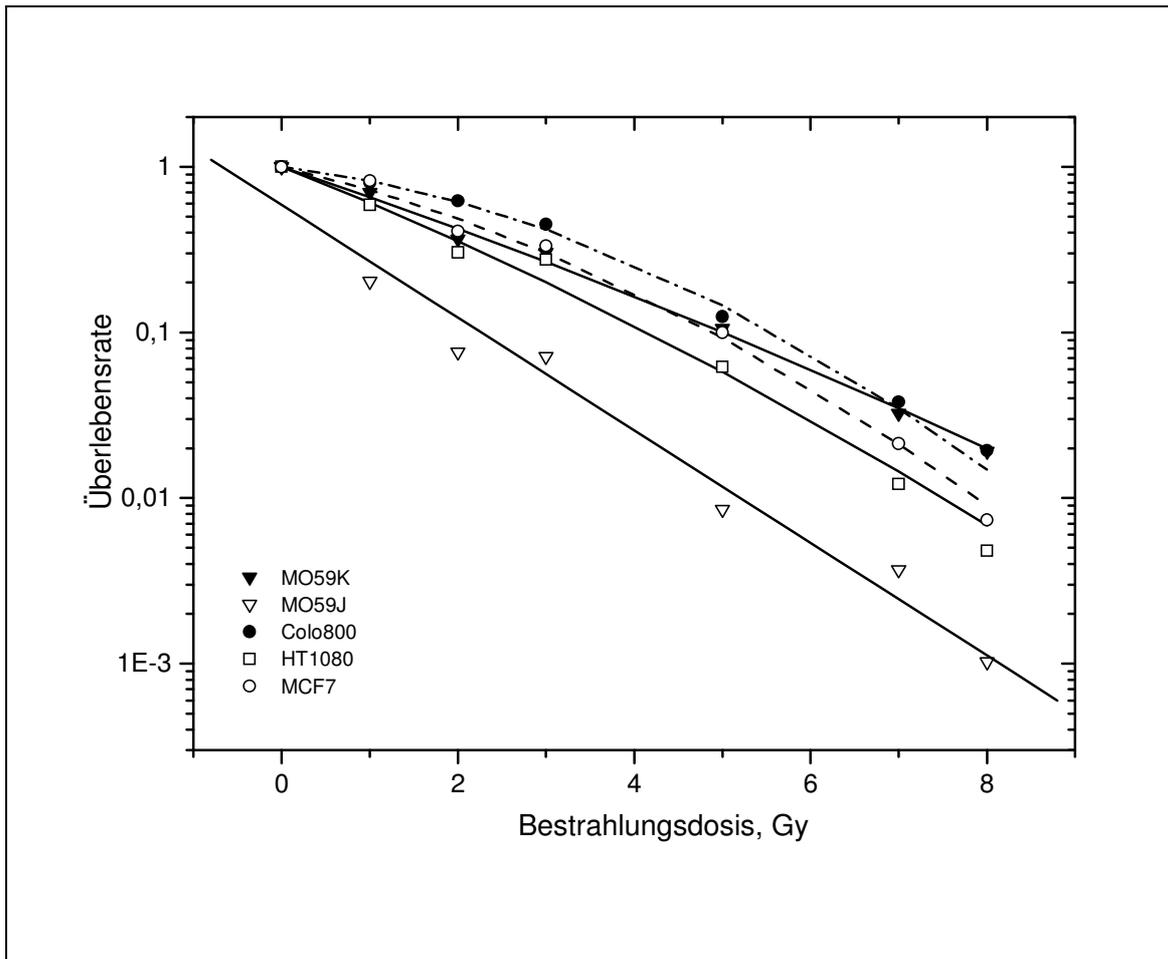


Abbildung 3.3 : Überlebenskurven der Tumorzelllinien im Koloniebildungstest. Die Kurven wurden nach dem linear-quadratischen Modell ermittelt. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte aus mindestens 2 Einzelversuchen. Die Standardabweichungen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt und sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.4 gibt die ermittelten SF2-Werte wieder. Bei deren Betrachtung konnten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien gefunden werden. Während die Überlebensrate der Glioblastomzelllinie MO59J nach einer Bestrahlungsdosis von 2 Gray bei nur 0,06 lag, wies die Melanomlinie Colo800 mit einem SF2-Wert von 0,62 die höchste Überlebensrate auf. Insbesondere die Zelllinie MO59K hatte mit einem SF2-Wert von 0,42 eine im Vergleich zu ihrem DNA-PK-defekten Pendant, MO59J, eine in etwa 7 mal so hohe Überlebensrate. Die Linie AT war mit einem SF2-Wert von 0,17 nach MO59J in diesem Zellkollektiv die zweit-sensibelste Zelllinie. Die SF2-Werte der Linien MO59K, HS8, HFIB1, HFIB2 und HT1080 bewegten sich um einen Wert von ca. 0,4 (0,36 – 0,42). Die Zelllinie HS5 hatte

einen verhältnismäßig geringen SF2-Wert von 0,28. Entsprechende Einzelwerte können der Tabelle 3.2 entnommen werden.

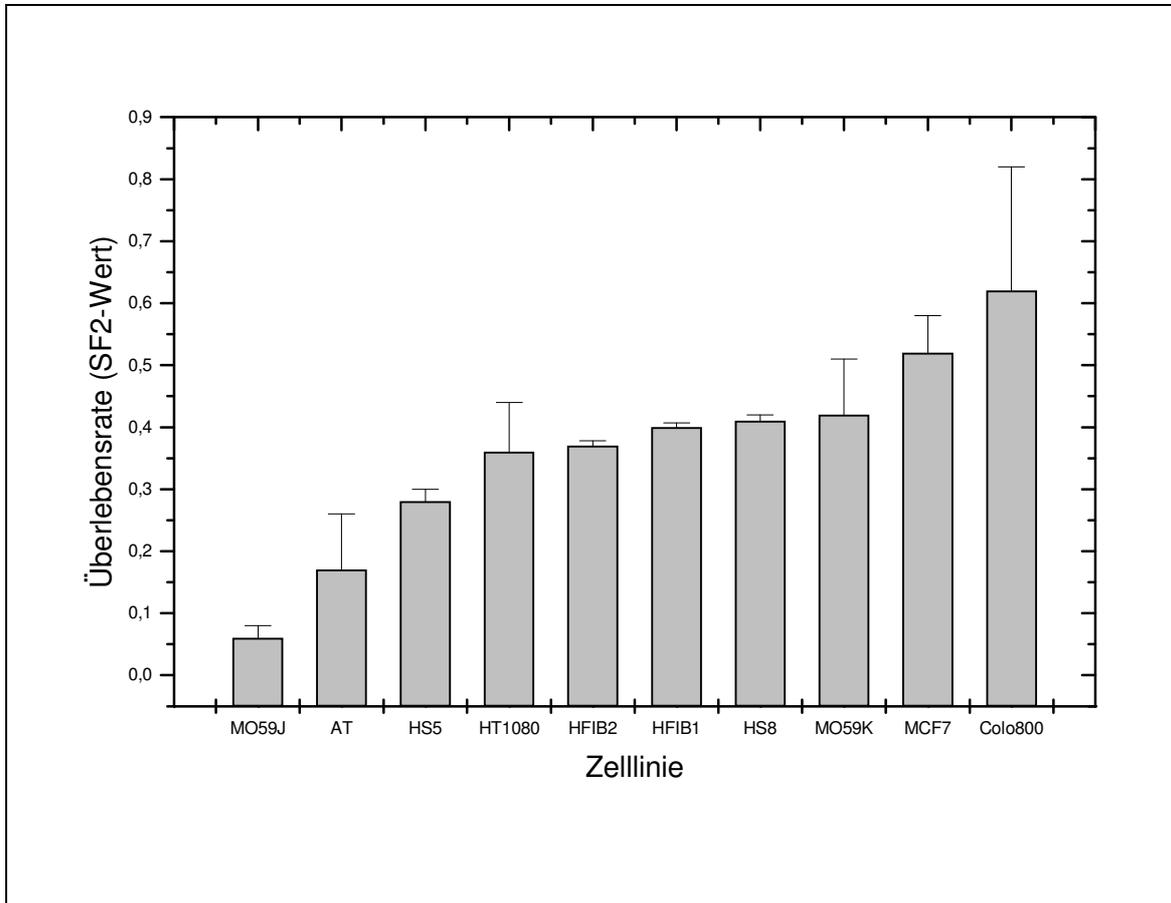


Abbildung 3.4 : Mittelwerte der Überlebensraten (SF2-Werte) der 10 untersuchten Zelllinien nach einer Bestrahlung mit 2 Gray. Zudem ist die Standardabweichung der Mittelwerte angegeben. Die dargestellten Werte basieren auf mindestens 2 unabhängigen Versuchen. Insgesamt verdeutlicht diese Abbildung, dass viele der hier untersuchten Tumorzelllinien eine höhere Überlebensrate im Vergleich zu den verwendeten Fibroblastenzelllinien hatten.

In Tabelle 3.2 sind die Einzelwerte der untersuchten Zelllinien, die Überlebensraten (SF2-Werte) sowie die zelllinienspezifischen Parameter α und β , nochmals aufgelistet.

Tabelle 3.2: Einzelwerte der Koloniebildungstests bei Tumor- und Fibroblastenzelllinien mit der Überlebensrate SF2 und den zelllinienspezifischen Parametern α und β .

Zelllinie	SF2-Wert	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)
AT	0,17 ± 0,09	0,11 ± 0,10	0,38 ± 0,07
HFIB1	0,40 ± 0,07	0,35 ± 0,05	0,05 ± 0,01
HFIB2	0,37 ± 0,08	0,41 ± 0,09	0,04 ± 0,02
HS5	0,28 ± 0,02	0,54 ± 0,07	0,05 ± 0,02
HS8	0,41 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,06 ± 0,006
Colo800	0,62 ± 0,06	0,24 ± 0,04	0,04 ± 0,01
HT1080	0,36 ± 0,08	0,48 ± 0,06	0,02 ± 0,01
MCF7	0,52 ± 0,06	0,24 ± 0,04	0,04 ± 0,01
MO59J	0,06 ± 0,02	1,37 ± 0,14	0
MO59K	0,42 ± 0,09	0,41 ± 0,04	0,01 ± 0,008

3.2 Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, untersucht mittels Histon γ H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche.

3.2.1 γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz

Bereits ohne Bestrahlung wiesen alle untersuchten Zelllinien eine gewisse Menge an γ H2AX-Foci bzw. -Hintergrundfluoreszenz auf. In der Abbildung 3.5 sind nochmals alle Zelllinien unter dem Aspekt ihrer gemessenen γ H2AX-Hintergrundfluoreszenzen dargestellt. Auffällig sind dabei die hohen γ H2AX-Hintergrundfluoreszenzwerte der Tumorzelllinien. Die untersuchten malignen Zelllinien ($24,0 \pm 3,5$) hatten im Vergleich

zu den Fibroblastenzelllinien ($14,6 \pm 4,4$) eine deutlich höhere mittlere Hintergrundfluoreszenz des Histons γH2AX .

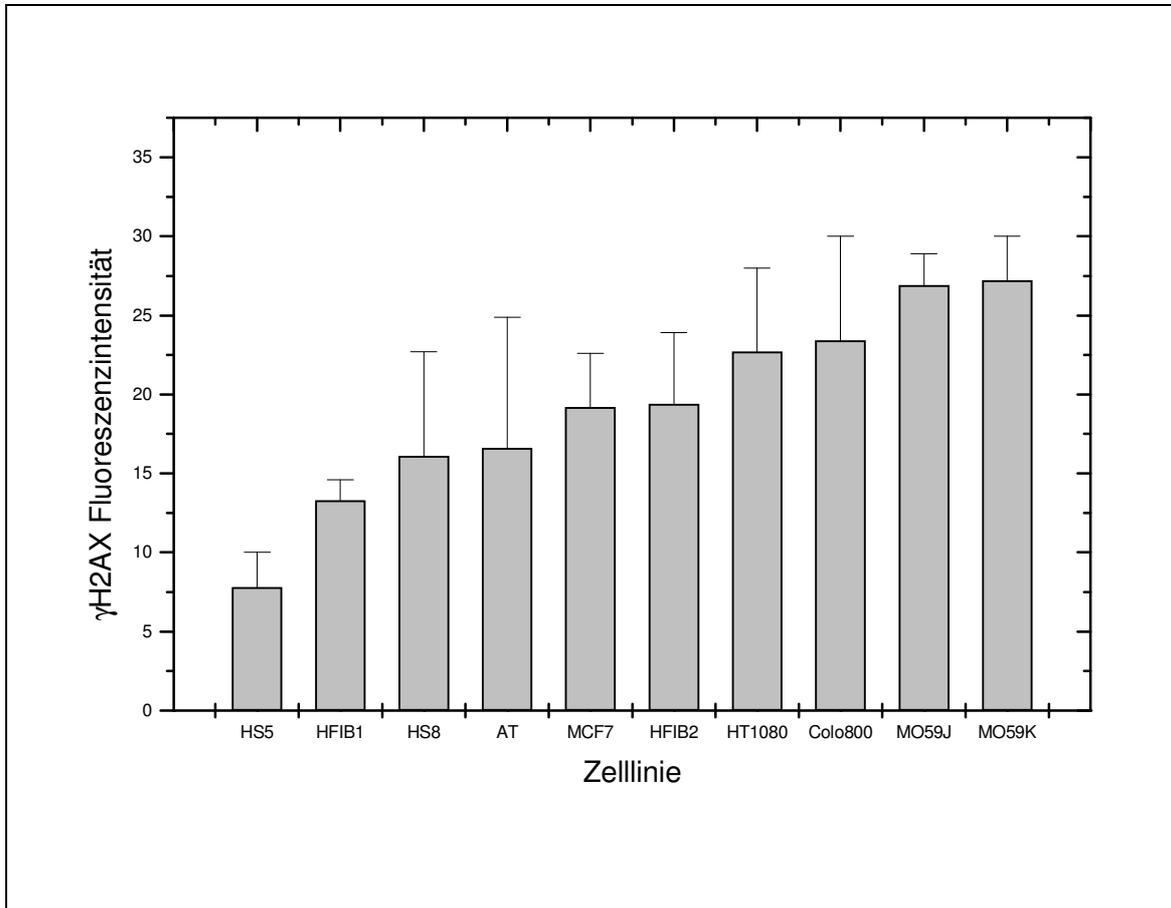


Abbildung 3.5 : Vergleich der γH2AX -Hintergrundfluoreszenzintensitätswerte bei unbestrahlten Zelllinien. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens 2 unabhängigen Einzelversuchen.

In der Abbildung 3.6 werden die γH2AX -Hintergrundwerte und deren Mittelwerte samt Standardabweichungen getrennt nach der Dignität der Zelllinien dargestellt. Diese Abbildung (3.6) verdeutlicht nochmals die großen Unterschiede der γH2AX -Hintergrundfluoreszenzwerte zwischen den untersuchten Zelllinien. In Tabelle 3.3 werden die Hintergrundfluoreszenzwerte in absoluten Zahlen wiedergegeben. Beim Vergleich der Mittelwerte von Tumorzelllinien ($24,0 \pm 3,5$) und Fibroblastenzelllinien ($14,6 \pm 4,4$) stellte sich der Unterschied als signifikant ($p < 0,005$) heraus.

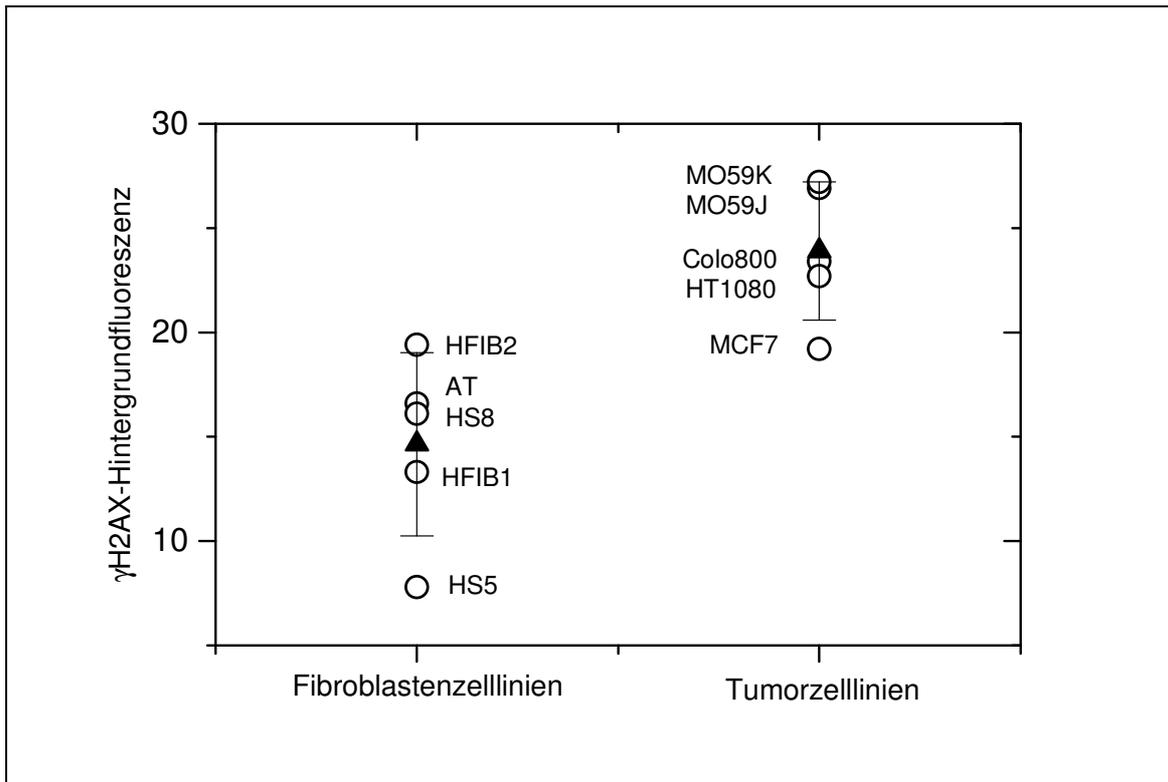


Abbildung 3.6 : Vergleich der γ H2AX-Hintergrundfluoreszenzintensitätswerte, ermittelt bei unbestrahlten Tumor- und Fibroblastenzelllinien. Die Mittelwerte für Tumor- und Fibroblastenzelllinien betragen $24,0 \pm 3,5$ bzw. $14,6 \pm 4,4$. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Zelllinien (Kreise) aus mindestens 2 Einzelversuchen, geordnet nach ihrer Dignität sowie deren Gruppenmittelwerte (schwarze Dreiecke) samt Standardabweichungen.

Tabelle 3.3 : Die Hintergrundfluoreszenzwerte von γ H2AX-Foci, ermittelt durch die Messung der Fluoreszenzintensitäten bei unbestrahlten Zelllinien aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen.

Zelllinie	γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz	Zelllinie	γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz
AT	$16,6 \pm 8,3$	Colo800	$23,4 \pm 6,6$
HFIB1	$13,3 \pm 1,3$	HT1080	$22,7 \pm 5,3$
HFIB2	$19,4 \pm 4,5$	MCF7	$19,2 \pm 3,4$
HS5	$7,8 \pm 2,2$	MO59J	$26,9 \pm 2,0$
HS8	$16,1 \pm 6,6$	MO59K	$27,2 \pm 2,8$

3.2.2 Effekte der applizierten Dosis auf die Bildung und den Verlauf von γ H2AX-Foci

In der Abbildung 3.7 werden repräsentative Fluoreszenzbilder von Zellkernen der drei Zelllinien MCF7, HFIB1 sowie MO59K gezeigt. Die aufgenommenen Zellkerne entstammen Zellen, die 30 Minuten nach Bestrahlung mit unterschiedlich hohen Dosen fixiert wurden und deren γ H2AX-Histone anschließend angefärbt wurden. Deutlich zu sehen ist eine positive Korrelation zwischen der Bestrahlungsdosis und der γ H2AX-Focizahl und zwar unabhängig von der betrachteten Zelllinie. Beim Vergleich der dargestellten Bilder fällt ebenfalls auf, dass die gezeigten Zelllinien trotz identischer Versuchsbedingungen unterschiedlich große Mengen an γ H2AX-Foci besitzen. So ist insbesondere bei der Linie MCF7 auf die im Vergleich zu den anderen dargestellten Zelllinien höhere Anzahl von γ H2AX-Foci und eine dadurch bedingte höhere Fluoreszenz hinzuweisen. Ein weiterer Aspekt, der sich bei Betrachtung der Abbildung 3.7 ergibt, ist die bei der Zelllinie MO59K deutlich stärker sichtbare Hintergrundfluoreszenz bei unbestrahlten Zellproben im Vergleich zu den Zelllinien HFIB1 und MCF7.

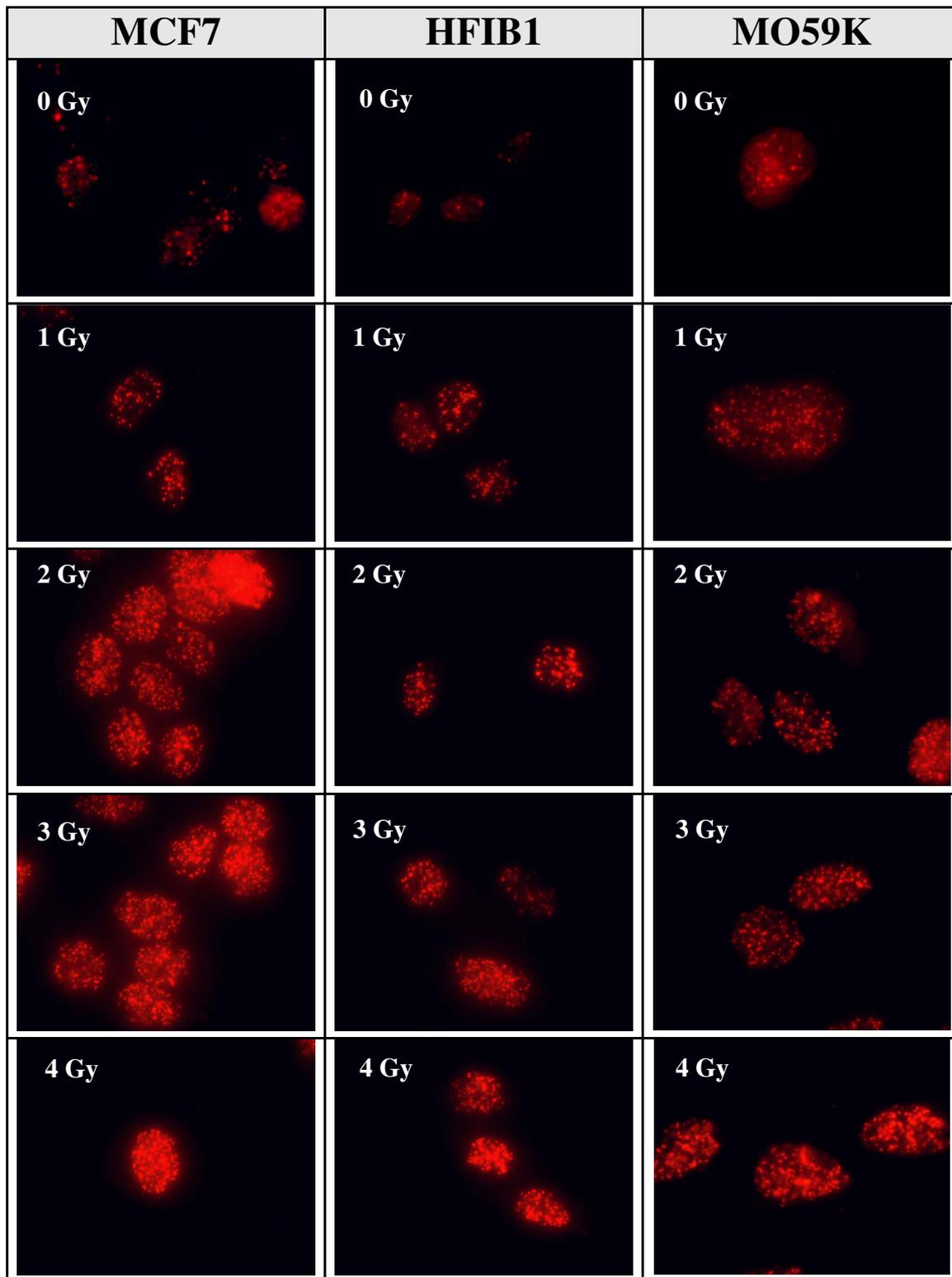


Abbildung 3.7 : Repräsentative Fluoreszenzbilder von 3 untersuchten Zelllinien. Die Zellen wurden mit der in jedem Bild angegebenen Dosis bestrahlt, nach 30 Minuten Reparaturzeit abgestoppt und mit anti-Histon- γ H2AX-Antikörpern angefärbt. Deutlich zu erkennen ist die Dosis-Wirkungsbeziehung im Sinne einer dosisabhängigen Fluoreszenzintensität der Histon- γ H2AX-Foci.

Die auf der Grundlage der aufgenommenen Fluoreszenzbilder bzw. der Fluoreszenzintensitäten der Zellkerne berechneten Ausgleichsgeraden sind in den Abbildungen 3.8 und 3.9 dargestellt.

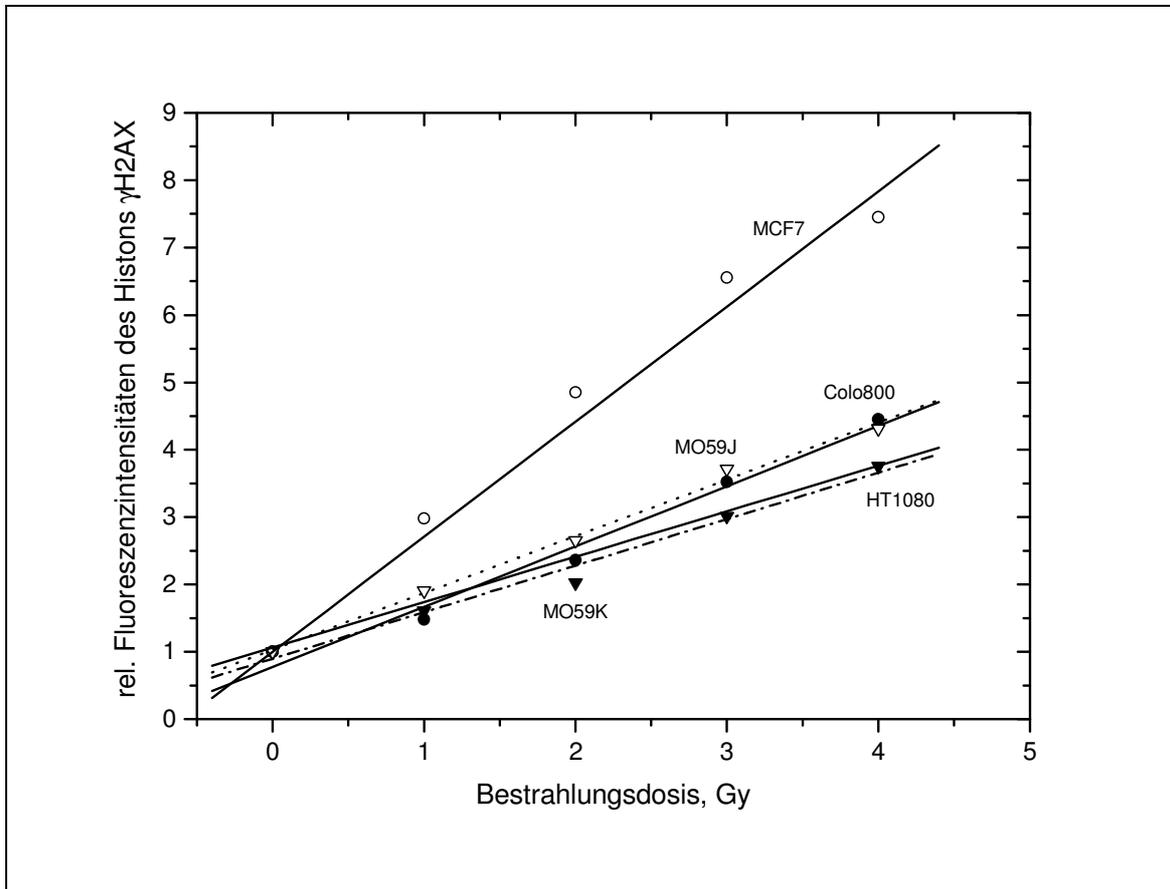


Abbildung 3.8: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen den Bestrahlungsdosen von 1 bis 4 Gray und den γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten bei Tumorzelllinien. Die Reparaturzeit betrug jeweils 30 Minuten. Die dargestellten Bildpunkte sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen. Die Hintergrundfluoreszenz von unbestrahlten Zellen wurde auf 1,0 gesetzt. Standardabweichungen sind aus Gründen einer besseren Übersicht nicht dargestellt.

In der Abbildung 3.8 ist die im Vergleich zu den anderen Zelllinien wesentlich steiler ansteigende Gerade der Linie MCF7 zu erkennen. Diese Zelllinie hatte mit einem Steigungswert von 1,7 die steilste Kurve unter allen betrachteten Linien. Die ebenfalls gezeigten Zelllinien MO59J, MO59K, Colo800 und HT1080 wiesen mittlere Steigungswerte zwischen 0,7 und 0,8 auf. Die isogenen, aber unterschiedlich strahlensensiblen Linien MO59K und MO59J besaßen sehr ähnliche Steigungswerte.

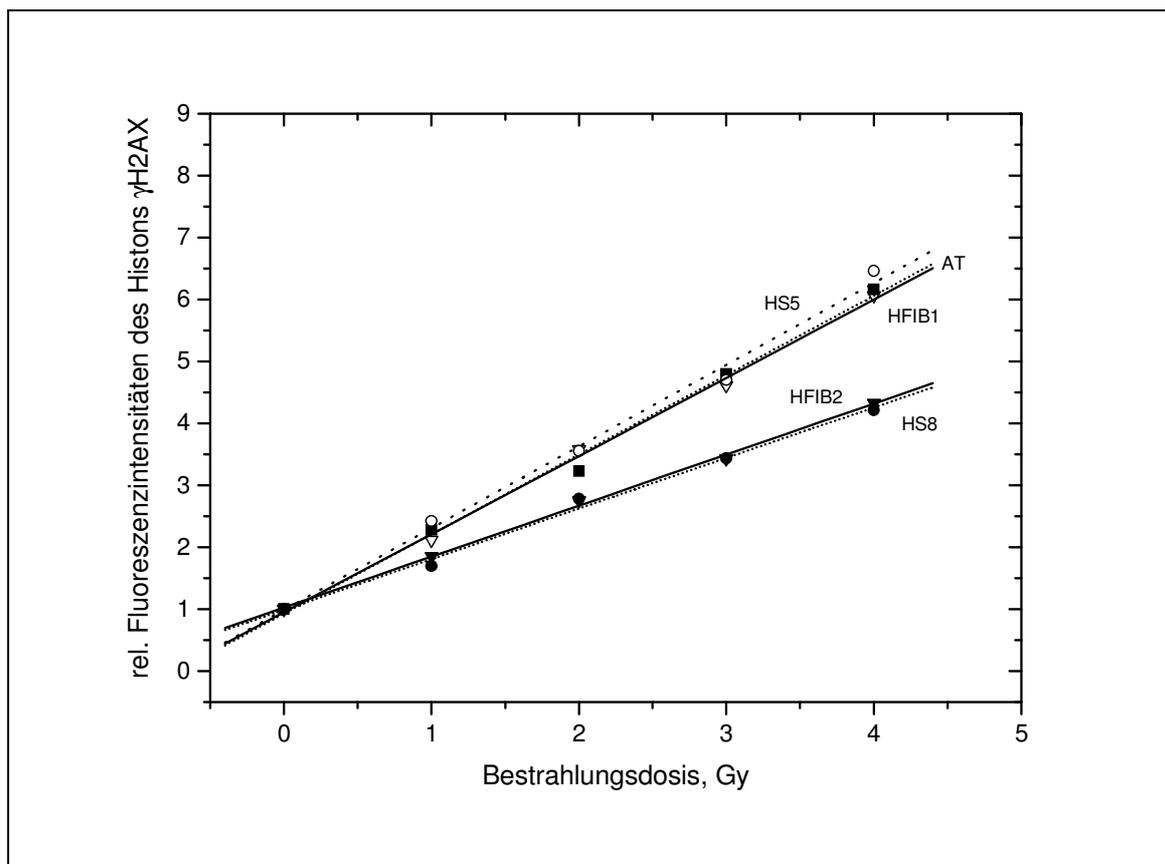


Abbildung 3.9: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen den Bestrahlungsdosen von 1 bis 4 Gray und den γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten bei Fibroblastenzelllinien. Die Reparaturzeit nach Bestrahlung betrug jeweils 30 Minuten. Die dargestellten Bildpunkte sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen. Die Hintergrundfluoreszenz von unbestrahlten Zellen wurde auf 1,0 gesetzt. Standardabweichungen sind aus Gründen einer besseren Übersicht nicht dargestellt.

In Abbildung 3.9 werden, analog zu der Abbildung 3.8, die Ausgleichsgeraden der untersuchten Fibroblastenzelllinien demonstriert. Unter den Fibroblastenlinien wies HS5 mit einem Steigungswert von 1,3 die steilste Ausgleichsgerade auf. Mit mittleren Steigungen von 0,81 bzw. 0,85 hatten die Linien HS8 bzw. HFIB2 unter den Fibroblastenzelllinien deutlich geringere Steigungswerte als die Linien HFIB1, AT und HS5, welche Steigungswerte von mehr als 1,1 aufwiesen.

Beim Vergleich von Tumorzelllinien und Fibroblastenzelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Steigungen erkannt werden. Tumorzelllinien hatten Steigungswerte von durchschnittlich $0,96 \pm 0,41$, Fibroblastenzelllinien zeigten einen ähnlichen Durchschnittswert von $1,06 \pm 0,22$. Die Einzelwerte können der Tabelle 3.4 entnommen werden.

Tabelle 3.4 : Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Bestrahlungsdosis und der γ H2AX-Focus-Bildung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus mindestens 2 Einzelversuchen. Die Messungen erfolgten dabei nach 30 Minuten Reparaturzeit. Die Werte wurden auf die γ H2AX-Fluoreszenzintensität bei unbestrahlten Zellen normiert.

Zelllinie	Steigung \pm SD	Zelllinie	Steigung \pm SD
AT	1,22 \pm 0,59	Colo800	0,67 \pm 0,60
HFIB1	1,15 \pm 0,31	HT1080	0,83 \pm 0,10
HFIB2	0,85 \pm 0,10	MCF7	1,69 \pm 0,36
HS5	1,30 \pm 0,21	MO59J	0,84 \pm 0,11
HS8	0,82 \pm 0,11	MO59K	0,77 \pm 0,25

3.2.3 Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen unter Verwendung des Histons γ H2AX als Marker

In Abbildung 3.10 werden repräsentative Fluoreszenzbilder der Zelllinien MCF7, HFIB1 sowie MO59K gezeigt. Die angegebenen Zeitangaben beziehen sich auf die Reparaturdauer nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gray. Zu sehen ist bei allen gezeigten Zelllinien eine Zunahme der γ H2AX-Focianzahl pro Zellkern zwischen 5 und 30 Minuten Reparaturdauer. Nach 30 Minuten Reparaturdauer wurde bei den dargestellten Zelllinien ein Maximum an γ H2AX-Foci erreicht. In den Fluoreszenzbildern die nach diesem Zeitpunkt aufgenommen wurden (nach 2, 8 und 18 Stunden) sind daher zunehmend weniger γ H2AX-Foci zu erkennen.

Ein weiterer Aspekt der sich bei der genauen Betrachtung der gezeigten Fluoreszenzbilder der Abbildung 3.10 ergibt, ist die Zunahme der Größe der einzelnen γ H2AX-Foci bei zunehmender Reparaturdauer. Diese Tatsache wird insbesondere bei der Zelllinie HFIB1 deutlich. Bei dieser Linie können relativ kleinen γ H2AX-Foci bei den Bildern nach 5 Minuten Reparaturzeit erkannt werden, während bei den Fluoreszenzbildern nach 8-stündiger Reparaturdauer deutlich größere γ H2AX-Foci auffallen.

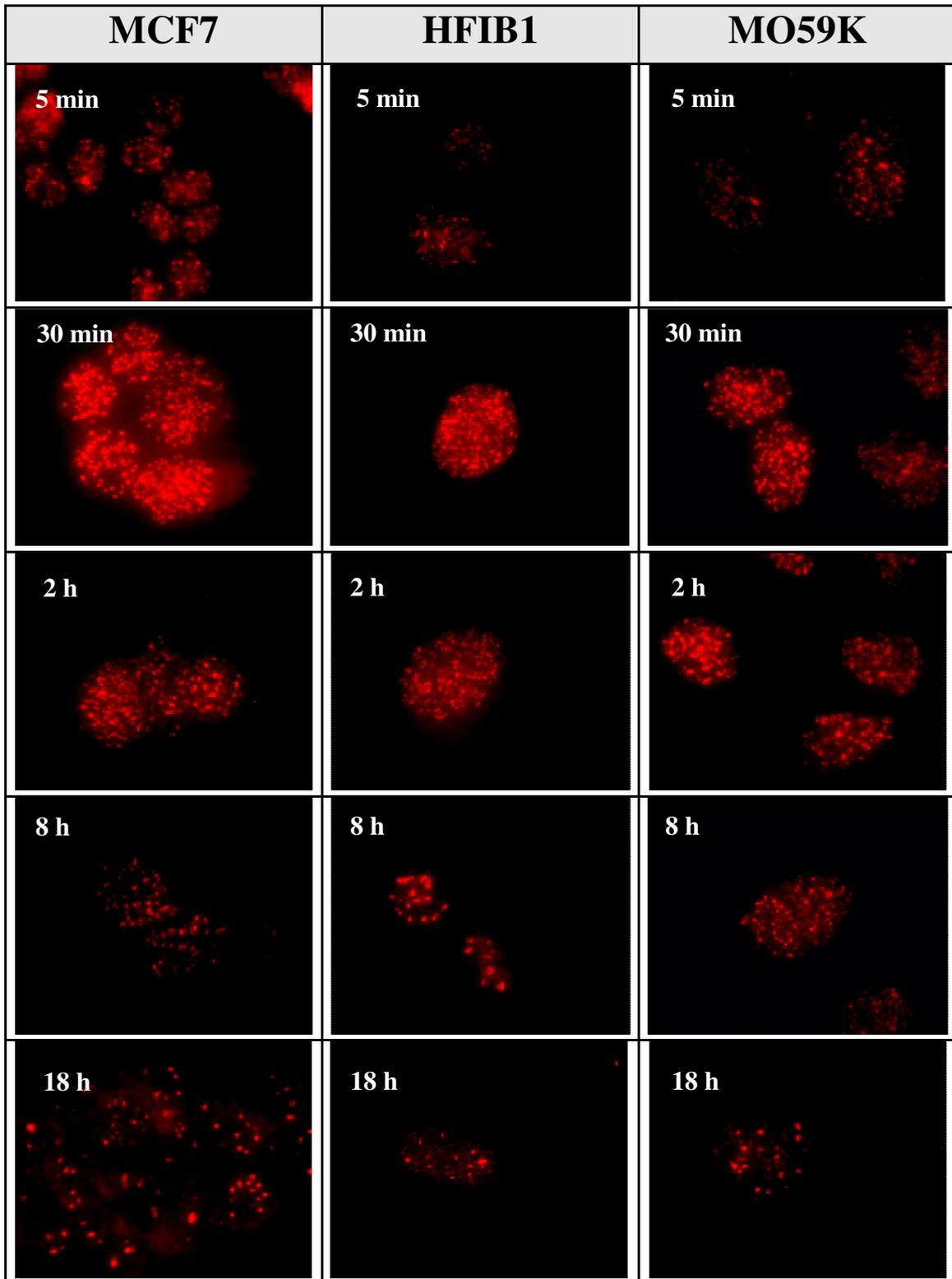


Abbildung 3.10 : Repräsentative Aufnahmen der Zellkerne von 3 untersuchten Zelllinien nach einer Bestrahlung mit 2 Gray. Links oben in jedem Bild sind die Reparaturzeiten angegeben d.h. die Zeiten zwischen der Bestrahlung und der Fixierung der Zellen in 70%iger, -20°C kalter Ethanollösung. Deutlich sichtbar ist die reparaturbedingte Abnahme der γ H2AX-Foci nach einem Maximum bei 30 Minuten.

In der Abbildung 3.11 wird die strahlenbedingte Induktion von γ H2AX als Balkendiagramm dargestellt. Grundlage für die Bestimmung der γ H2AX-Induktion war die Messung der Fluoreszenzintensität 30 Minuten nach einer Bestrahlung mit 2 Gray in Relation zur Fluoreszenzintensität unbestrahlter Zellen. Deutlich zu erkennen ist die große Variabilität der γ H2AX-Induktion zwischen den einzelnen Zelllinien. Während auf der einen Seite bei Zelllinien wie MO59J oder Colo800 gerade einmal eine Verdopplung der Gesamtfluoreszenzintensität zu verzeichnen war, reagierten andere Linien wie MCF7 oder HS5 mit einer deutlich stärkeren Induktion von γ H2AX. Bei diesen Linien war annähernd eine Versechsfachung der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen. Mit Ausnahme von MCF7 fällt weiterhin auf, dass alle anderen malignen Zelllinien eine geringere γ H2AX-Induktion aufwiesen als dies bei den Fibroblastenzelllinien der Fall war. Einzelwerte sind in der Tabelle 3.5 zu finden.

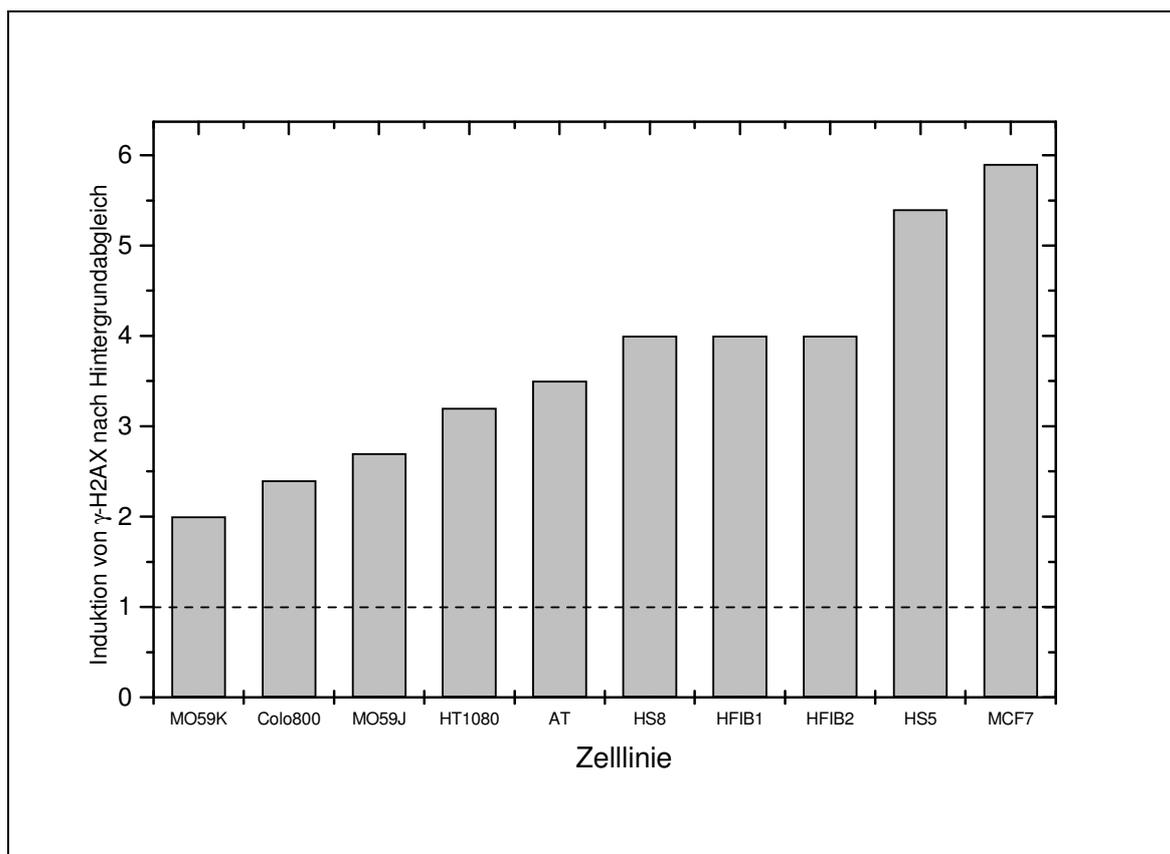


Abbildung 3.11 : Induktion von γ H2AX-Foci in bestrahlten Zelllinien. Die dargestellten Balken zeigen den relativen Anstieg der γ H2AX-Fluoreszenzintensität, 30 Minuten nach einer Bestrahlung mit 2 Gray in Relation zu unbestrahlten Zellen, deren γ H2AX-Fluoreszenzintensität auf den Wert 1,0 gesetzt wurde (gestrichelte Linie).

Tabelle 3.5 : γ H2AX-Fluoreszenzwerte, gemessen an Zellproben die 30 Minuten nach der Bestrahlung mit 2 Gray fixiert wurden. Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte samt Standardabweichungen aus mindestens 2 Einzelversuchen.

Zelllinie	Faktor der Induktion	absolute γ H2AX-Werte nach 30 Min	γ H2AX-Werte nach Abzug der γ H2AX-Hintergrundwerte	γ H2AX-Werte korrigiert nach Ploidie ¹⁾ & γ H2AX-Hintergrundwerten
AT	3,5	58,1 ± 14,7	41,5	41,5
HFIB1	4,0	52,2 ± 2,3	39,2	39,2
HFIB2	4,0	76,8 ± 9,4	57,4	57,4
HS5	5,4	42,1 ± 5,5	34,3	34,3
HS8	4,0	64,4 ± 20,8	48,3	48,3
Colo800	2,4	54,8 ± 13,5	31,4	24,1
HT1080	3,2	73,5 ± 14,3	50,8	50,8
MCF7	5,9	113,3 ± 37,0	94,0	52,2
MO59J	2,7	76,2 ± 9,5	49,3	32,9
MO59K	2,0	53,8 ± 6,8	20,5	15,7

¹⁾ Ploidie : siehe Tabelle 2.1

Auf der Basis der fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen Bilder bzw. durch die Messung ihrer Fluoreszenzintensitätswerte konnten die in den Abbildungen 3.12 und 3.13 gezeigten Kurven berechnet werden. In beiden Abbildungen ist der Verlauf der γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten im Anschluss an eine Bestrahlung mit 2 Gray bei Reparaturzeiten von bis zu 18 Stunden gezeigt. In beiden Abbildungen (3.12 und 3.13) wird deutlich, dass alle untersuchten Zelllinien nach dem Erreichen eines Maximums an γ H2AX-Foci zum kontinuierlichen Abbau der gebildeten γ H2AX-Foci in der Lage waren. Wie anhand der Kurvenverläufe ebenfalls festgestellt werden kann, ist die Abbaukinetik jedoch nicht einheitlich. Sowohl die Dauer als auch der Verlauf des γ H2AX-Abbaus unterscheidet sich von Zelllinie zu Zelllinie, was vor allem anhand der Abbildung 3.12 bei Tumorzelllinien deutlich zu erkennen ist.

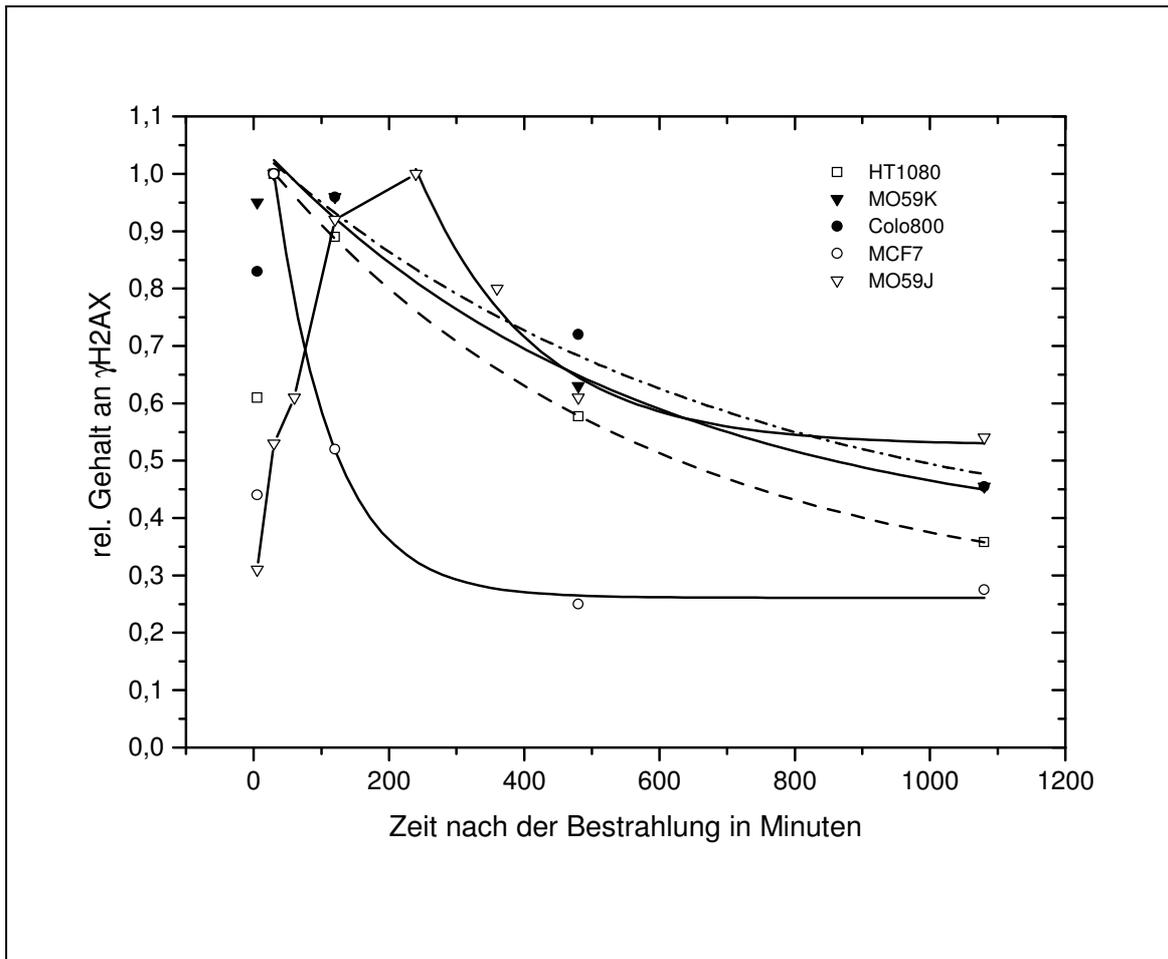


Abbildung 3.12 : Abbaukinetik des Histons γ H2AX nach einer Bestrahlungsdosis von 2 Gray bei den 5 untersuchten Tumorzelllinien. Die Reparatur wurde nach 5 Minuten, 30 Minuten, 2 Stunden, 8 Stunden sowie 18 Stunden abgebrochen. Die Daten wurden mit einer exponentiellen Funktion angefitet. Die dargestellten Bildpunkte stellen Mittelwerte aus mindestens 2 Einzelversuchen dar. Durch die Normierung auf die 30-Minutenwerte konnte eine Vergleichbarkeit geschaffen werden. Bei der Linie MO59J erfolgte diese Normierung mittels dem 4-Stundenwert. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Besonders auffällig sind dabei die Verlaufskurven der Linien MCF7 und MO59J. Bei MCF7 ist auf den raschen Abbau der induzierten γ H2AX-Foci hinzuweisen. Diese Zelllinie konnte mit einer γ H2AX-Halbwertszeit von lediglich 59 Minuten das induzierte Histon γ H2AX am schnellsten abbauen. Die zweite Kurve, die in Abbildung 3.12 Beachtung finden sollte, ist die des Glioblastoms MO59J. Im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zelllinien erreichte diese Linie die maximale γ H2AX-Fluoreszenz nicht bereits nach 30 Minuten, wie bei allen anderen betrachteten Linien. MO59J

benötigte 4 Stunden für die Maximierung der γ H2AX-Fluoreszenz. Im Anschluss an die retardierte γ H2AX-Bildung erfolgte jedoch analog zu allen anderen untersuchten Zelllinien auch bei der Zelllinie MO59J ein stetiger Abbau der entstandenen γ H2AX-Foci. Im Vergleich zu ihrer isogenen Linie MO59K ergab sich in Bezug auf die γ H2AX-Halbwertszeiten kein großer Unterschied. Die Halbwertszeiten von γ H2AX waren bei beiden Zelllinien sogar sehr ähnlich.

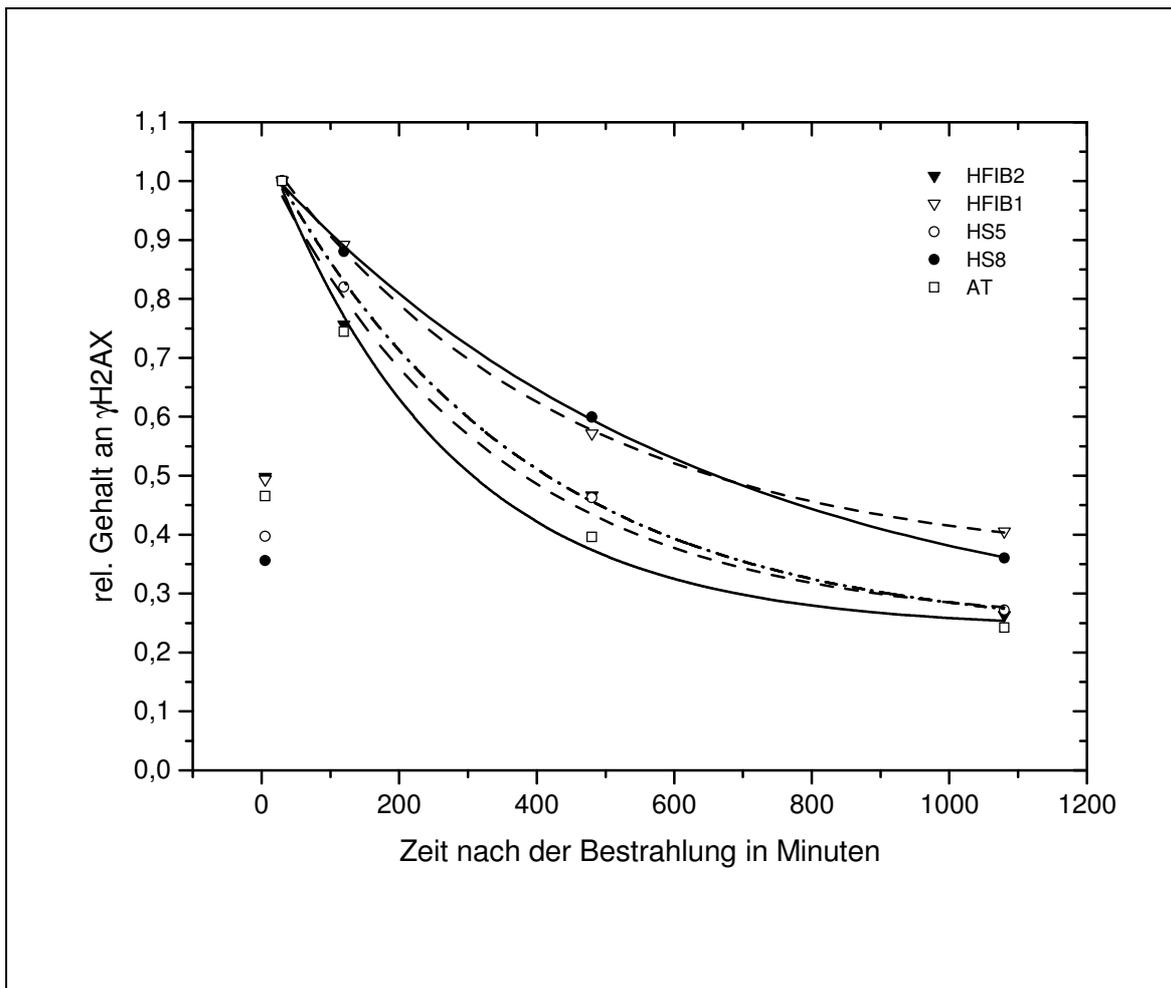


Abbildung 3.13 : Abbaukinetik des Histons γ H2AX nach einer Bestrahlungsdosis von 2 Gray bei Fibroblastenzelllinien. Die Reparatur der DNA-Schäden wurde nach 5 Minuten, 30 Minuten, 2 Stunden, 8 Stunden sowie 18 Stunden unterbrochen. Die Daten wurden mit einer exponentiellen Funktion angefitet. Die dargestellten Bildpunkte stellen Mittelwerte aus mindestens 2 Einzelversuchen dar. Durch die Normierung auf die 30-Minutenwerte konnte eine Vergleichbarkeit geschaffen werden. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Abbildung 3.13 zeigt, in Analogie zur Abbildung 3.12, die zeitabhängigen γ H2AX-Verlaufskurven bei Fibroblastenzelllinien. Auch hier werden, wenn auch weniger deutlich als bei den malignen Zelllinien in Abbildung 3.12, zelllinientypische Verläufe deutlich. Unter den untersuchten Fibroblastenlinien hatte die HS8-Linie eine γ H2AX-Halbwertszeitkonstante von 440 Minuten und somit die längste Reparaturdauer. Die kürzeste Reparaturzeit wurde bei der Fibroblastenzelllinie AT mit 199 Minuten gemessen. Die Zelllinien HFIB1, HFIB2 und HS5 hatten γ H2AX-Halbwertszeitkonstanten zwischen 255 und 290 Minuten. Die genauen Reparaturzeitkonstanten sind der Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6 : Halbwertszeiten des Abbaus gebildeter γ H2AX-Foci nach 2 Gray. Den Ergebnissen liegen mindestens 2 Einzelversuche zugrunde. Es wurde der exponentielle Verlauf des Abbaus zur Berechnung der Halbwertszeitkonstanten herangezogen.

Zelllinie	γ H2AX-Halbwertszeit, Min	Zelllinie	γ H2AX-Halbwertszeit, Min
AT	198,8 ± 39,3	Colo800	325,0 ± 97,0
HFIB1	289,8 ± 33,0	HT1080	376,6 ± 15,8
HFIB2	262,2 ± 92,8	MCF7	59,2 ± 9,3
HS5	255,3 ± 21,2	MO59J	372,3 ± 115,9
HS8	439,9 ± 54,2	MO59K	384,6 ± 218,7

3.2.4 Residuelle DNA-Schäden, gemessen mittels Histon γ H2AX nach erfolgter DNA-Reparatur

Die Messung der Fluoreszenzintensität nach 18 Stunden Reparaturdauer diente zur Bestimmung der residuellen DNA-Schäden. Wie aus Tabelle 3.7 hervorgeht, war keine der untersuchten Zelllinien in der Lage 100% der gebildeten γ H2AX-Foci in der vorhandenen Reparaturzeit von 18 Stunden abzubauen. So wies die Linie MO59J nach 18 Stunden noch 63% der initial induzierten Menge des Histons γ H2AX auf. Bei der Linie MCF7 hingegen konnten nach derselben Reparaturzeit beinahe 80% der induzierten γ H2AX-Foci abgebaut werden.

Tabelle 3.7 : Residuelle Menge an DNA-Schäden nach Bestrahlung mit 2 Gray und einer Reparaturdauer von 18 Stunden, ermittelt durch die Messung der Histon- γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen.

Zelllinie	γ H2AX-Reste (%)	Zelllinie	γ H2AX-Reste (%)
AT	24,0 \pm 2,0	Colo800	45,0 \pm 20,5
HFIB1	41,0 \pm 10,5	HT1080	36,0 \pm 3,7
HFIB2	26,0 \pm 8,0	MCF7	21,0 \pm 10,9
HS5	27,0 \pm 15,1	MO59J	63,0 \pm 36,9
HS8	37,0 \pm 12,8	MO59K	46,0 \pm 5,3

3.2.5 Korrelationen zwischen den SF2-Werten der Koloniebildungstests und den auf der γ H2AX-Fluoreszenz basierten Ergebnissen für die Induktion und Reparatur von DNA-DSB

Wie bereits weiter oben beschrieben, stellt der Koloniebildungstest den aktuell geltenden Goldstandard dar, um die Sensibilität einer Zelllinie gegenüber ionisierender Strahlung anhand ihrer klonogenen Überlebensrate zu testen. Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit der SF2-Wert der Koloniebildungstests mit den gewonnenen γ H2AX-Werten auf Korrelationen hin untersucht.

In der Abbildung 3.14 (A-D) sind die Korrelationen zwischen den SF2-Werten und den γ H2AX-abhängigen Ergebnissen (Induktion von γ H2AX; Reparatur von Doppelstrangbrüchen, gemessen anhand des Abbaus von γ H2AX-Foci; restliche Menge der γ H2AX-Foci nach 18 Stunden Reparaturzeit sowie den dosisabhängigen Steigungswerten) dargestellt.

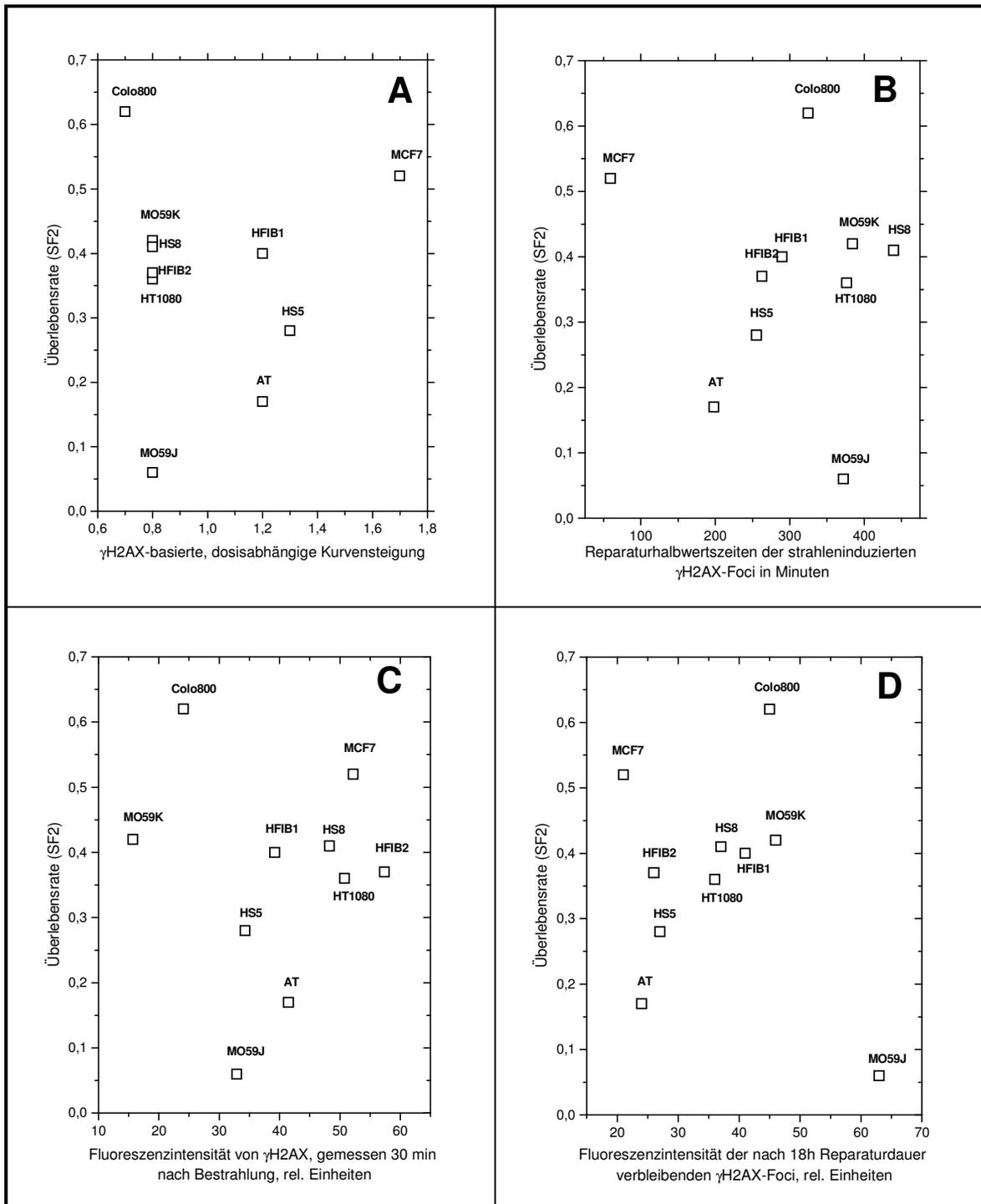


Abbildung 3.14 : Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Koloniebildungstests (SF2-Werte) und den Resultaten der γ H2AX-Foci-Detektion. **A)** Korrelation zwischen den SF2-Werten und den Kurvensteigungen nach 1-4 Gray Bestrahlungsdosis und 30 Min Reparaturzeit; **B)** Korrelation zwischen den SF2-Werten und den Reparaturhalbwertszeiten gebildeter γ H2AX-Foci nach 2 Gray und 0-18 Stunden Reparaturdauer; **C)** Korrelation zwischen den SF2-Werten und der nach 2 Gray und 30 Min messbaren Fluoreszenzintensität der γ H2AX-Foci; **D)** Korrelation zwischen den SF2-Werten und den nach 18 Stunden Reparaturdauer verbliebenen γ H2AX-Foci.

Wie anhand der Abbildung 3.14A zu erkennen ist, konnten keine Korrelationen zwischen den SF2-Werten der Koloniebildungstests und den dosisabhängigen Steigungswerten der γ H2AX-Focifluoreszenz gefunden werden.

Anhand der Abbildung 3.14B wird gezeigt, dass auch zwischen den Reparatur-halbwertszeitkonstanten gebildeter γ H2AX-Foci und den SF2-Werten keine Korrelationen gefunden werden konnten.

Auch beim Vergleich der SF2-Werte und der nach 30 Min nach Bestrahlung mit 2 Gray gemessenen γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten konnten keinerlei Korrelationen gefunden werden. Dies wird durch die Abbildung 3.14C verdeutlicht.

Wie anhand der Abbildung 3.14D zu erkennen ist, konnten auch zwischen den γ H2AX-Resten nach 18 Stunden Reparaturdauer und den SF2-Werten keine Korrelationen erkannt werden.

Insgesamt konnten keine Korrelationen zwischen den SF2-Werten der Koloniebildungstests und den auf dem Histon γ H2AX basierten Werten gefunden werden.

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Bis heute gibt es noch kein verlässliches Testverfahren, mit dem man schnell, sicher und kostengünstig die Strahlensensibilität eines Gewebes oder einer Zelllinie im Vorfeld der Bestrahlung bestimmen kann. Aus diesem Grund ereignen sich bei immerhin 5-10% der Bestrahlten schwere Nebenwirkungen [Begg 2006], die durch eine Dosisanpassung eventuell hätten verhindert werden können. Während der Koloniebildungstest aus mehreren Gründen als Standardverfahren zur Ermittlung der Strahlensensibilität eines Individuums recht unpraktikabel ist, versucht man heute durch die direkte Detektion von DNA-Schäden mittels verschiedener Methoden die Strahlensensibilität eines Gewebes vorherzusagen. Ein relativ modernes Verfahren zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen stellt dabei der Nachweis des Histons γ H2AX dar. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, den Zusammenhang zwischen der Induktion und Verlaufskinetik strahleninduzierter γ H2AX-Foci bei verschiedenen Zelllinien, auch in Hinblick auf die Strahlensensibilität sowie Dignität zu untersuchen. Unter Herannahme der entsprechenden Koloniebildungstests (SF2-Werte) wurde des Weiteren nach Korrelationen zwischen diesen beiden in-vitro-Verfahren gesucht. Ein weiteres Ziel lag darin, unter Verwendung der Zelllinien MO59J und MO59K sowie der AT-Linie den Einfluss von PIKK-Kinasen auf die Strahlensensibilität sowie die Verlaufskinetik der γ H2AX-Foci zu prüfen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der Koloniebildungstests

Die Überlebensraten der untersuchten Zelllinien, gemessen an den SF2-Werten der Koloniebildungstests, zeigten eine hohe interindividuelle Streuung bei gleichzeitig gut reproduzierbaren Ergebnissen für jede einzelne Zelllinie. Während MO59J einen SF2-Wert von lediglich 0,06 besaß, lag der SF2-Wert von Colo800 bei 0,62. Die SF2-Werte aller anderen Zelllinien bewegten sich zwischen diesen Grenzen (Kapitel 3.1).

Unter Herannahme der gewonnenen SF2-Werte zeigte sich im Wesentlichen eine Anordnung der Zelllinien nach der zu erwartenden klinischen Strahlensensibilität. Zelllinien wie AT oder MO59J hatten entsprechend sehr kleine SF2-Werte, die

strahlenresistenten Tumorzelllinien MCF7 oder Colo800 hatten die höchsten der hier gemessenen SF2-Werte. Lässt man die reparaturdefekten Zelllinien AT und MO59J zunächst außer Acht, so zeigten sich für die Tumorzelllinien (mittlerer SF2-Wert $0,48 \pm 0,11$) tendenziell höhere Überlebensraten als dies bei den Fibroblastenzelllinien (mittlerer SF2-Wert $0,37 \pm 0,06$) der Fall war (Abbildung 3.4). Diese Unterschiede sind statistisch nicht signifikant, dennoch deuten sie zumindest auf eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der entarteten Zelllinien gegenüber ionisierender Strahlung hin. Die genaueren Ursachen der unterschiedlich großen Strahlenempfindlichkeiten waren letztendlich durch den Koloniebildungstest alleine nicht zu ermitteln.

Bei der Glioblastomzelllinie MO59J wurde ein linearer Verlauf der Überlebenskurve (ohne initiale „Schulter“) erkannt, was für eine schnelle Abtötungskinetik spricht und diese Zelllinie als äußerst strahlensensibel ausweist. Beim Vergleich der isogenen Zelllinien MO59J und MO59K wurden in den Koloniebildungstests deutliche Unterschiede der SF2-Werte beobachtet. MO59K ($SF2=0,42$) wies dabei einen um den Faktor 7 höheren SF2-Wert auf als sein strahlensensibler Partner MO59J ($SF2=0,06$). Dieses Ergebnis bestätigt damit qualitativ die bereits in der Literatur beschriebenen Verhältnisse bei diesen beiden Zelllinien, wo ein Faktor von 30 beschrieben wurde [Allalunis-Turner et al., 1995]. Da für die Zelllinie MO59J Defekte der Proteinkinasen DNA-PK und ATM nachgewiesen wurden, liegt die Vermutung nahe, dass dieser DNA-Reparaturdefekt als Ursache der sehr unterschiedlichen Empfindlichkeitsgrade gegenüber einer Bestrahlung angesehen werden kann. Dieser Verdacht kann durch Herannahme der Zelllinie AT erhärtet werden, denn auch diese Zelllinie hatte bei einem bekannten Defekt der ATM-Kinase einen kleinen SF2-Wert von nur 0,17 und zudem eine sehr steil abfallende Überlebenskurve. Bestrahlungsdosen oberhalb von 3 Gray führten bei dieser Linie zu keiner Koloniebildung mehr. Eine hinreichende Begründung für diese Thesen kann jedoch alleine durch die Ergebnisse der Koloniebildungstests nicht gegeben werden. Aus diesem Grund wurden die DNA-Reparaturprozesse der entsprechenden Linien mittels der Detektion von $\gamma H2AX$ untersucht.

4.3 Diskussion der Ergebnisse der $\gamma H2AX$ -Detektion

Die strahlenbedingten DNA-Doppelstrangbrüche wurden mit Hilfe des Histons $\gamma H2AX$ als Surrogatmarker untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse in Hinblick auf die

Induktion, die Kinetik der Reparatur sowie die restlichen γ H2AX-Foci und γ H2AX-Hintergrundwerte als auch in Hinblick auf Korrelationen zu den Ergebnissen der Koloniebildungstests diskutiert.

4.3.1 Hintergrundfluoreszenz von γ H2AX

Die γ H2AX-Hintergrundfluoreszenzintensitäten bei den unbestrahlten Zelllinien waren bei vorliegender Malignität signifikant höher als bei den nicht-entarteten Fibroblastenzelllinien (Abbildungen 3.5 und 3.6). Dies galt auch unter Berücksichtigung der Ploidiegrade der untersuchten Zelllinien. Tumorzelllinien scheinen folglich auch ohne äußere Schädigung das Histon γ H2AX in einem höheren Ausmaß zu exprimieren als dies bei Fibroblastenzelllinien der Fall ist. Bereits an anderer Stelle [MacPhail et al., 2003b; Banáth et al., 2004; Yu et al., 2006] konnte das Phänomen einer unterschiedlich hohen γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz bei verschiedenen Zelllinien beschrieben werden. Warters et al. [2005] fanden in Übereinstimmung mit den hier gefundenen Resultaten beim Vergleich einer Melanomzelllinie mit einer nicht-entarteten Melanozytenzelllinie ebenso wesentlich höhere γ H2AX-Hintergrundwerte bei vorliegender Malignität. Von McManus et al. [2005] wurden darüber hinaus bei unbestrahlten Zellen größere (reparaturassoziierte) und multiple kleinere (nicht reparaturassoziierte) γ H2AX-Foci, die zusammen das Korrelat der γ H2AX-Hintergrundfoci bilden, erkannt. Als Ursache der sich unterscheidenden γ H2AX-Hintergrundwerte kommen dabei möglicherweise zelllinienabhängige Chromosomeninstabilitäten, Unterschiede im Kernstoffwechsel oder zellzyklusbedingte Aktivitäten der verschiedenen Linien in Frage [MacPhail et al., 2003b; Yu et al., 2006]. Nach den Ergebnissen von Yu et al. [2006] und Tanaka et al. [2006] kommt auch dem p53-Status einer Zelllinie ein wesentlicher Einfluss auf ihre γ H2AX-Hintergrundwerte zu, wobei p53-Wildtypen weniger γ H2AX-Hintergrundfoci als p53-Mutanten aufwiesen. Die genaueren Ursachen und Auswirkungen der sich stark unterscheidenden γ H2AX-Hintergrundwerte sind alleine aus den hier gewonnenen Daten allerdings nicht zu klären. Hervorzuheben ist jedoch, dass die γ H2AX-Fluoreszenzwerte in Hinblick auf die Hintergrundfluoreszenz stark von der untersuchten Zelllinie und insbesondere von ihrer Dignität abzuhängen scheinen.

Problematisch in diesem Zusammenhang war die Einschränkung der Messgenauigkeit der strahleninduzierten γ H2AX-Foci durch vorhandene γ H2AX-Hintergrundfoci. Besonders bei der Detektion sehr geringer Focizahlen, vor allem bei der Bestimmung der residuellen γ H2AX-Fluoreszenz, wirkte sich die γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz störend auf die Detektion aus. Dieses Messproblem wurde bereits von Banáth et al. [2004] und Yu et al. [2006] in ähnlicher Weise beschrieben. Die γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz beeinflusst dabei die Detektion der nach längerer Zeit noch nicht reparierten DNA-Schäden, da es zu einer Interferenz beider γ H2AX-Foci kommt. Gerade dieser Aspekt stellt auch eine mögliche Erklärung für die signifikant unterschiedlichen mittleren Standardabweichungen der Reparaturhalbwertszeiten von γ H2AX-Foci bei Tumorzelllinien im Vergleich zu Fibroblastenzelllinien dar (Tabelle 3.6).

4.3.2 γ H2AX-Verlauf bei steigenden Bestrahlungsdosen

Mit zunehmenden Bestrahlungsdosen konnte, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, bei allen Zelllinien ein dosisabhängiger Anstieg der Fluoreszenzintensität von γ H2AX erkannt werden. Aus den gewonnenen Daten wurden Regressionsgeraden generiert, deren Steigungswerte von Zelllinie zu Zelllinie zum Teil deutliche Unterschiede aufwiesen (Abbildung 3.8 und 3.9). Auch in anderen Arbeiten wurde ein linearer Zusammenhang bzw. eine positive Korrelation zwischen der Bestrahlungsdosis und der γ H2AX-Menge gefunden [Rogakou et al., 1998; MacPhail et al., 2003a; Olive et al., 2003; Banáth et al., 2004]. Erst bei sehr hohen Bestrahlungsdosen, die in der vorliegenden Arbeit aus Gründen der fehlenden klinischen Relevanz nicht appliziert wurden, kam es zu einer Abflachung dieser Ausgleichsgeraden [MacPhail et al., 2003a]. Durch diese Ergebnisse lässt sich zumindest indirekt die Annahme bestätigen, dass pro Gray jeweils eine bestimmte, von der Anzahl gebildeter DNA-DSB abhängige Menge an γ H2AX gebildet wird. Weiterhin decken sich diese Ergebnisse mit der Vermutung, dass pro Gray nur ein bestimmter Teil der vorhandenen H2AX-Moleküle phosphoryliert wird [Rogakou et al., 1998]. Insgesamt konnten hier keine Unterschiede zwischen den mittleren, γ H2AX-basierten Steigungswerten bei Tumorzelllinien und Fibroblastenzelllinien erkannt werden. Dies wiederum spricht, unter Beachtung der eingeschränkten Anzahl von untersuchten Zelllinien, prinzipiell gegen eine veränderte γ H2AX-Bildung bei malignen

im Vergleich zu nicht-transformierten Zelllinien. Ebenso konnten weder hier noch bei MacPhail et al. [2003a] und Banáth et al. [2004] Korrelationen zwischen den klonogenen Überlebensraten des Koloniebildungstests bzw. der Strahlensensibilität und den ermittelten Steigungen, basierend auf γ H2AX, gefunden werden. Anhand der momentan vorliegenden Datenlage scheint die dosisabhängige Steigung der γ H2AX-Fluoreszenz bei verschiedenen Zelllinien trotz zelllinienabhängiger Unterschiede kein guter Prädiktionswert für die Strahlensensibilität einer Zelllinie zu sein.

4.3.3 Induktion von γ H2AX nach Bestrahlung

Beim Vergleich der mittleren, 30 Minuten nach der Bestrahlung ermittelten γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten wurden, wie in Kapitel 3.2.3 dargestellt, ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien erkannt. Diese Unterschiede bestanden auch nach Berücksichtigung der Ploidiegrade und der γ H2AX-Hintergrundfluoreszenzwerte weiter fort (Tabelle 3.5). Während es bei MO59K gerade einmal zu einer Verdopplung der γ H2AX-Intensität nach 2 Gray und 30 Minuten Reparaturzeit kam, fand sich bei MCF7 eine annähernd 6 mal so hohe Fluoreszenzintensität unter identischen Bedingungen. Trotz gleicher Bestrahlungsdosen reagierten folglich einige Zelllinien, gemessen an ihrer γ H2AX-Fluoreszenz, viel stärker auf diese Noxe als andere. Unter der Annahme, dass jeder γ H2AX-Focus genau einem strahleninduzierten DNA-DSB entspricht [Sedelnikova et al., 2002] sowie dieselbe Fluoreszenzintensität aufweist, müsste bei vergleichbarem Chromatingehalt aus statistischen Gründen dieselbe Anzahl von DNA-DSB [Cedervall et al., 1995] und somit auch γ H2AX-Foci pro Gray entstehen. Die Annahme einer pro Bestrahlungsdosis und Chromatingehalt identischen Induktion von γ H2AX-Foci deckt sich jedoch nicht mit den bei uns gefundenen Ergebnissen. Unsere Resultate stützen hingegen die These einer stark zelllinienbestimmten Bildung von γ H2AX. Auch Banáth et al. [2004] erkannten eine stark zelllinienabhängige γ H2AX-Focusbildung. Dies wurde ebenso von Zhou et al. [2006] bestätigt, die durch Auszählen der γ H2AX-Foci ebenfalls eine stark zelllinienabhängige Induktion von γ H2AX nach Einwirkung verschiedener genotoxischer Agenzien wie Chemikalien oder Hitze erkannten.

Worin die Ursache dieser linienspezifischen Unterschiede bei der Bildung von γ H2AX nach Bestrahlung zu finden ist, bleibt weiterhin zu eruieren. Zum einen könnte eine pro Bestrahlungsdosis und Chromatingehalt unterschiedlich hohe Anzahl induzierter DNA-DSB dafür verantwortlich sein, was auch aufgrund unterschiedlicher Chromatinstrukturen und Kompaktierungsgrade der DNA durchaus denkbar wäre. So wurde von Kelland et al. [1988] sowie McMillan et al. [1990] eine unterschiedlich hohe Zahl induzierter DNA-DSB bei identischer Bestrahlungsdosis und verschiedenen Zelllinien beschrieben. Djuzenova et al. [2006] fanden eine positive Korrelation zwischen der Chromatinkompaktierung, gemessen anhand der HDAC5-Expression, und der Induktion von γ H2AX bei den hier verwendeten Zelllinien. Ein weiterer Grund könnte auch in unterschiedlichen Aktivitätsgraden der PIKK-Kinasen zu finden sein. Auf der anderen Seite konnten wir bei den Zelllinien MO59J und AT, beides Linien mit defekten PIKK-Kinasen, jeweils eine suffiziente Phosphorylierung des Histons γ H2AX nachweisen.

Insbesondere eine sich von Zelllinie zu Zelllinie unterscheidende Gesamtmenge an H2AX [Rogakou et al., 1998] wäre ebenso in der Lage, die Intensität induzierter γ H2AX-Foci wesentlich zu beeinflussen. Je mehr γ H2AX pro Focus entstünde, desto stärker wäre die gemessene Fluoreszenzintensität. Auch MacPhail et al. [2003a] kamen zu vergleichbaren Ergebnissen wie den von uns beschriebenen. Aber auch die von Han et al. [2006] publizierten Resultate bieten eine Möglichkeit zur Erklärung der unterschiedlichen γ H2AX-Mengen im Anschluss an eine Bestrahlung. In dieser Arbeit [Han et al., 2006] konnten strahlungsinduzierte, jedoch von DNA-DSB unabhängige γ H2AX-Foci nachgewiesen werden. Dadurch könnten trotz identischer Mengen an DNA-DSB pro Gray und Chromatinmenge unterschiedlich hohe γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Bei Han et al. [2006] konnten diesbezüglich ebenfalls stark zelllinienabhängige Unterschiede erkannt werden. Sofern sich diese Ergebnisse weiter bestätigen, wäre allerdings der Wert von γ H2AX als Verlaufsmarker für DNA-DSB durchaus eingeschränkt. Aus den von uns und an anderer Stelle [MacPhail et al., 2003a; Banáth et al., 2004; Han et al., 2006; Zhou et al., 2006] gewonnenen Resultaten kann somit gefolgert werden, dass nicht alleine die äußere Noxe die Induktion von γ H2AX bzw. die Intensität der entsprechenden Foci bestimmt, sondern ein wesentlicher Einfluss in diesem Prozess der untersuchten Zelllinie selbst zukommt.

Des Weiteren haben wir gezeigt, dass die strahleninduzierten γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten nicht mit den SF2-Werten der Koloniebildungstests korrelieren. Auch an anderer Stelle [MacPhail et al., 2003a; Olive et al., 2003; Banáth et al., 2004] konnten keine entsprechenden Korrelationen gefunden werden. Die von uns als auch von anderen Autoren [MacPhail et al., 2003a; Olive et al., 2003; Banáth et al., 2004] gefundenen Ergebnisse widersprechen diesbezüglich den von El-Awady et al. [2003] publizierten Resultaten. Bei El-Awady et al. [2003] wurde eine Korrelation zwischen den gelelektrophoretisch gemessenen induzierten DNA-DSB und den SF2-Werten der Koloniebildungstests erkannt. Dies galt jedoch nur für Tumorzelllinien [El-Awady et al., 2003]. Interessanterweise konnten Dikomey et al. [1998] aus derselben Arbeitsgruppe wie El-Awady und unter Verwendung derselben Verfahrensweisen (CFGE, GFGE) eine Korrelation zwischen den residuellen DNA-DSB und den SF2-Werten, nicht hingegen zwischen den induzierten DNA-DSB und den SF2-Werten finden. Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass trotz Anwendung derselben Methodik sogar innerhalb einer Arbeitsgruppe widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden. Diese Widersprüche [Dikomey et al., 1998; El-Awady et al., 2003] verdeutlichen die Schwierigkeit, die sich erst beim Vergleich zwischen den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen und Methoden ergeben. Die verwendeten gelelektrophoretischen Verfahren sind in Hinblick auf die Sensitivität der Detektion von γ H2AX unterlegen und benötigen in der Regel Bestrahlungsdosen oberhalb von 20 Gray im Gegensatz zu den maximal angesetzten 4 Gray in der vorliegenden Arbeit. Weiterhin kann mittels γ H2AX lediglich indirekt der Nachweis von DNA-DSB erfolgen, während die elektrophoretischen Verfahren direkt die DNA-DSB nachweisen können. In Anbetracht der widersprüchlichen Korrelationen gegenüber den SF2-Werten [Dikomey et al., 1998; El-Awady et al., 2003], muss ferner auch die Wertigkeit des SF2-Wertes als Vergleichsparameter kritisch hinterfragt werden.

4.3.4 Reparatur und Abbau von γ H2AX-Foci

Vergleicht man die Abbaukinetiken der induzierten γ H2AX-Foci miteinander, so gab es einerseits Zelllinien, die γ H2AX sehr rasch eliminieren konnten. Dies war zum Beispiel bei der Linie MCF7 ($59,2 \pm 9,3$ Min) der Fall. Auf der anderen Seite gab es Zelllinien, wie beispielsweise die Linie HS8 ($439,9 \pm 54,2$ Min), die wesentlich länger für den

Abbau der induzierten γ H2AX-Foci benötigten. Bei den untersuchten Zelllinien unterschieden sich die mittleren Halbwertszeiten des Abbaus von γ H2AX bei Tumorzelllinien kaum von denen bei Fibroblastenzelllinien. Beim Vergleich des bei den Einzelversuchen ermittelten γ H2AX-Abbaus fielen die intraindividuellen Unterschiede im Gegensatz zu den interindividuellen Unterschieden deutlich geringer aus. Jede einzelne Zelllinie besitzt demzufolge eine spezifische Kinetik des γ H2AX-Abbaus. Letztendlich scheint somit auch die Abbaukinetik von γ H2AX, ähnlich wie auch sein Hintergrundwert und die Induktion, einen für jede Zelllinie charakteristischen Parameter darzustellen. Dies bestätigt die Ergebnisse von Banáth et al. [2004], die eine ebenso linienabhängige Verlaufskinetik dieses Markers beschrieben haben.

Beim Vergleich der γ H2AX-Halbwertszeiten mit den SF2-Werten konnten keine Korrelationen zwischen beiden Parametern gefunden werden. Die klonogene Überlebensrate einer Zelllinie konnte damit nicht anhand der γ H2AX-Reparaturhalbwertszeit abgeschätzt werden. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu den an anderer Stelle gefundenen Ergebnissen. Von MacPhail et al. [2003a] bzw. Banáth et al. [2004] wurden Korrelationen zwischen den SF2-Werten und der γ H2AX-Reparaturhalbwertszeiten mit Korrelationskoeffizienten von 0,66 [MacPhail et al., 2003a] bzw. 0,75 [Banáth et al., 2004] gefunden. Bei Banáth et al. [2004] wurde allerdings nur dann eine Korrelation erkannt, sobald die sechs untersuchten Zelllinien in eine größere Grundgesamtheit weiterer Tumorzelllinien integriert wurden und zusätzlich noch der p53-Status aller verwendeten Zelllinien berücksichtigt wurde. Der Widerspruch zwischen unseren Ergebnissen und denen von MacPhail et al. [2003a] sowie Banáth et al. [2004] kann dabei durch mehrere Faktoren verursacht worden sein. Zum einen unterscheiden sich die verwendeten Zelllinien hinsichtlich ihrer Strahlensensibilitäten als auch bezüglich vorhandener Reparaturenzymdefekte voneinander. In der vorliegenden Arbeit wurde im Vergleich zu den anderen Arbeiten mit 40% ein vergleichsweise hoher Anteil strahlensensibler Zelllinien, zum Teil mit Enzymdefekten der ATM und DNA-PK verwendet. Auch die Zeiträume, die der Detektion zugrunde gelegt wurden, unterschieden sich je nach Experiment von den hier verwendeten Zeiten, was letztendlich ebenfalls eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert. So lagen die entsprechende Beobachtungszeiträume der DNA-Reparatur bei MacPhail et al. [2003a] lediglich bei 6 Stunden. In diesem Zeitrahmen ist die Reparatur der induzierten

Schäden noch lange nicht abgeschlossen. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund mit 18 Stunden ein wesentlich längerer Beobachtungszeitraum des γ H2AX-Abbaus gewählt. Auch die jeweils angesetzten Bestrahlungsdosen differierten zwischen den einzelnen Arbeiten bzw. Versuchen. Banáth et al. [2004] und MacPhail et al. [2003a] verwendeten in ihren Arbeiten Bestrahlungsdosen von bis zu 50 Gray. Diese Dosen gehen weit über die klinisch verwendeten Bereiche hinaus und beeinflussen in hohem Maße das Überleben der Testzellen. Bei uns wurde aus diesen Gründen mit klinisch relevanten Dosen von maximal 2-4 Gray bestrahlt. Auch die Nachweisverfahren von γ H2AX stellen eine wichtige Ursache für die Unterschiede der hier diskutierten Arbeiten dar. Während bei uns [Mahrhofer et al., 2006] die γ H2AX-Fluoreszenzintensität für jedes einzelne Fluoreszenzbild direkt mittels der Bildanalyse im Computer bestimmt wurde, erfolgte die Bestimmung der γ H2AX-Fluoreszenz bei Banáth et al. [2004] schwerpunktmäßig durch die FACS-Analyse. Im Unterschied zur Bildanalyse können mittels FACS wesentlich mehr Zellen analysiert werden, mit dem Nachteil, dass keine Informationen über die Anzahl der Foci sowie deren Größe gewonnen werden kann. Die Bildanalyse bietet hingegen den Vorteil einer gewissen Auswahl der detektierten Zellen und den direkten Ausschluss "inakzeptabler" z.B. apoptotischer Zellen. Ein weiterer Grund für die sich widersprechenden Ergebnisse zwischen Banáth et al. [2004] und unserer Arbeit könnte im p53-Status der untersuchten Zelllinien begründet sein. So konnte beim Vergleich verschiedener Zelllinien nur dann eine Korrelation zwischen den SF2-Werten und der γ H2AX-Kinetik gefunden werden, wenn ihr p53-Status (p53-Wildtyp gegenüber p53-Mutante) identisch war [Banáth et al., 2004]. Dabei hatten p53-Mutanten eine erhöhte Strahlenresistenz gegenüber den p53-Wildtypen. Da der p53-Status in unserer Arbeit keine Berücksichtigung fand, könnte auch hier ein Grund für die gefundenen Abweichungen liegen.

4.3.5 Restliche Menge von γ H2AX nach 18 Stunden Reparaturzeit

Nach 18 Stunden Reparaturzeit fanden sich in den untersuchten Zelllinien noch sehr unterschiedlich große Mengen an γ H2AX-Foci. MCF7 konnte innerhalb dieser Zeit annähernd 80% der induzierten γ H2AX-Foci abbauen, MO59J hingegen nur knapp 40%. Die Reparaturfähigkeit der einzelnen Zelllinien unterschied sich somit deutlich voneinander (Kapitel 3.2.4). Auch in diesem Fall erweist sich das Histon γ H2AX als

zelllinienabhängiger Marker. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus anderen Arbeiten überein [MacPhail et al., 2003a; Banáth et al., 2004; Taneja et al., 2004]. Die restliche Menge von γ H2AX korrelierte dabei nicht mit den SF2-Werten der Koloniebildungstests. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch El-Awady et al. [2003] unter Anwendung elektrophoretischer Verfahren zur direkten Messung vorhandener DNA-Doppelstrangbrüche. Bei Dikomey et al. [2000] konnten entsprechende Korrelationen nur zwischen den residuellen DNA-DSB und den SF3,5-Werten, nicht jedoch den SF2-Werten gefunden werden. An anderer Stelle wurden wiederum Korrelationen zwischen den residuellen DNA-DSB [Wurm et al. 1994, Dikomey et al., 1998] bzw. γ H2AX-Foci [Banáth et al. 2004; Klovov et al. 2006] und den SF2-Werten erkannt. Gerade da sich die einzelnen Versuchsansätze insbesondere hinsichtlich ihrer Methodik und Messzeiträume sowie den verwendeten Zelllinien unterscheiden, kann aus der zur Zeit vorliegenden Datenlage keine ausreichend sichere Aussage darüber gemacht werden, ob die residuellen DNA-Schäden bzw. γ H2AX-Foci als Prädiktor für die Strahlensensibilität einer Zelllinie dienen können. Auch was die Frage residueller Schäden der DNA betrifft, bleibt noch zu klären, inwieweit die gemessenen γ H2AX-Mengen mit DNA-DSB assoziiert sind oder nicht. Bereits Banáth et al. [2004] konnten beim Vergleich zwischen den tatsächlich vorhandenen DNA-Schäden via Comet-Assay und dem Histon γ H2AX nachweisen, dass bei vollständiger Reparatur aller DNA-Schäden, gemessen mittels Comet-Assay, noch immer eine 10-fach erhöhte γ H2AX-Fluoreszenz vorhanden war. Auch Suzuki et al. [2006] fanden eine Persistenz von γ H2AX-Foci trotz stattgehabter DNA-Reparatur. Diese Entdeckungen relativieren die Bedeutung der residuellen γ H2AX-Fluoreszenzwerte als Korrelat für verbliebene DNA-Doppelstrangbrüche. Sie können ebenfalls zur Erklärung der sich widersprechenden Korrelationen zwischen den γ H2AX-Halbwertszeiten und den SF2-Werten der Koloniebildungstests bei MacPhail et al. [2003a] bzw. Banáth et al. [2004] und unserer Arbeit herangezogen werden. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist auch die Messmethodik und die Interferenz mit der zelllinienabhängigen Hintergrundfluoreszenz bei der Detektion der residuellen γ H2AX-Foci, wie es bereits im Kapitel zur Hintergrundfluoreszenz beschrieben wurde.

4.3.6 Einflüsse der PIKK-Kinasen auf die Induktion und den Verlauf von γ H2AX am Beispiel der Zelllinien MO59J, MO59K und AT

Der Vergleich der beiden Glioblastomzelllinien MO59J und MO59K war insbesondere aus dem Grund interessant, da beide von demselben Tumorgewebe stammen, folglich isogen sind, aber unterschiedliche Strahlensensibilitäten aufweisen [Allalunis-Turner et al., 1995]. Bei der Zelllinie MO59J wurde ein Defekt einer Untereinheit der PIKK-Kinase DNA-PK beschrieben [Allalunis-Turner et al., 1995; Lees-Miller et al., 1995]. Zusätzlich scheint MO59J noch eine stark eingeschränkte Aktivität der PIKK-Kinase ATM zu haben [Tsuchida et al., 2002; Chan et al., 1998]. Dennoch wurde von Stiff et al. [2004] die verbleibende ATM-Menge in MO59J-Zellen als noch ausreichend für eine suffiziente Phosphorylierung von H2AX, Rad17 und p53 beschrieben. Mittels beider isogener Zelllinien kann auf Grund dieser Besonderheiten der Einfluss verschiedener PIKK-Kinasen auf die strahleninduzierte DNA-DSB-Reparatur bzw. die γ H2AX-Foci-Kinetik beobachtet werden. Beim Vergleich der γ H2AX-Fluoreszenzintensitätswerte beider Zelllinien konnten jedoch bei den meisten hier durchgeführten Versuchsansätzen keine großen Unterschiede zwischen beiden Glioblastomzelllinien erkannt werden. Dies galt sowohl für die dosisabhängige γ H2AX-Fluoreszenz bzw. die Kurvensteigungen (Abbildung 3.8) als auch für die zeitabhängige Reparaturkinetik (Abbildung 3.12). Beim Vergleich der residuellen γ H2AX-Foci (18-Stundenwerte) hatte MO59J ca. 17% mehr γ H2AX-Reste als dies bei MO59K der Fall war (Tabelle 3.7). Größere Differenzen konnten allerdings durch den Vergleich der γ H2AX-Induktion erkannt werden. Interessanterweise wies die Linie MO59J, anders als alle anderen getesteten Zelllinien, die maximale γ H2AX-Fluoreszenzintensität nicht bereits 30 Minuten nach Bestrahlung, sondern erst 4 Stunden im Anschluss an diese auf (Abbildung 3.12). MO59K zeigte hingegen bereits wesentlich früher, d.h. nach 30 Minuten Reparaturzeit, seine maximale γ H2AX-Fluoreszenzintensität. Die Maximalfluoreszenz war dabei bei der Zelllinie MO59J (4-Stundenwert) um den Faktor 1,4 höher als dies bei MO59K (30-Minutenwert) der Fall war.

Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass die Induktion von γ H2AX-Foci bzw. die Dauer der Phosphorylierung von H2AX einen von den PIKK-Kinasen wie der ATM und DNA-PK abhängigen Prozess darstellt. Dadurch wird die über die Zeit gemessene

γ H2AX-Fluoreszenz von der PIKK-Kinasenaktivität mitbestimmt. Gleichzeitig stimmen diese Resultate aber auch mit der Überlegung überein, dass außer der DNA-PK bzw. ATM-Kinase noch andere Kinasen für eine suffiziente Phosphorylierung von γ H2AX in Frage kommen, was anhand der Linie MO59J, aber auch der ATM-defekten Linie AT zu erkennen ist. Die PIKK-Kinasen scheinen für den DNA-Reparaturprozess selbst nach den hier gewonnenen Resultaten eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Dies kommt durch ähnliche Reparaturzeiten bei den beiden isogenen Zelllinien (MO59J, MO59K) sowie der Linie AT zum Ausdruck. Die hier gefundene retardierte γ H2AX-Anstiegsgeschwindigkeit als auch eine relativ normale Reparaturkinetik bei MO59J ist sowohl mit der Annahme einer eingeschränkten [Lees-Miller et al., 1995; Tsuchida et al., 2002; Chan et al., 1998] als auch mit der Annahme einer ausreichenden PIKK-Kinasenaktivität [Stiff et al., 2004] in Einklang zu bringen. So wäre es denkbar, dass die MO59J-Linie im Rahmen einer verminderten Enzymaktivität, möglicherweise auch infolge einer Sättigung der für die Phosphorylierung verantwortlichen Kinase(n) mehr Zeit benötigt, um die maximale Menge an γ H2AX nach der Schädigung zu erreichen. Auch bei der Zelllinie AT konnte, analog zu MO59J, trotz defekter ATM-Kinase (aber ausreichend vorhandener DNA-PK) eine normale γ H2AX-Induktion sowie ein normaler Abbau von γ H2AX erfolgen. Andere Autoren kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie sie von uns [Mahrhofer et al., 2006] beim Vergleich von MO59J und MO59K gefunden wurden. So konnten auch Wang et al. [1997] im Nucleoid-Halo-Assay sehr ähnliche Verläufe bei beiden Zelllinien im Anschluss an eine Bestrahlung erkennen [Wang et al., 1997]. Auch Cheong et al. [1999], die die Reparatur von strahlenbedingten Doppelstrangbrüchen bei MO59J untersuchten, konnten keine verminderte Reparaturfähigkeit bei dieser DNA-PK-defekten Linie finden. Sie erklärten diese Tatsache durch das Vorhandensein multipler Reparaturwege, die auch unabhängig von der DNA-PK funktionieren, als auch durch die fragliche Funktion der DNA-PK in der direkten Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen [Cheong et al., 1999]. Auch Stiff et al. [2004] konnten nach der Bestrahlung von MO59J-Zellen eine mit MO59K vergleichbare H2AX-Phosphorylierung nachweisen. In dieser Arbeit [Stiff et al., 2004] wurde eine ausreichende Phosphorylierung von H2AX durch ATM als auch durch DNA-PK alleine erkannt. Nur beim gleichzeitigen sowie vollständigen Ausfall beider Kinasen konnte H2AX nicht mehr ausreichend phosphoryliert werden [Stiff et al., 2004].

Letztendlich konnte auch bei Wang et al. [2005] eine robuste Phosphorylierung von H2AX in ATM- oder DNA-PK-defekten Zelllinien (insbesondere MO59J) belegt werden. Auch in dieser Arbeit wurde, ähnlich wie bei den hier vorgestellten Ergebnissen, eine retardierte Phosphorylierung von H2AX bei Defekten bzw. Defizienzen der Kinasen ATM und DNA-PK erkannt.

Die hier gewonnenen Ergebnisse widersprechen andererseits denjenigen von Paull et al. [2000], die mittels gelelektrophoretischen Methoden ebenfalls einen Vergleich zwischen den beiden Zelllinien MO59J und MO59K durchführten. Sie erkannten eine stark verminderte H2AX-Phosphorylierung bei MO59J im Anschluss an die Bestrahlung, während MO59K initial hohe Mengen an phosphoryliertem γ H2AX zeigte [Paull et al., 2000]. Sie führten dieses Ergebnis auf die defekten PIKK-Kinasen (DNA-PK und ATM) und folglich einer unzureichenden γ H2AX-Bildung zurück. Die Unterschiede zur vorliegenden Arbeit können allerdings durch die andersartigen Versuchsbedingungen begründet sein, denn die Zelllinien bei Paull et al. [2000] wurden aus versuchstechnischen Gründen mit extrem hohen Dosen von bis zu 200 Gray bestrahlt. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen klinisch relevante Dosen von maximal 2 bzw. 4 Gray angesetzt. Zudem erfolgte bei Paull et al. [2000] der Versuch in eiskalter Pufferlösung, ein Umstand, der deutlich die Vitalität der Zellen, insbesondere der strahlensensiblen Linie MO59J, beeinflusst. Bei uns erfolgten die Versuche daher bei Raumtemperatur und dadurch unter wesentlich schonenderen Bedingungen. Des Weiteren zeigt die gelelektrophoretische Auswertung eine wesentlich geringere Sensitivität als die fluoreszenzvermittelte Detektion von γ H2AX in der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen.

Unter Berücksichtigung der hier erhaltenen und den in der Literatur gefundenen Ergebnissen [Stiff et al., 2004] scheinen gleich mehrere Kinasen eine suffiziente Phosphorylierung des Histons H2AX bewerkstelligen zu können. Dies konnte vor allem anhand der gut nachweisbaren Phosphorylierung von H2AX in den Zelllinien MO59J und AT gezeigt werden. Die verminderten klonogenen Überlebensraten der Zelllinien AT sowie MO59J in den Koloniebildungstests scheinen somit nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der H2AX-Phosphorylierung zu stehen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Histonvariante H2AX wird infolge von DNA-Doppelstrangbrüchen durch PIKK-Kinasen wie ATM, ATR oder DNA-PK zum aktivierten γ H2AX phosphoryliert. Das phosphorylierte Molekül interagiert mit zahlreichen DNA-Reparaturassoziierten Proteinen, unterstützt deren Ansammlung in der Umgebung eines DNA-Doppelstrangbruches und ist essentiell für die Persistenz gebildeter Reparaturkomplexe am Ort der DNA-Läsion. Die fluoreszenzbasierte Detektion von γ H2AX-Foci, Ansammlungen von tausenden γ H2AX-Molekülen in der Umgebung eines DNA-Doppelstrangbruches, kann durch unterschiedliche Verfahren wie die FACS-Analyse, die Einzelbildanalyse oder durch manuelles Auszählen der γ H2AX-Foci erfolgen und stellt ein sehr sensitives Nachweisverfahren von DNA-Doppelstrangbrüchen dar.

Die Wertigkeit dieses Markers zur Bestimmung der Strahlensensibilität sowie sein Bezug zur Dignität der getesteten Zelllinien ist jedoch noch nicht ausreichend erforscht und stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Untersucht wurde dabei eine sehr heterogene Gruppe aus 5 Tumor- sowie 5 Fibroblastenzelllinien. Unter den Tumorzelllinien befanden sich ein Mammakarzinom (MCF7), ein Fibrosarkom (HT1080), ein Malignes Melanom (Colo800) und die isogenen, aber unterschiedlich strahlensensiblen Glioblastomzelllinien MO59J und MO59K. Zu den 5 Fibroblastenzelllinien gehörten HFIB1 und HFIB2 als Zelllinien von gesunden Probanden, HS5 und HS8 von Brustkrebspatientinnen mit überdurchschnittlich starken Strahlenreaktionen der Haut sowie die Zelllinie AT mit einer bekannten Mutation des AT-Gens.

Die Überlebensraten dieser 10 Zelllinien wurden durch den Koloniebildungstest ermittelt. Der dosis- und zeitabhängige Verlauf strahleninduzierter γ H2AX-Foci wurde anhand der durch die Einzelbildanalyse ermittelten Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Es wurden klinisch relevante Bestrahlungsdosen von 1-4 Gray angesetzt. Die Reparatur der DNA-Schäden nach erfolgter Bestrahlung wurde über 18 Stunden verfolgt.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit können im Wesentlichen durch die folgenden 5 Punkte wiedergegeben werden :

1. Anhand der Koloniebildungstests und den dabei ermittelten SF2-Werten wurde ein großes Spektrum an Strahlensensibilitäten bzw. klonogenen Überlebensraten bei den

getesteten Zelllinien erkannt. Die SF2-Werte bewegten sich zwischen 0,06 (MO59J) und 0,63 (Colo800). Zelllinien mit eingeschränkter Aktivität ihrer PIKK-Kinasen wie AT und MO59J hatten die geringsten SF2-Werte.

2. Die Induktion, der zeitliche Verlauf sowie die restliche Menge von γ H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche zeigten innerhalb einer Zelllinie eine hohe Konstanz. Für jede der betrachteten Zelllinien konnte auf dieser Basis eine charakteristische und linienspezifische Induktion und Abbaukinetik von γ H2AX bestimmt werden. Die Verläufe des Markers γ H2AX konnten dabei keinen Bezug zur Dignität der untersuchten Zelllinien erkennen lassen.
3. Beim Vergleich von Tumorzelllinien und Fibroblastenzelllinien fiel eine signifikant höhere γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz bei bestehender Malignität der Zelllinien auf. Worin die Ursache dafür zu finden ist, ist letztlich noch nicht hinreichend geklärt und sicher ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen. Auch die Ausprägung der γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz scheint ein zelllinienspezifisches Charakteristikum zu sein, das in Hinblick auf die Detektion von γ H2AX als nicht zu vernachlässigende Fehlerquelle beachtet werden muss.
4. Wurden die isogenen, aber unterschiedlich strahlensensiblen Linien MO59J und MO59K miteinander verglichen, so fiel eine deutlich retardiert auftretende γ H2AX-Maximalfluoreszenz bei MO59J im Vergleich zu MO59K auf. Auf der anderen Seite konnten sowohl MO59J mit defekter DNA-PK und eingeschränkter ATM-Kinase als auch die AT-Linie mit einem Defekt der ATM-Kinase das Histon H2AX suffizient zu γ H2AX phosphorylieren. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass noch andere Kinasen außer ATM und DNA-PK in der Lage sind, das Histon H2AX in ausreichendem Umfang zu phosphorylieren.
5. Trotz der zelllinienspezifischen γ H2AX-Verläufe kann mit den gewonnenen Daten keine generelle Aussage über die Strahlensensibilität oder Dignität einer Zelllinie alleine auf Grund der γ H2AX-Verläufe getroffen werden. Zwischen den SF2-Werten der Koloniebildungstests und der Induktion, der Reparaturhalbwertszeiten, den residuellen Mengen sowie den Steigungswerten der dosisabhängigen Kurven des Markers γ H2AX konnten keine Korrelationen gefunden werden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass das Histon γ H2AX einen stark von der untersuchten Zelllinie abhängigen und ebenso zellliniencharakteristischen Verlaufsparameter darstellt. Übereinstimmend hierzu konnten auch andere Autoren wie Banáth et al. [2004] und Zhou et al. [2006] einen von der untersuchten Zelllinie abhängigen Verlauf dieses Markers nach Einwirkung verschiedener Noxen wie Hitze, Strahlung oder Chemikalien nachweisen. Es wird zudem immer deutlicher, dass dieser Marker im Unterschied zu bisher bekannten Detektionsverfahren von DNA-Schäden nicht ausschließlich den Verlauf und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen wiedergibt, sondern einer eigenen Kinetik unterliegt, die jedoch eng mit Doppelstrangbrüchen der DNA und deren Reparatur assoziiert bleibt. Das Histon γ H2AX spiegelt wahrscheinlich stärker die chromatinassoziierte DNA-Reparatur wider als dies bei allen bisherigen Detektionsverfahren für DNA-Doppelstrangbrüche der Fall ist. Vor diesem Hintergrund bleibt auch zu klären, welche Ursache und Wirkung die beschriebene dignitätsabhängige γ H2AX-Hintergrundmenge besitzt.

Die Bestimmung der Induktion, der Abbaukinetiken, der restlichen Menge sowie der Hintergrundwerte des Histons γ H2AX ermöglicht neue Wege, um die Effekte von physiko-chemischen Noxen bei verschiedenen Zelllinien, auch in therapeutisch-prädiktiver Sicht zu untersuchen. Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse darf geschlossen werden, dass das Histon γ H2AX gerade aufgrund seines linienspezifischen Verlaufs ein hohes Potential zur Analyse zelllinienabhängiger Effekte und Mechanismen infolge von DNA-schädigenden Noxen besitzt. Seine Detektion eröffnet dadurch neue Möglichkeiten bei der Suche nach prädiktiven Testverfahren als auch neuen Therapiestrategien, insbesondere auch für die Strahlentherapie. Hier könnte sich γ H2AX als patientenspezifischer Marker zur individuellen Anpassung des Therapieregimes als auch zur Entwicklung und Bewertung strahlenmodulierender Chemotherapeutika profilieren.

6 Literaturverzeichnis

Allalunis-Turner MJ, Zia PK, Barron GM, Mirzayans R, Day RS 3rd : Radiation-induced DNA damage and repair in cells of a radiosensitive human malignant glioma cell line. *Radiat Res.* 1995; 144:288-293.

Alsbeih G, Malone S, Lochrin C, Girard A, Fertil B, Raaphorst GP : Correlation between normal tissue complications and in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts derived from radiotherapy patients treated for variety of tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 46:143-152.

Ashby M : The role of radiotherapy in palliative care. *J Pain Symptom Manage.* 1991; 6:380-388.

Banáth JP, Macphail SH, Olive PL : Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* 2004; 64:7144-7149.

Bassing CH, Alt FW : The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair* 2004; 3:781-796.

Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW: Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:8173-8178.

Bauch T, Bocker W, Mallek U, Muller WU, Streffer C : Optimization and standardization of the "comet assay" for analyzing the repair of DNA damage in cells. *Strahlenther Onkol.* 1999; 175:333-340.

Begg AC : Can the severity of normal tissue damage after radiation therapy be predicted ? *PLoS Med.* 2006; 3:e440.

Begg AC, Russell NS, Knaken H, Lebesque JV : Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity in vitro with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* 1993; 64:393-405.

Bentzen SM, Overgaard J : Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Semin Radiat Oncol.* 1994; 4:68-80.

Blocher D, Pohlit W : DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of x-rays. II. Can cell death be attributed to double strand breaks? *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1982; 42:329-338.

Bradley MO, Kohn KW : X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7:793-804.

Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH : Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 1992; 339:1570-1571.

Cedervall B, Wong R, Albright N, Dynlacht J, Lambin P, Dewey WC : Methods for the quantification of DNA double-strand breaks determined from the distribution of DNA fragment sizes measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Radiat Res.* 1995; 143:8-16 ; Erratum in: *Radiat Res.* 1995; 144:122.

Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A.: Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol.* 2003; 5:675-679.

Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A : Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002; 296:922-927.

Chan DW, Gately DP, Urban S, Galloway AM, Lees-Miller SP, Yen T, Allalunis-Turner J : Lack of correlation between ATM protein expression and tumour cell radiosensitivity. *Int J Radiat Biol.* 1998; 74:217-224.

Cheong N, Perrault AR, Wang H, Wachsberger P, Mammen P, Jackson I, Iliakis G : DNA-PK-independent rejoining of DNA double-strand breaks in human cell extracts in vitro. *Int J Radiat Biol.* 1999; 75:67-81.

Chun HH, Gatti RA : Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair* 2004; 3:1187-1196.

Cox JD, Stetz J, Pajak TF : 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.* 1995; 31:1341-1346.

Dalberg K, Mattsson A, Rutqvist LE, Johansson U, Riddez L, Sandelin K : Breast conserving surgery for invasive breast cancer: risk factors for ipsilateral breast tumor recurrences. *Breast Cancer Res Treat.* 1997; 43:73-86.

Dikomey E, Brammer I, Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J : Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 46:481-490.

Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B : Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol.* 1998; 73:269-278.

Djuzenova C, Mühl B, Schakowski R, Oppitz U, Flentje M : Normal expression of DNA repair proteins, hMRE11, Rad50 and Rad51 but protracted formation of Rad50 containing foci X-irradiated skin fibroblasts from radiosensitive patients. *Br J Cancer* 2004; 90:2356-2363.

Djuzenova CS, Mahrhofer H, Oppitz U, Flentje M : Radiation-induced DNA damage, damage repair and cell-type specific response to the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, in human tumor cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Strahlentherapie und Onkologie* 2006; 182:83-83.

Djuzenova CS, Schindler D, Stopper H, Hoehn H, Flentje M, Oppitz U : Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer-prone population, using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Lab Invest.* 1999; 79:699-705.

El-Awady RA, Dikomey E, Dahm-Daphi J : Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. *Br J Cancer* 2003; 89:593-601.

Frankenberg D, Frankenberg-Schwager M, Blocher D, Harbich R : Evidence for DNA double-strand breaks as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely or densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions. *Radiat Res.* 1981; 88:524-532.

Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA : Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993; 27:1173-1179.

Han J, Hendzel MJ, Allalunis-Turner J : Quantitative analysis reveals asynchronous and more than DSB-associated histone H2AX phosphorylation after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res.* 2006; 165:283-292.

Helt CE, Cliby WA, Keng PC, Bambara RA, O'Reilly MA : Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem.* 2005; 280:1186-1192.

Hoeijmakers JH : Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411:366-374.

Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC : Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol.* 1998; 8:483-489.

Kelland LR, Edwards SM, Steel GG : Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in human cervix carcinoma cell lines of differing radiosensitivity. *Radiat Res.* 1988; 116:526-538.

Kiltie AE, Orton CJ, Ryan AJ, Roberts SA, Marples B, Davidson SE, Hunter RD, Margison GP, West CM, Hendry JH : A correlation between residual DNA double-strand breaks and clonogenic measurements of radiosensitivity in fibroblasts from preradiotherapy cervix cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997; 39:1137-1144.

Klokov D, MacPhail SM, Banáth JP, Byrne JP, Olive PL : Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays. *Radiother Oncol.* 2006; 80:223-229.

Kohn KW, Grimeg-Ewig RA : Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells. *Cancer Res.* 1973; 33:1849–1853.

Lees-Miller SP, Godbout R, Chan DW, Weinfeld M, Day RS 3rd, Barron GM, Allalunis-Turner J : Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science* 1995; 267:1183-1185.

Lett J, Caldwell I, Dean C, Alexander P : Rejoining of x-ray induced breaks in the DNA of leukaemia cells. *Nature* 1967; 214:790-792.

Löbrich M : Induction and repair of DNA double-strand breaks in human fibroblasts after particle irradiation. *Adv Space Res.* 1998; 22:551-560.

MacPhail SH, Banáth JP, Yu TY, Chu EH, Lambur H, Olive PL : Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol.* 2003a; 79:351-358.

MacPhail SH, Banáth JP, Yu Y, Chu E, Olive PL : Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. *Radiat Res.* 2003b; 159:759-767.

Mahrhofer H, Bürger S, Oppitz U, Flentje M, Djuzenova CS : Radiation induced DNA damage response and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 64:573-580.

Mannironi C, Bonner WM, Hatch CL : 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.* 1989; 17:9113-9126.

McKelvey-Martin VJ, Ho ET, McKeown SR, Johnston SR, McCarthy PJ, Rajab NF, Downes CS. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis* 1998; 13:1-8.

McManus KJ, Hendzel MJ : ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2005; 16:5013-5025.

McMillan TJ, Cassoni AM, Edwards S, Holmes A, Peacock JH : The Relationship of DNA Double-strand Break Induction to Radiosensitivity in Human Tumour Cell Lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1990; 58:427-438.

McMillan TJ, Tobi S, Mateos S, Lemon C : The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; 49:373-377.

Mirzayans R, Severin D, Murray D : Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: Implications for evaluation of clinical radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006; 66:1498-1505.

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

Munro TR : The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res*. 1970; 42:451-470.

Olive PL : The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res*. 1998; 150:42-51.

Olive PL, Banáth JP : Phosphorylation of Histone H2AX as a measure of Radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003; 58:331-335.

Olive PL, Banáth JP, MacPhail HS: Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1994; 54:3939-3946.

Oppitz U, Baier K, Wulf J, Schakowski R, Flentje M : The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *Int J Radiat Biol*. 2001; 77:105-110.

Oppitz U, Schulte S, Stopper H, Baier K, Muller M, Wulf J, Schakowski R, Flentje M : In vitro radiosensitivity measured in lymphocytes and fibroblasts by colony formation and comet assay: comparison with clinical acute reactions to radiotherapy in breast cancer patients. *Int J Radiat Biol*. 2002; 78:611-616.

Östling O, Johanson KJ : Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 123: 291-298

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

Peterson CL, Coté J : Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev.* 2004; 18:602-616.

Pöllinger B, Reuschel W, Stepan R : Strahlentherapeutische Möglichkeiten beim malignen Melanom. *Manual Maligne Melanome*, Tumorzentrum München 2000; 76-78.

Puck TT, Marcus PI : Action of X-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 1956; 103:653-666.

Radford IR : Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1986; 49:611-620.

Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W : Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12:162-169.

Rich T, Allen RL, Wyllie AH : Defying death after DNA damage. *Nature* 2000; 407:777-783.

Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM : Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 1999; 146:905-916.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM : DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998; 273:5858-5868.

Roos WP, Binder A, Bohm L : Determination of the initial DNA damage and residual DNA damage remaining after 12 hours of repair in eleven cell lines at low doses of irradiation. *Int J Radiat Biol.* 2000; 76:1493-1500.

Rothkamm K, Löbrich M : Misrepair of radiation-induced DNA double-strand breaks and its relevance for tumorigenesis and cancer treatment (Review). *Int J Oncol.* 2002; 21: 433-440.

Ruiz de Almodovar JM, Nunez MI, McMillan TJ, Olea N, Mort C, Villalobos M, Pedraza V, Steel GG : Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br J Cancer* 1994; 69:457-462.

Savitzky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali RP, Simmons A, Clines GC, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NGJ, Taylor AMR, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y : A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; 268:1749-1753.

Schratter-Sehn A : Malignant gliomas - radiotherapy. *Wien Med Wochenschr.* 2006; 156:342-345.

Schwartz JL, Rotmensch J, Giovanazzi S, Cohen MB, Weichselbaum RR : Faster repair of DNA double-strand breaks in radioresistant human tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1988; 15:907-912.

Schwartz DC, Cantor CR : Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37:67-75.

Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM : Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res.* 2002; 158:486-492.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL : A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175:184-191.

Singh NP, Tice RR, Stephens RE, Schneider EL : A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat Res.* 1991; 252:289-296.

Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA : ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2004; 64:2390-2396.

Stopper H, Boullay F, Heidland A, Vienken J, Bahner U : Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38:296-301.

Stopper H, Schinzel R, Sebekova K, Heidland A : Genotoxicity of advanced glycation end products in mammalian cells. *Cancer Lett.* 2003; 190:151-156.

Suit H : The Gray Lecture 2001: Coming technical advances in radiation oncology. *Int. J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002; 53:798-809.

Suit HD, Spiro IJ : The role of radiation in patients with soft tissue sarcomas. *Cancer Control* 1994; 1:592-598.

Suzuki M, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M : Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal human diploid cells exposed to ionizing radiation. *Radiat Res.* 2006; 165:269-276.

Tanaka T, Kurose A, Huang X, Traganos F, Dai W, Darzynkiewicz Z : Extent of constitutive histone H2AX phosphorylation on Ser-139 varies in cells with different TP53 status. *Cell Prolif.* 2006; 39:313-323.

Taneja N, Davis M, Choy JS, Beckett MA, Singh R, Kron SJ, Weichselbaum RR : Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J Biol Chem.* 2004; 279:2273-2280.

Tsuchida R, Yamada T, Takagi M, Shimada A, Ishioka C, Katsuki Y, Igarashi T, Chessa L, Delia D, Teraoka H, Mizutani S : Detection of ATM gene mutation in human glioma cell line M059J by a rapid frameshift/stop codon assay in yeast. *Radiat Res.* 2002; 158:195-201.

Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Oden A : Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996; 36:1065-1075.

Vamvakas S, Vock EH, Lutz WK : On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol.* 1997; 27:155-174.

Wang H, Wang M, Wang H, Böcker W, Iliakis G : Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J Cell Physiol.* 2005; 202:492-502.

Wang J, Hu L, Allalunis-Turner MJ, Day RD 3rd, Deen DF : Radiation-induced damage in two human glioma cell lines as measured by the nucleoid assay. *Anticancer Res.* 1997; 17:4615-4618.

Ward JF : DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988; 35:95-125.

Warters RL, Adamson PJ, Pond CD, Leachman SA : Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone H2AX foci. *J Invest Dermatol.* 2005; 124:807-817.

Wendt TG : Klinische Strahlentherapie im 19. und 20. Jahrhundert: Historie und Ausblick. *Onkologie* 2001; 24:296-298.

West MH, Bonner WM : Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* 1980; 19:3238-3245.

Woudstra EC, Roesink JM, Rosemann M, Brunsting JF, Driessen C, Orta T, Konings AW, Peacock JH, Kampinga HH : Chromatin structure and cellular radiosensitivity: a comparison of two human tumour cell lines. *Int J Radiat Biol.* 1996; 70:693-703.

Wurm R, Burnet NG, Duggal N, Yarnold JR, Peacock JH : Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994; 30:625-633.

Yu T, MacPhail SH, Banáth JP, Klokov D, Olive PL : Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair* 2006; 5:935-946.

Zaffaroni N, Orlandi L, Villa R, Bearzatto A, Rofstad EK, Silvestrini R : DNA double-strand break repair and radiation response in human tumour primary cultures. *Int J Radiat Biol.* 1994; 66:279-285.

Zaider M, Bardash M, Fung A : Molecular Damage Induced Directly and Indirectly by Ionizing Radiation in DNA. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994; 66:459-465.

Zhou C, Li Z, Diao H, Yu Y, Zhu W, Dai Y, Chen FF, Yang J : DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat Res.* 2006; 604:8-18.

Zhou PK, Sproston AR, Marples B, West CM, Margison GP, Hendry JH : The radiosensitivity of human fibroblast cell lines correlates with residual levels of DNA double-strand breaks. *Radiother Oncol.* 1998; 47:271-276.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. M. Flentje für die Möglichkeit zur Erstellung einer Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie sowie die Überlassung des interessanten Themas bedanken.

Weiterhin danke ich Frau Professor Dr. H. Stopper aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Professor Dr. D. Schindler aus dem Institut für Humangenetik sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. U. Oppitz aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie danke ich für die Überlassung der Zelllinien AT bzw. HS5 und HS8.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Priv.-Doz. Dr. Djuzenova, die zu jeder Zeit eine äußerst kompetente, immer freundliche und sehr hilfsbereite Ansprechpartnerin war und mir bei allen aufkommenden Problemen stets zur Seite stand.

Auch dem ganzen Laborteam und meinen Mitdoktoranden danke ich für eine schöne und lehrreiche Zeit im Strahlenlabor.

Meiner Familie möchte ich ganz herzlich danken für ihre ganze Unterstützung. Ohne sie wäre vieles um ein vielfaches schwerer oder gar unmöglich geworden.

Publikationsliste

1. **Mahrhofer H**, Bürger S, Oppitz U, Flentje M, Djuzenova CS : Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int J Rad Oncol Biol Phys.* 2006; 64:573-580.
2. Djuzenova CS, **Mahrhofer H**, Oppitz U, Flentje M : Radiation-induced DNA damage, damage repair and cell-type specific response to the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, in human tumor cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Strahlentherapie und Onkologie* 2006; 182:83-83.
3. Bürger S, Schindler D, Fehn M, Mühl B, **Mahrhofer H**, Hoehn H, Müller B, Flentje M, Seemanová E, and Djuzenova CS : Radiation-induced DNA damage and repair of peripheral blood mononuclear cells from Nijmegen breakage syndrome patients and carriers assessed by the Comet assay. *Environm. Mol. Mutagenesis* 2006; 47:260-270.